



Παραγωγή βιοαιθανόλης από διατροφικά απορρίματα



© Beboy - Fotolia.com

Θεοδοπούλου Μαρία

Επιβλέπων καθηγητής: Δημήτρης Κέκος

Καθηγητής Ε.Μ.Π.

Αθήνα , Φεβρουάριος 2016

Περιεχόμενα

Περίληψη.....	5
Abstract	7
A. Θεωρητικό Μέρος	9
1. Εισαγωγή	9
2. Βιοκαύσιμα	10
2.1 Βιοαιθανόλη	11
2.2 Πλεονεκτήματα και μειονεκτήματα βιοαιθανόλης έναντι της βενζίνης	12
2.3 Πρώτες ύλες παραγωγής βιοαιθανόλης	13
2.3.1 Παραγωγή βιοαιθανόλης από σακχαρούχες πρώτες ύλες	13
2.3.2 Παραγωγή βιοαιθανόλης από αμυλούχες πρώτες ύλες	14
2.3.3 Παραγωγή βιοαιθανόλης από λιγνινοκυτταρινούχες πρώτες ύλες	14
2.2.4 Βιοαπόβλητα (βιολογικά απόβλητα)	15
3. Διατροφικά Απορρίμματα	16
3.1 Διαχείριση διατροφικών απορριμμάτων	16
3.2 Σύσταση διατροφικών απορριμμάτων	18
Κυτταρίνη	19
Ημικυτταρίνη	19
Λιγνίνη	20
Άμυλο	20
3.3 Βιομετατροπή διατροφικών απορριμμάτων σε βιοαιθανόλη	21
4. Προκατεργασία πρώτης ύλης	21
4.2 Μέθοδοι προκατεργασίας	22
4.2.1 Φυσικές μέθοδοι προκατεργασίας	22
Μηχανικός κατακερματισμός	23
Ακτινοβολήση	23
4.2.2 Φυσικοχημικές μέθοδοι προκατεργασίας	23
Εκτόνωση ατμού (έκρηξη ατμού) συνδυαζόμενη με αυτοϋδρόλυση	24
Εκτόνωση ατμού συνδυαζόμενη με προσθήκη όξινου καταλύτη	24
Εκτόνωση ίνας με αμμωνία (Ammonia fiber explosion, AFEX)	24
Έκρηξη διοξειδίου του άνθρακα (CO ₂)	25
Υδροθερμική προκατεργασία	26
Προκατεργασία με μικροκύματα και χημικά αντιδραστήρια	26
4.2.3 Χημικές μέθοδοι προκατεργασίας	27

Αλκαλική προκατεργασία.....	27
Προκατεργασία με αλκαλικό υπεροξείδιο του υδρογόνου (H ₂ O ₂)	27
Προκατεργασία με οργανικούς διαλύτες.....	27
Υγρή προκατεργασία οξείδωσης.....	27
Προκατεργασία με οξύ	28
Προκατεργασία με οζονόλυση	28
4.2.4 Βιολογικές μέθοδοι προκατεργασίας	29
5. Υδρόλυση.....	29
5.1 Όξινη υδρόλυση	30
5.1.1 Υδρόλυση με αραιό οξύ.....	30
5.1.2 Υδρόλυση με πυκνό οξύ	30
5.2 Ενζυμική υδρόλυση	31
6. Αλκοολική Ζύμωση	35
6. 1 Διεργασίες Παραγωγής Βιοαιθανόλης.....	35
6.1.2 Ταυτόχρονη Σακχαροποίηση και Ζύμωση (SSF)	35
6.2 Μικροοργανισμοί στην παραγωγή βιοαιθανόλης	36
6.2.1 <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	38
6.2.2 <i>Zygomonas mobilis</i>	39
6.2.3 <i>Escherichia coli</i>	39
6.2.4 <i>Pichia stipitis</i>	40
6.3 Παραπροϊόντα της αλκοολικής ζύμωσης.....	40
6.4 Αναστολείς της αλκοολικής ζύμωσης.....	41
B. Πειραματικό Μέρος	42
1. Όργανα	42
2. Πρώτη ύλη	42
3. Ανάλυση σύστασης της πρώτης ύλης	42
Προσδιορισμός υγρασίας (NREL/TP-510-42618).....	42
Προσδιορισμός υδατοδιαλυτών συστατικών (NREL/TP-510-42619)	43
Προσδιορισμός αναγωγικών σακχάρων	43
Προσδιορισμός συγκέντρωσης γλυκόζης με τη χρήση ειδικού εμπορικού διαγνωστικού σκευάσματος (kit).....	44
Ανάλυση στερεού υπολείμματος.....	45
Προσδιορισμός στερεού αμύλου.....	45
Προσδιορισμός διαλυτού αμύλου	46

4. Προκατεργασία	46
5. Ενζυμική Υδρόλυση	46
6. Ζύμωση.....	47
7. Μέτρηση ενζυμικής ενεργότητας α-αμυλάσης.....	48
8. Μέτρηση ενζυμικής ενεργότητας αμυλογλυκοζιδάσης.....	48
Γ. Αποτελέσματα	50
1. Σύσταση διατροφικών απορριμμάτων.....	50
2. Ενζυμική υδρόλυση διατροφικών απορριμμάτων : επίδραση ενζυμικού φορτίου.....	50
3.Βιομετατροπή διατροφικών απορριμμάτων σε αιθανόλη με εφαρμογή Μη ισοθερμοκρασιακής σακχαροποίησης και ζύμωσης.....	57
3.1 Επίδραση του ενζυμικού φορτίου κυτταρινολυτικού σκευάσματος.....	58
3.2 Επίδραση του ενζυμικού φορτίου γλυκοαμυλάσης.....	68
3.3 Επίδραση του ενζυμικού φορτίου α-αμυλάσης.....	78
Δ. Συμπεράσματα	88
Ε. Βιβλιογραφία.....	94

Περίληψη

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

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

Αρχικά, η πρώτη ύλη προκατεργάζεται υδροθερμικά σε θερμοκρασία 120°C για 1 h παρουσία H₂SO₄ σε περιεκτικότητα 1g/100g στερεού, με συγκέντρωση στερεού 30 % β/ο . Στη συνέχεια, εξετάστηκε η επίδραση του ενζυμικού φορτίου στην ενζυμική υδρόλυση των διατροφικών απορριμμάτων. Δείγματα διατροφικών απορριμμάτων υπέστησαν ενζυμική υδρόλυση με χρήση μείγματος κυτταρινασών (Cellic® CTec2) ολικής ενεργότητας 5, 10, 20, 40, 60, 80 και 100 FPU/g_{ξηρού υλικού}. Τα αποτελέσματα έδειξαν ότι η υδρόλυση ευνοείται με την αύξηση του ενζυμικού φορτίου, ενώ η μέγιστη γλυκόζη (84,03 g/L) απελευθερώθηκε με χρήση ενζυμικού φορτίου 100 FPU/g_{ξηρού υλικού}.

Έπειτα εφαρμόστηκε η διεργασία της μη ισοθερμοκρασιακής ταυτόχρονης σακχαροποίησης και ζύμωσης (NSSF) διαλείποντος έργου για προϋδρολυμένα δείγματα. (30°C, 72 hours, *Saccharomyces cerevisiae*)

- a) Τα προκατεργασμένα δείγματα (30% β/ο) υδρολήθηκαν με μείγμα κυτταρινασών (Cellic® CTec2) ολικής ενεργότητας 5, 10, 20, 40, 60, 80 και 100 FPU/g ξηρού υλικού. Η ζύμωση πραγματοποιήθηκε σε συνθήκες διαλείποντος έργου για 72 ώρες στους 30°C. Η μέγιστη συγκέντρωση αιθανόλης (28,76 g/L) επιτεύχθηκε για χρήση 60 FPU/g ξηρού υλικού οδηγώντας σε παραγωγικότητα ίση με 1,39 g/L/h.
- b) Τα προκατεργασμένα δείγματα (30% β/ο) υδρολήθηκαν με Cellic® CTec2 ενεργότητας 60 FPU/g ξηρού υλικού και Spirizyme 20-100 Units/g_{αμύλου}. Η ζύμωση πραγματοποιήθηκε σε συνθήκες διαλείποντος έργου για 72 ώρες

στους 30°C. Η μέγιστη συγέντρωση αιθανόλης ήταν ίση με 41,44 g/L ενώ της παραγωγικότητας 3,31 g/L/h (20 Units/g_{αμύλου}) .

- c) Τα προκατεργασμένα δείγματα (30% β/ο) υδρολήθηκαν με Cellic® CTec2 ενεργότητας 60 FPU/g ξηρού υλικού , Spirizyme 80 Units/g_{αμύλου} και Liqozyme 2,65/5,3/7,95/10,6/13,25 Units/g_{αμύλου}. Η ζύμωση πραγματοποιήθηκε σε συνθήκες διαλείποντος έργου για 72 ώρες στους 30°C. Η μέγιστη συγέντρωση αιθανόλης ήταν ίση με 41,60 g/L ενώ της παραγωγικότητας 5,03 g/L/h.

Σύμφωνα με τα αποτελέσματα των πειραμάτων βιομετατροπής, η προσθήκη α-αμυλάσης (Liqozyme) δεν αυξάνει την παραγωγή αιθανόλης. Αντίθετα, η προσθήκη γλυκοαμυλάσης (Spirizyme) ευνοεί την παραγωγή βιοαιθανόλης όμως η αύξηση του ενζυμικού φορτίου δεν επιφέρει καμία αλλαγή στη συγκέντρωση της αιθανόλης.

Abstract

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

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

Initially, the raw material is pretreated hydrothermally at 120°C temperature for 1 hour with the presence of H₂SO₄ in solid content 1g/100 g_{dry mater}, with a concentration of solid of 30% w/v. Then, the effect of the enzyme loading in the food-waste enzymatic hydrolysis was examined. Food waste samples were hydrolysed with a cellulose mixture (Cellic® CTec2) at enzyme loading of 5, 10, 20, 40, 60, 80 and 100 FPU/g dry matter. The results indicated that hydrolysis was favored by the enzyme loading increase, while the maximum glucose concentration (84,03 g/L) was achieved using cellulase at an enzyme loading of 100 FPU/g dry HFW.

Furthermore, a batch nonisothermal simultaneous saccharification and fermentation (NSSF) process was applied to prehydrolysed samples as described below (30 °C , 72 hours, *Saccharomyces cerevisiae*). Three different experiments took place.

- a) The pretreated material (30% w/v) was subjected to enzymatic hydrolysis with a cellulose mixture (Cellic®CTec2) at enzyme loading of 5, 10, 20, 40, 60, 80 and 100 FPU/g dry matter. Fermentation was operated in batch mode for 72 hours at 30°C. Maximum ethanol concentration (84,03 g/L) and productivity (1,39 g/L/h) was achieved at 60 FPU/g dry matter
- b) The pretreated material (30% w/v) was subjected to enzymatic hydrolysis with Cellic®CTec2 at enzyme activity 60 FPU/g dry matter and Spirizyme 20-100 Units/g_{starch}. Fermentation was operated in batch mode for 72 hours at 30°C. Maximum ethanol concentration (41,44 g/L) and productivity (3,31 g/L/h) was achieved when the enzymatic load of glucoamylase was 20 Units/g_{starch}.
- c) The pretreated material (30% w/v) was subjected to enzymatic hydrolysis with Cellic®CTec2 at enzyme activity 60 FPU/g dry matter, Spirizyme 20-100 Units/g_{starch} and Liquozyme 2,65/5,3/7,95/10,6/13,25 Units/g_{starch}. Fermentation was operated in batch mode for 72 hours at 30°C. Maximum

ethanol concentration (41,60 g/L) and productivity (5,03 g/L/h) was achieved when the enzymatic load of α -amylase was 2,65 Units/g_{starch}.

According to the results of the NSSF process, the addition of α -amylase (Liquozyme) does not increase the production of ethanol. On the other hand, the addition of glucoamylase (Spirizyme) favors bioethanol production but increasing its enzyme load, no alternation in ethanol concentration was observed.

A. Θεωρητικό Μέρος

1.Εισαγωγή

Η εξάντληση των ορυκτών καυσίμων καθώς και τα αυξημένα ποσοστά αέριων ρύπων που συσσωρεύονται στην ατμόσφαιρα εξαιτίας της χρήσης τους για την κάλυψη των ενεργειακών αναγκών παγοςμίως, έχει οδηγήσει σε μια στροφή προς εναλλακτικά καύσιμα και πηγές ενέργειας, πιο οικολογικά, τα οποία τείνουν να υποκαταστήσουν τη χρήση των προϊόντων πετρελαίου. Η χάραξη λοιπόν της πολιτικής της Ευρωπαϊκής Ένωσης για τις ανανεώσιμες πηγές ενέργειας βασίστηκε στην ανάγκη να αντιμετωπιστούν τα προβλήματα αειφορίας που σχετίζονται με την κλιματική αλλαγή και την ατμοσφαιρική ρύπανση, να βελτιωθεί η ασφάλεια του ενεργειακού εφοδιασμού της Ευρώπης, να αναπτυχθεί η ανταγωνιστικότητα της Ευρώπης και η βιομηχανική και τεχνολογική καινοτομία. Σύμφωνα με την οδηγία της Ευρωπαϊκής Επιτροπής Ανανεώσιμων Πηγών Ενέργειας που εκδόθηκε τον Ιανουάριο του 2007 τίθεται υποχρεωτικός στόχος συμμετοχής κατά 20% ενέργειας που προέρχεται από ανανεώσιμες πηγές (Α.Π.Ε.) στο συνολικό μίγμα ενέργειας της Ε.Ε. μέχρι το 2020. Τον Απρίλιο του 2009 η Ε.Ε. υιοθέτησε την οδηγία 2009/28/EC η οποία θέτει στόχους για κάθε κράτος-μέλος ξεχωριστά. Σύμφωνα με την οδηγία αυτή, η Ελλάδα δεσμεύεται να επιτύχει ένα στόχο της τάξεως του 18% συμμετοχής ενέργειας από ΑΠΕ στο συνολικό μίγμα ενέργειας της χώρας, ποσοστό το οποίο αυξήθηκε από την Ελληνική Κυβέρνηση σε 20% στο σχετικό Νόμο 3851/2010. Παρ' όλα αυτά καμία μονάδα παραγωγής βιοαιθανόλης δεν έχει κατασκευαστεί ακόμη. (Voumvoulakis et al., 2012)

Σε αυτό το πλαίσιο, τα βιοκαύσιμα έχουν αρχίσει να γίνονται εξαιρετικά σημαντικά ως εναλλακτική πηγή ενέργειας. (Sanjib Kumar Karmee, 2016) Παρόλο όμως που αποτελούν μόνο ένα μικρό μέρος της ενέργειας από ανανεώσιμες πηγές, η παραγωγή τους προβλέπεται να αυξηθεί κατά 1,4% σε ετήσια βάση, ή κοντά στο 40% μέχρι το 2040 (US Energy Information Administration, 2014). Η τάση αυτή ενδεχομένως θα μπορούσε να ενθαρρύνει την πολιτική, τη βιομηχανική και τεχνολογική πρόοδο για τα βιοκαύσιμα στις Ηνωμένες Πολιτείες. (Trumbo and Tonn, 2015) Στην Ευρώπη για το έτος 2013 το μερίδιο των βιοκαυσίμων στον τομέα των μεταφορών έφτασε το 5,4%, με την Σουηδία να ξεπερνά κατά 6,7% τον δευσεμείο στόχο του 10% που έθεσε η ΕΕ. (European Commission, 2015)

Το βιοντίζελ και η βιοαιθανόλη αποτελούν παραδείγματα τέτοιων καυσίμων τα οποία χρησιμοποιούνται ως υποκατάστατο ντίζελ και βενζίνης σε αρκετές χώρες είτε αυτούσια είτε ως μίγματα με τα αντίστοιχα ορυκτά καύσιμα. (Sanjib Kumar

Karmee, 2016) Τα βιοκαύσιμα μπορούν να παραχθούν μέσω βιοχημικών και θερμοχημικών διαδικασιών, όπως η ζύμωση σακχάρων, η υδρόλυση της κυτταρίνης, η πυρόλυση και η αεριοποίηση. Η κυτταρινούχος βιομάζα, τα μικρόβια και φύκη, η σόγια, το καλαμπόκι, το ζαχαροκάλαμο και άλλα, είναι μερικές από τις πρώτες ύλες που χρησιμοποιούνται στις διεργασίες παραγωγής βιοκαυσίμων. Κάθε είδος πρέπει να υποστεί διαφορετική επεξεργασία προκειμένου να παραχθεί καύσιμο. (*Trumbo and Tonn, 2015*) Παράλληλα, τα βιοκαύσιμα μπορούν να συμβάλουν σημαντικά στην υλοποίηση των στόχων της ΕΕ για τις ανανεώσιμες πηγές ενέργειας και τη μείωση εκπομπών αερίων του θερμοκηπίου από καύσιμα οδικών μεταφορών έως το 2020. Ωστόσο, για να έχουν θετικό αντίκτυπο στην κλιματική αλλαγή, θα πρέπει να παράγονται με βιώσιμο τρόπο, με ελάχιστο ανταγωνισμό σε σχέση με την παραγωγή τροφίμων και ζωοτροφών. Δεν έχουν όλα τα βιοκαύσιμα την ίδια επίδραση στις εκπομπές αερίων θερμοκηπίου. Η πρώτη γενιά η οποία παράγεται τώρα προέρχεται από προϊόντα όπως η ζάχαρη, τα δημητριακά και τα φυτικά έλαια η χρήση των οποίων ανταγωνίζεται άμεσα τις καλλιέργειες τροφίμων και ζωοτροφών αναφορικά με τη χρήση γεωργικών εκτάσεων. Αυτό μπορεί να οδηγήσει σε επιπλέον μετατροπή των γαιών και συνεπαγόμενη απελευθέρωση εκπομπών. Στη δεύτερη και τρίτη γενιά βιοκαυσίμων χρησιμοποιούνται πρώτες ύλες όπως απόβλητα, φύκια ή άχυρο τα οποία δεν επεμβαίνουν στην παγκόσμια παραγωγή τροφίμων. Τα βιολογικά απόβλητα έχουν χρησιμοποιηθεί ως πρώτη ύλη για την παραγωγή διαφόρων προϊόντων, χρησιμοποιώντας χημικές και μικροβιακές διεργασίες. Η πλειοψηφία αυτών των προϊόντων, προϊόντα είναι το μεθάνιο, η βιοαιθανόλη και η ενέργεια (ηλεκτρική ενέργεια), προέρχεται από βιολογικές διεργασίες, συμπεριλαμβανομένης της αερόβιας και αναερόβιας ζύμωσης. (*European Commission, 2015*)

2.Βιοκαύσιμα

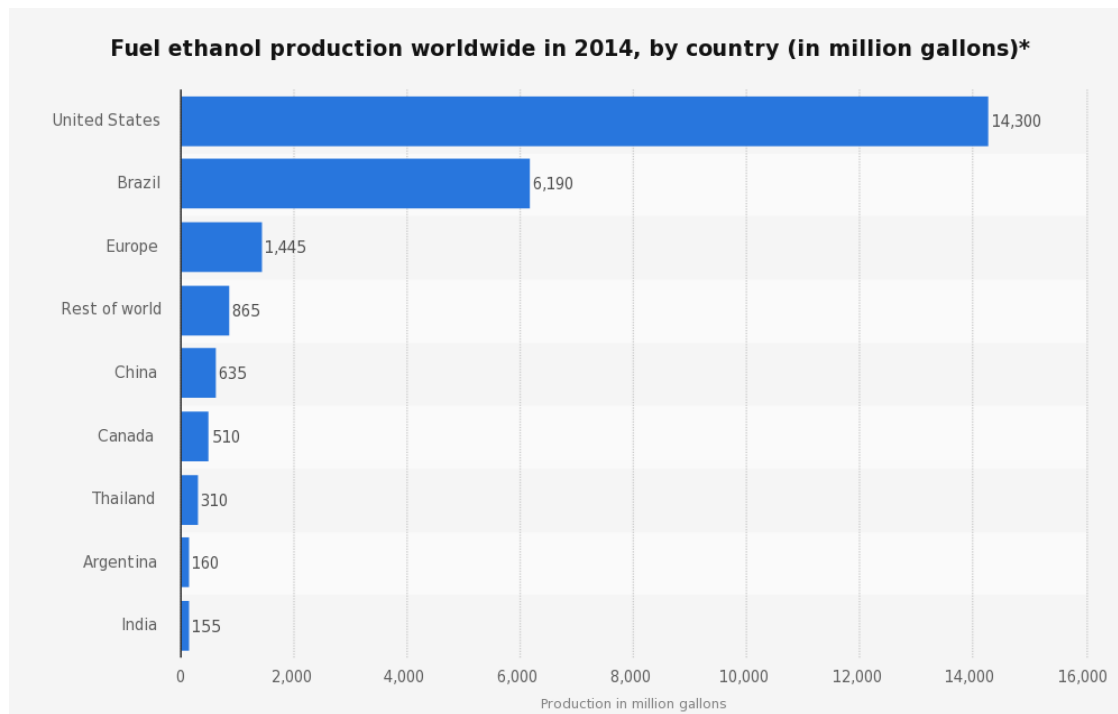
Η ανάγκη χρήσης εναλλακτικών και ανανεώσιμων καυσίμων έναντι του πετρελαίου και των προϊόντων του, έχει αρχίσει να παίζει πολύ σημαντικό ρόλο στον ανεπτυγμένο κόσμο. Ως βιοκαύσιμα χαρακτηρίζονται όλα τα στερεά, υγρά και αέρια καύσιμα που προέρχονται από τη βιομάζα. Τα κυριότερα από αυτά είναι:

- Το *βιοντίζελ*, που παράγεται από τα φυτικά έλαια και τα ζωικά λίπη. Αποτελεί ένα άριστο υποκατάστατο του συμβατικού ντίζελ και μπορεί να χρησιμοποιείται αυτούσιο ή σε μείγματα με αυτό στους ήδη υπάρχοντες πετρελαιοκινητήρες.
- Η *βιοαιθανόλη*, που παράγεται, κυρίως, από σακχαρούχα, κυτταρινούχα και αμυλούχα φυτά και μπορεί να χρησιμοποιείται σε μείγματα με τη βενζίνη.

- Το βιοαέριο, που παράγεται από τα οργανικά αγροτοβιομηχανικά και άλλα απόβλητα και υπολείμματα, καθώς και από ενεργειακά φυτά.
- Τα πέλλετς και οι μπρικέττες, που παράγονται από υπολείμματα γεωργικών καλλιεργειών και επεξεργασίας των γεωργικών προϊόντων (γεωργική βιομάζα), υπολείμματα καλλιέργειας των δασών και επεξεργασίας του ξύλου (δασική βιομάζα) κ. ά.
- Τα βιοκαύσιμα νέας γενιάς (βιοντίζελ, βιοαιθανόλη, πράσινο ντίζελ, αέριο σύνθεσης, βιοαέριο, βιοϋδρογόνο, συνθετικά βιοκαύσιμα κ.ά.), που θα παράγονται από απόβλητη και υπολειμματική βιομάζα με λιγότερα προβλήματα.

2.1 Βιοαιθανόλη

Η βιοαιθανόλη είναι η αιθανόλη ή αιθυλική αλκοόλη (C_2H_5OH) που προέρχεται από βιομάζα και είναι το πρώτο υγρό βιοκαύσιμο που χρησιμοποιήθηκε ως υποκατάστατο της βενζίνης σε οχήματα. Στο Διάγραμμα Δ1 φαίνονται οι πρώτες σε παραγωγή βιοαιθανόλης χώρες για το 2014 σύμφωνα με το αμερικανικό υπουργείο γεωργίας.



Διάγραμμα Α1. Κατάταξη χωρών βάσει της παραγωγής βιοαιθανόλης για το 2014

Πηγή : US Department of Agriculture , 2015

Η βιοαιθανόλη παράγεται κυρίως από τη ζάχαρη με τη μέθοδο της αλκοολικής ζύμωσης. Μπορεί, επίσης, να συντεθεί βιομηχανικά μέσω της χημικής αντίδρασης του αιθυλενίου με ατμό. Είναι ένα άχρωμο διαυγές υγρό, υψηλής ενεργειακής περιεκτικότητας και καθαρότερο περιβαλλοντικά από τη βενζίνη. Είναι βιοαποικοδομήσιμη, χαμηλής τοξικότητας και προκαλεί πολύ μικρή περιβαλλοντική μόλυνση αν απορριφθεί στο περιβάλλον. Κατά την τέλεια καύση της παράγεται διοξείδιο του άνθρακα (CO₂) και νερό (H₂O). Αποτελεί ένα καύσιμο υψηλού αριθμού οκτανίων και μπορεί να χρησιμοποιηθεί ως πρόσθετο για την αύξηση του αριθμού οκτανίων της βενζίνης. Με την ανάμειξή της με τη βενζίνη επιτυγχάνεται ο εμπλουτισμός του καυσίμου σε οξυγόνο, με αποτέλεσμα μία πιο ολοκληρωμένη καύση, άρα και μειωμένες εκπομπές επικίνδυνων καυσαερίων, όπως μονοξειδίου του άνθρακα (CO) κ.ά..Καύσιμα μείγματα αιθανόλης με βενζίνη πωλούνται ευρύτατα στις Ηνωμένες Πολιτείες. Το πιο συνηθισμένο μείγμα είναι αυτό που αποτελείται από 10% αιθανόλη και 90% βενζίνη (E10). Στη Βραζιλία η βιοαιθανόλη χρησιμοποιείται καθαρή ή αναμειγμένη με βενζίνη σε αναλογίες 24% βιοαιθανόλη και 76% βενζίνη. Τα συμβατικά οχήματα δεν απαιτούν μετατροπή για να κινηθούν με E10. Επίσης, η χρήση του E10 δεν έχει καμία επίπτωση στην εγγύηση του οχήματος. Τα σύγχρονα οχήματα μπορούν να κινηθούν και με καύσιμο μείγμα 85% αιθανόλης και 15% βενζίνης (E85). (Balat et al. , 2008)

2.2 Πλεονεκτήματα και μειονεκτήματα βιοαιθανόλης έναντι της βενζίνης

Η βιοαιθανόλη έχει μεγαλύτερο αριθμό οκτανίων, ευρύτερα όρια αναφλεξιμότητας, υψηλότερες ταχύτητες μετάδοσης του μετώπου της φλόγας και υψηλότερες ενθαλπίες εξάτμισης από τη βενζίνη. Οι ιδιότητές της αυτές επιτρέπουν υψηλότερη αναλογία συμπίεσης και μικρότερο χρόνο καύσης, που οδηγούν σε καλύτερη θεωρητική απόδοση έναντι της βενζίνης σε έναν κινητήρα εσωτερικής καύσης. Ο αριθμός οκτανίων είναι ένα μέτρο της ποιότητας των καυσίμων, και ιδιαίτερα της βενζίνης, για μηχανές εσωτερικής καύσης και μπορεί να χρησιμοποιηθεί για την πρόληψη της πρόωρης ανάφλεξης, η οποία οδηγεί σε “χτυπήματα” της μηχανής. Στις μηχανές εσωτερικής καύσης προτιμάται μεγάλος αριθμός οκτανίων. Ένα οξυγονούχο καύσιμο, όπως η βιοαιθανόλη, παρέχει καλή αντικροτική ικανότητα. Επιπλέον, λόγω του ότι περιέχει οξυγόνο, η καύση της είναι πιο αποτελεσματική και, συνεπώς, μειώνει τους υδρογονάνθρακες, το μονοξείδιο του άνθρακα (CO) και τις εκπομπές σωματιδίων στα καυσαέρια (Balat et al. , 2008). Η συνεισφορά της στο σχηματισμό οξειδίων του αζώτου (NOx) είναι ασήμαντη (Χριστακόπουλος και Τόπακας, 2014). Τα μειονεκτήματα της βιοαιθανόλης περιλαμβάνουν τη χαμηλότερη ενεργειακή πυκνότητα από τη βενζίνη (η βιοαιθανόλη παρέχει το 66% της ενέργειας που παρέχει η βενζίνη), τη δυνατότητα διάβρωσής της, τη χαμηλή

φωτεινότητα της φλόγας της, τη χαμηλότερη τάση ατμών (καθιστώντας, έτσι, δύσκολη την εκκίνηση με ψυχρό κινητήρα), την αναμειξιμότητά της με το νερό και την τοξικότητά της για τα οικοσυστήματα (Balat et al. , 2008).

2.3 Πρώτες ύλες παραγωγής βιοαιθανόλης

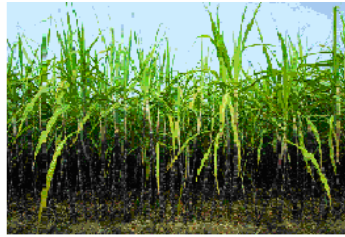
Η βιοαιθανόλη παράγεται συνήθως από τις γεωργικές πρώτες ύλες που περιέχουν σάκχαρα. Οι πρώτες ύλες αυτές μπορούν να ταξινομηθούν σε πρώτης γενιάς (σακχαρούχες και αμυλούχες) και δεύτερης γενιάς (λιγνινοκυτταρινούχες). Τα σάκχαρα (π.χ. από σακχαροκάλαμα, μελάσα, σακχαρότευτλα, και φρούτα) μπορούν να υποστούν απευθείας ζύμωση με χρήση ζύμης για παραγωγή αιθανόλης. Θα πρέπει να σημειωθεί ότι εάν χρησιμοποιούνται σακχαρούχες πρώτες ύλες, όπως οι χυμοί της μελάσας και του σακχαροκάλαμου για τη ζύμωση, τότε διεργασίες όπως η άλεση, η προκατεργασία, η υδρόλυση και η αποτοξίνωση δεν είναι απαραίτητες. Για την παραγωγή των ζυμώσιμων σακχάρων από αμυλούχα υλικά, μπορεί να χρησιμοποιηθούν διεργασίες όπως η άλεση, η υγροποίηση και η σακχαροποίηση. Στην περίπτωση λιγνινοκυτταρινούχων πρώτων υλών, οι διεργασίες αυτές είναι απαραίτητες. Το βήμα που προηγείται της διεργασίας ζύμωσης, είναι η κύρια διαφορά μεταξύ των διαδικασιών παραγωγής αιθανόλης από τις διάφορες πρώτες ύλες (Vohra et al. , 2014).

2.3.1 Παραγωγή βιοαιθανόλης από σακχαρούχες πρώτες ύλες

Τα σακχαροκάλαμα, τα σακχαρότευτλα και το γλυκό σόργο είναι καλλιέργειες που χρησιμοποιούνται ως πρώτες ύλες για την παραγωγή βιοαιθανόλης. Τα κύρια πλεονεκτήματά τους είναι η υψηλή απόδοση σακχάρων ανά στρέμμα και το χαμηλό κόστος μετατροπής. Το κύριο μειονέκτημά τους είναι οι διακυμάνσεις της διαθεσιμότητάς τους λόγω εποχής. Επειδή οι ίνες των στελεχών και των φύλλων (βγάσση ή υπολείμματα σακχαροκάλαμου) χρησιμοποιούνται για την παραγωγή ατμού και ηλεκτρικής ενέργειας για την βιοδιύλιση, το σακχαροκάλαμο έγινε μια οικονομικά αποδοτική πηγή βιοκαυσίμων. Επιπλέον, το υγρό απόβλητο (βινάσσα) χρησιμοποιείται για λίπασμα και άρδευση στις φυτείες, εξαιρέοντας, έτσι, το κόστος της επεξεργασίας των λυμάτων. Είναι γενικά αποδεκτό ότι η αλκοολική ζύμωση από σακχαρούχες πρώτες ύλες είναι μία πολύ γνωστή και τελειοποιημένη διαδικασία (Vohra et al. , 2014).



Γλυκός σόργος



Σακχαροκάλαμα



Σακχαρότευτλα

Εικόνα Α1. Σακχαρούχες πρώτες ύλες για παραγωγή βιοαιθανόλης.

2.3.2 Παραγωγή βιοαιθανόλης από αμυλούχες πρώτες ύλες

Τα σιτηρά (καλαμπόκι, σιτάρι ή κριθάρι) περιέχουν κυρίως άμυλο (για παράδειγμα, το καλαμπόκι περιέχει 60-70%). Το άμυλο που είναι αποθηκευμένο στα σιτηρά αποτελείται από μακριές αλυσίδες μονάδων γλυκόζης. Οι αλυσίδες αυτές αποτελούν την αμυλόζη και την αμυλοπηκτίνη, οι οποίες περιέχουν 1.000 ή περισσότερα μονομερή και 1.000-6.000 ή περισσότερα μονομερή γλυκόζης αντίστοιχα. Για την παραγωγή αιθανόλης από άμυλο, πρέπει να σπάσουν οι αλυσίδες αυτές, ώστε να παραληφθεί σιρόπι γλυκόζης, το οποίο μπορεί να μετατραπεί σε αιθανόλη με ζυμομύκητες. Αυτού του είδους οι πρώτες ύλες είναι οι πλέον χρησιμοποιούμενες για την παραγωγή βιοαιθανόλης στη Βόρεια Αμερική και στην Ευρώπη. Το καλαμπόκι και το σιτάρι καλλιεργούνται κυρίως με σκοπό την παραγωγή αιθανόλης. Στις τροπικές χώρες, άλλα αμυλούχα φυτά, όπως η μανιόκα μπορούν να χρησιμοποιηθούν για τον ίδιο σκοπό. Στο άμυλο, τα πολυμερή της γλυκόζης σπάνε σε μονομερή μέσω μιας υδρολυτικής αντίδρασης που καταλύεται από το ένζυμο γλυκο-αμυλάση. Το προκύπτον σάκχαρο είναι γνωστό ως δεξτρόζη ή D-γλυκόζη που είναι ένα ισομερές της γλυκόζης. Στη συνέχεια ακολουθεί η ζύμωση, η απόσταξη και η αφυδάτωση ώστε να παραληφθεί, τελικά, άνυδρη αιθανόλη (Vohra et al. , 2014).



Καλαμπόκι



Κριθάρι



Σιτάρι

Εικόνα Α2. Αμυλούχες πρώτες ύλες για παραγωγή βιοαιθανόλης.

2.3.3 Παραγωγή βιοαιθανόλης από λιγνινοκυτταρινούχες πρώτες ύλες

Η βιοαιθανόλη μπορεί, ακόμη, να παραχθεί από λιγνινοκυτταρινούχες πρώτες ύλες και είναι γνωστή ως βιοαιθανόλη δεύτερης γενιάς. Αυτές οι πρώτες ύλες περιλαμβάνουν αγροτικά υπολείμματα, χόρτα και υπολείμματα δασικών καλλιεργειών και ξύλου. Έχουν γίνει τεράστιες ερευνητικές προσπάθειες για την ανάπτυξη οικονομικά αποδοτικών δεύτερης γενιάς ή προηγμένων τεχνολογιών για την παραγωγή αιθανόλης ως καυσίμου στη βιβλιογραφία. Ωστόσο, υπάρχουν κάποιες προκλήσεις όσον αφορά τις εφαρμογές των προηγμένων τεχνολογιών στο εμπόριο. Οι λιγνινοκυτταρινούχες πρώτες ύλες αποτελούνται από κυτταρίνη, ημικυτταρίνη και λιγνίνη. Η λιγνίνη δρα ως συνδετικό υλικό που κρατάει όλα τα άλλα συστατικά μαζί και είναι υπεύθυνη για τη δομική σταθερότητα της πρώτης ύλης. Τα σάκχαρα που υπάρχουν στην κυτταρίνη είναι κυρίως γλυκόζη. Ωστόσο, η ημικυτταρίνη είναι ένα μείγμα από διαφορετικούς τύπους σακχάρων. Περιέχει τόσο C6 (γλυκόζη, μαννόζη και γαλακτόζη) όσο και C5 (ξυλόζη, αραβινόζη, και ραμνόζη) σάκχαρα. Η χημική σύνθεση των λιγνινοκυτταρινούχων υλικών αποτελεί ένα βασικό παράγοντα που επηρεάζει την αποδοτικότητα της παραγωγής βιοκαυσίμων κατά τις διεργασίες μετατροπής. Η δομική και χημική σύσταση των λιγνινοκυτταρινούχων υλικών είναι εξαιρετικά μεταβλητή, λόγω των γενετικών και περιβαλλοντικών επιρροών και των αλληλεπιδράσεών τους (Vohra et al. , 2014).



Αγροτικά υπολείμματα



Υπολείμματα δασικών καλλιεργειών

Εικόνα Α3. Λιγνινοκυτταρινούχες πρώτες ύλες για παραγωγή βιοαιθανόλης.

2.2.4 Βιοαπόβλητα (βιολογικά απόβλητα)

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

δε μετατρέπονται ποτέ σε απόβλητα. Με βάση τον παραπάνω ορισμό, τα βιοαπόβλητα προέρχονται από οικίες, εμπορικές δραστηριότητες και υπηρεσίες, και εγκαταστάσεις παραγωγής και επεξεργασίας τροφίμων (*Ευρωπαϊκή Επιτροπή, 2008*).

Τα απόβλητα τροφών και τροφίμων που απορρίπτονται από εστιατόρια, μονάδες παραγωγής τροφίμων και οικίες αποτελούν ένα σημαντικό ποσοστό των αστικών στερεών αποβλήτων. Για το λόγο αυτό, μεγάλη προσοχή έχει στραφεί προς την επεξεργασία διατροφικών απορριμμάτων για την παραγωγή προϊόντων, όπως το γαλακτικό οξύ, η βιοαιθανόλη και το βιοαέριο (*Cekmecelioglu and Uncu, 2013*). Κάποτε, η υγειονομική ταφή των αποβλήτων αυτών ήταν η κύρια επιλογή για τη διαχείριση τους, πλέον όμως η ταφή των απορριμμάτων αυτών έχει αρχίσει να ασθενεί λόγω της εξάντλησης των διαθέσιμων ΧΥΤΑ. Η αποτέφρωση τους από την άλλη δεν αποτελεί ενδεδειγμένη μέθοδο διαχείριση τους δεδομένης της υψηλής τους υγρασίας και της παραγωγής διοξινών κατά την καύση. Η κύρια συμβατική μέθοδος ανακύκλωσης για τα απόβλητα τροφίμων ήταν η χρήση τους ως ζωοτροφές και λίπασμα. Ωστόσο όμως, για την αξιοποίηση των διατροφικών απορριμμάτων ως λιπάσματα παράγονται και μεγάλες ποσότητες υγρών αποβλήτων ενώ η χρήση τους ως ζωοτροφές ενδέχεται να προκαλέσει προβλήματα υγιεινής στη διατροφή των ζώων. Ως εκ τούτου, ήταν επιτακτική ανάγκη η εύρεση μιας βιώσιμης λύσης που ταυτόχρονα να αναπτύσει μια φιλική προς το περιβάλλον μέθοδο ανακύκλωσης που να μπορεί να μετατρέψει τα απόβλητα τροφίμων σε ένα προϊόν υψηλής αξίας, όπως η βιοαιθανόλη (*Yan et al. 2010*).

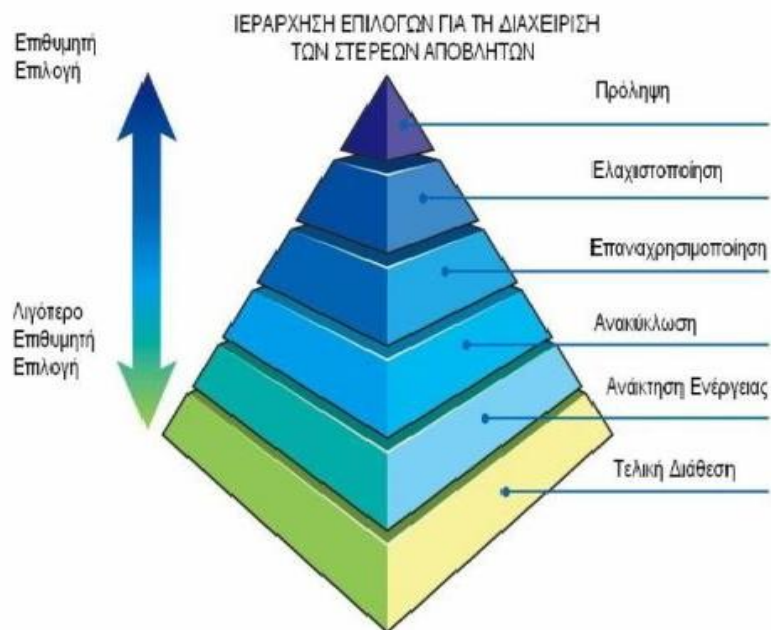
3. Διατροφικά Απορρίμματα

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

3.1 Διαχείριση διατροφικών απορριμμάτων

Τα περισσότερα υπολείμματα τροφών θάβονται σε Χώρους Υγειονομικής Ταφής Απορριμμάτων (ΧΥΤΑ) ή αποτεφρώνονται (*Hong and Yoon, 2011*). Ωστόσο, η αποτέφρωση είναι δαπανηρή και ενεργοβόρα, και δεδομένου ότι αυτά τα απορρίμματα έχουν υψηλή περιεκτικότητα σε υγρασία, πρέπει να καίγονται μαζί με άλλα πιο ξηρά, με αποτέλεσμα την παραγωγή διοξινών (*Tang et al. , 2008*). Άλλος τρόπος διαχείρισης των διατροφικών απορριμμάτων είναι η χρήση τους ως

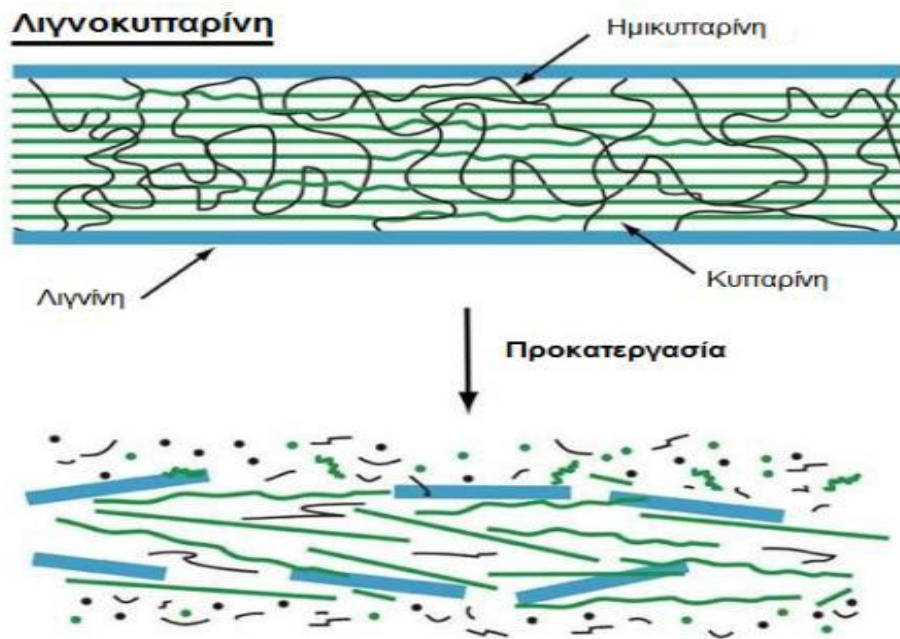
ζωοτροφή, κυρίως για βοοειδή. Τα απορρίμματα μπορούν να ξηραθούν και να διαμορφωθούν σε σβώλους πριν από την πώλησή τους ως ζωοτροφή. Ωστόσο, τα περισσότερα διατροφικά απορρίμματα έχουν χαμηλή περιεκτικότητα σε πρωτεΐνες. Συνεπώς, δεν είναι ιδανικά για ζωοτροφή. Η υψηλή περιεκτικότητα ορισμένων απορριμμάτων σε λιγνίνη, για παράδειγμα των υπολειμμάτων της ελιάς και του σακχαροκάλαμου, επίσης, περιορίζουν τη δυνατότητα χρήσης τους ως ζωοτροφές, καθώς καθιστά δύσκολη τη χώνεψή τους από τα ζώα. Επιπλέον, όταν τα απορρίμματα ξηραίνονται πριν χρησιμοποιηθούν ως ζωοτροφή, ενδέχεται να προκύψουν πρόσθετες δαπάνες, οι οποίες σπάνια ανακτώνται από την τιμή των πωλήσεων (Van Dyk et al. , 2013). Τον τελευταίο καιρό χρησιμοποιούνται πιο ελκυστικές, από οικονομική άποψη, μέθοδοι, όπως η κομποστοποίηση και η αναερόβια χώνευση για τη διαχείριση ορισμένων απορριμμάτων (Tang et al. , 2008). Με αναερόβια χώνευση δύο φάσεων τα απορρίμματα μπορούν να μετατρέπουν σε βιοκαύσιμα, πρωταρχικά σε υδρογόνο και στη συνέχεια σε μεθάνιο. Ωστόσο, οι ανισορροπίες στην παροχή και διαθεσιμότητα της πρώτης ύλης και το υψηλό κόστος κατασκευής δεξαμενών αναερόβιας χώνευσης, εμποδίζουν την ευρεία υιοθέτηση των εν λόγω εναλλακτικών προσεγγίσεων (Vanouraki et al. , 2013). Επειδή αυτά τα απορρίμματα είναι πλούσια σε σάκχαρα, που θα μπορούσαν να μετατραπούν σε πιο πολύτιμα προϊόντα, μεγάλη προσοχή στρέφεται προς την επεξεργασία τους για παραγωγή υλικών βιομάζας, όπως το γαλακτικό οξύ. Από αυτά τα σάκχαρα μπορεί, επίσης, να παραχθεί αιθανόλη. Αυτή τη στιγμή η αιθανόλη παράγεται κυρίως από καλαμπόκι στην Αμερική και την Κίνα και από πατάτα, ρύζι και σακχαροκάλαμο στη Βραζιλία. Ωστόσο, επειδή το καλαμπόκι είναι μια σημαντική πηγή τροφής, η χρήση του ως πηγή καυσίμου έχει κατακριθεί (Tang et al. , 2008). Επιπροσθέτως, η χρήση μη ανακυκλώσιμων απορριμμάτων ως πόρου θα μπορούσε να λύσει το πρόβλημα της χωρητικότητας των χώρων υγειονομικής ταφής, και να οδηγήσει σε μείωση των εκπομπών αερίων του θερμοκηπίου από τους χώρους διάθεσης των απορριμμάτων, βοηθώντας, έτσι, να πληρούνται οι απαιτήσεις των διαφόρων νομοθεσιών, συμπεριλαμβανομένης της οδηγίας-πλαίσιο της Ευρωπαϊκής Ένωσης για τα απόβλητα (Stichnothe and Azaragic, 2009). Σύμφωνα με την Οδηγία 2008/98/ΕΚ του Ευρωπαϊκού Κοινοβουλίου και του Συμβουλίου, για την καλύτερη προστασία του Περιβάλλοντος, η επεξεργασία των αποβλήτων πρέπει να γίνεται σύμφωνα με την ακόλουθη ιεράρχηση βάσει προτεραιότητας: πρόληψη, ελαχιστοποίηση, επαναχρησιμοποίηση, ανακύκλωση, άλλη ανάκτηση (ιδίως ενεργειακή) και τελική διάθεση (Εικόνα Α4) (Παπανικολάου, 2006). Συνεπώς, η διαχείριση των διατροφικών απορριμμάτων είναι ένα σημαντικό ζήτημα τόσο για την προστασία του περιβάλλοντος, όσο και για τη διατήρηση των πόρων. Η μετατροπή των υπολειμμάτων των τροφών σε βιοαιθανόλη θα μπορούσε να προσφέρει περαιτέρω οικονομικά πλεονεκτήματα, λόγω της αύξησης του κόστους διάθεσης των απορριμμάτων (Hong and Yoon, 2011).



Εικόνα Α4: Ιεράρχηση επιλογών για τη διαχείριση των στερεών αποβλήτων βασισμένη στην Οδηγία 2008/98/ΕΚ.

3.2 Σύσταση διατροφικών απορριμμάτων

Τα απορρίμματα των τροφών αποτελούνται κυρίως από υδατανθρακικά πολυμερή (άμυλο, κυτταρίνη, ημικυτταρίνη), λιγνίνη, οργανικές ενώσεις (πρωτεΐνες, λιπίδια, λιπαρά, κ.λπ.) και ένα υπολειπόμενο μικρότερο ανόργανο μέρος (τέφρα) (Vanouraki *et al.*, 2013). Η κυτταρίνη, η ημικυτταρίνη και η λιγνίνη συγκροτούν τα κυτταρικά τοιχώματα των φυτικών ιστών (Εικόνα Α5).



Εικόνα Α5: Δομή κυτταρικού τοιχώματος(Hsu et al. 1996).

Κυτταρίνη

Η κυτταρίνη αποτελεί το σημαντικότερο συστατικό των πολυσακχαριτών των κυτταρικών τοιχωμάτων και αποτελείται από ένα γραμμικό πολυμερές μονάδων D-γλυκόζης, συνδεδεμένων μεταξύ τους με β -1,4 γλυκοζιτικούς δεσμούς. Λόγω των δεσμών αυτών, ο διασακχαρίτης κελλοβιόζη αποτελεί την επαναλαμβανόμενη δομική μονάδα της αλυσίδας της κυτταρίνης. Ο βαθμός πολυμερισμού της κυτταρίνης έχει ένα εύρος από 7.000 έως 15.000 μονάδες γλυκόζης. Τα πολυμερή κυτταρίνης παρουσιάζονται ως διατεταγμένες δομές (μικροϊνίδια) και η κύρια λειτουργία τους είναι να εξασφαλίσουν την ακαμψία του κυτταρικού τοιχώματος των φυτών. Η κυτταρίνη είναι ένας αδιάλυτος πολυσακχαρίτης που σχηματίζει κρυσταλλικές περιοχές λόγω του σχηματισμού υδρογονικών δεσμών μεταξύ των μορίων γλυκόζης της ίδιας αλυσίδας καθώς και μεταξύ μορίων γλυκόζης που ανήκουν σε διαφορετικές αλυσίδες. Οι υδρογονικοί δεσμοί διευθετούν τις αλυσίδες της κυτταρίνης σε παράλληλη επίπεδη διάταξη προκαλώντας ταυτόχρονα και το σχηματισμό υδρογονικών δεσμών μεταξύ των παράλληλων επιπέδων κυτταρίνης. Αυτό οδηγεί στη δημιουργία συμπαγών και δύσκολα αποικοδομήσιμων κρυσταλλικών περιοχών. Παρ' όλα αυτά, μεταξύ των κρυσταλλικών περιοχών παρεμβάλλονται και κάποιες άμορφες περιοχές, οι οποίες είναι πολύ υγροσκοπικές. Τέλος, η κυτταρίνη διογκώνεται απεριόριστα και διαλύεται πλήρως από θειικό, υδροχλωρικό και φωσφορικό οξύ (Χριστακόπουλος και Τόπακας, 2014).

Ημικυτταρίνη

Υπάρχουν πολλοί διαφορετικοί τύποι ημικυτταρινών και μπορούμε να τις ορίσουμε σαν το μίγμα συμπολυμερών ουσιών. Είναι άμορφες, έχουν χαμηλό βαθμό

πολυμερισμού (150-300), είναι έντονα υγροσκοπικές και παρουσιάζουν υψηλή χημική δραστικότητα. Πιο αναλυτικά, η ημικυτταρίνη είναι ένα πλέγμαδιασταυρωμένων φυτικών μη-κυτταρινικών πολυσακχαριτών, οι οποίοι αποτελούνται από πεντόζες όπως D-ξυλόζη, L-αραβινόζη, L-ραμνόζη και L-φουκόζη, από εξόζες όπως D-μαννόζη, D-γλυκόζη, D-γαλακτόζη και από ουρονικά οξέα όπως D-γλυκουρονικό οξύ, D-4-O-μεθυλ-γλυκουρονικό οξύ και D-γαλακτουρονικό οξύ. Η κατηγοριοποίηση των ημικυτταρινών συνήθως γίνεται με βάση το κυριότερο μονομερές σάκχαρο. Έτσι, οι ημικυτταρίνες διακρίνονται σε γλυκάνες, μαννάνες, αραβινάνες, γαλακτάνες και ξυλάνες. Στη φύση, οι ημικυτταρίνες σπάνια αποτελούνται από ένα, μόνο, τύπο μονοσακχαρίτη. Συνήθως έχουν μία πολύπλοκη δομή που περιλαμβάνει πάνω από έναν τύπο πολυσακχαριτών, όπως η γλυκουρονοξυλάνη (ξυλόζη και ουρονικό οξύ), η αραβινογλυκουρονοξυλάνη (αραβινόζη, ξυλόζη και ουρονικό οξύ), η αραβινογαλακτάνη (ετεροπολυμερές αραβινόζης και γαλακτόζης) κ.ά. (Χριστακόπουλος και Τόπακας, 2014). Σε αντίθεση με την κυτταρίνη, η ημικυτταρίνη έχει τυχαία, άμορφη και διακλαδισμένη δομή, και έτσι υδρολύεται πιο εύκολα προς τα μονομερή συστατικά της από οξέα (Taherzadeh and Karimi, 2008).

Λιγνίνη

Η λιγνίνη είναι ένα από τα σπουδαιότερα και πιο άφθονα συστατικά της φυτικής βιομάζας. Είναι άμορφη και έχει πολύ υψηλό βαθμό πολυμερισμού (100.000 - 300.000). Πρόκειται για ένα πολύπλοκο τρισδιάστατο πολυμερές με βασική δομική μονάδα το φαινυλοπροπάνιο και είναι ιδιαίτερα δύσκολο να αποικοδομηθεί. Στη λιγνίνη υπάρχουν τρία διαφορετικά φαινυλοπροπάνια. Πρέπει να σημειωθεί ότι είναι έντονα υδρόφοβη ουσία, αδιάλυτη στο νερό. Οι δεσμοί στη λιγνίνη είναι αιθερικοί καθώς και δεσμοί άνθρακα – άνθρακα. Ενώνεται με χημικούς δεσμούς τόσο με τις ημικυτταρίνες όσο και με την κυτταρίνη. Η διάγκωσή της είναι χαμηλή και υδρολύεται δύσκολα κυρίως με αλκαλικά διαλύματα σε υψηλές θερμοκρασίες (150° –180°C). Τέλος, η λιγνίνη προσδίδει υψηλή αντοχή σε κάμψη, θλίψη και κρούση (Χριστακόπουλος και Τόπακας, 2014). Αποτελεί ένα από τα μειονεκτήματα της χρήσης λιγνινοκυτταρινούχων πρώτων υλών για ζύμωση, αφού καθιστά τη λιγνινοκυτταρίνη ανθεκτική στη χημική και βιολογική αποικοδόμηση (Taherzadeh and Karimi, 2008).

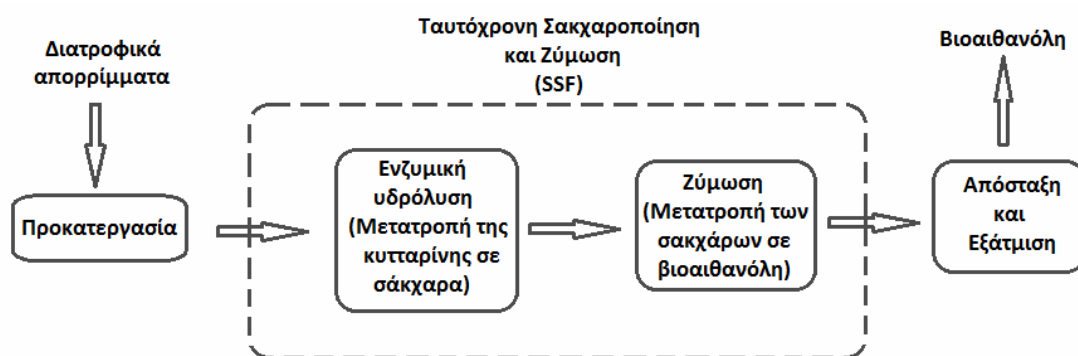
Άμυλο

Το άμυλο είναι ομοπολυσακχαρίτης γλυκόζης. Αποτελείται από δύο πολυμερή, ένα γραμμικό που ονομάζεται αμυλόζη και ένα διακλαδισμένο, την αμυλοπηκτίνη. Η αμυλόζη θεωρείται γραμμικό πολυμερές στο οποίο μόρια γλυκόζης συνδέονται με α- D-(1-4) γλυκοζιτικό δεσμό. Αποτελεί το εσωτερικό των αμυλοκόκκων (περίπου 15- 30% της μάζας του αμύλου). Ο α-D- (1-4) δεσμός επιτρέπει στο μόριο μια

ποικιλία διαμορφώσεων. Η κανονική της διαμόρφωση είναι αυτή της τυχαίας σπείρας. Παρουσία παραγόντων συμπλοκοποίησης, η αμυλόζη παίρνει τη μορφή έλικας με περίπου 6 μονάδες γλυκόζης ανά στροφή. Από την άλλη η αμυλοπηκτίνη αποτελεί το περίβλημα των αμυλοκόκκων (75-85% της μάζας του αμύλου). Είναι ένας διακλαδισμένος πολυσακχαρίτης και αποτελείται από μια αλυσίδα με α -D-(1-4) δεσμούς στην οποία ενυπάρχουν πλευρικές διακλαδώσεις με α -D-(1-6) δεσμό (οι α -D-(1-6) δεσμοί αποτελούν το 4 με 5% του συνόλου των γλυκοζιτικών δεσμών), με αλυσίδες των 25 περίπου μορίων γλυκόζης. Σε αντίθεση με την αμυλόζη ο βαθμός πολυμερισμού της δεν εμφανίζει μεγάλες διαφορές σε σχέση με τη φυσική πηγή. Η διευθέτηση των διακλαδώσεων της αμυλοπηκτίνης μπορεί να γίνει ποικιλόμορφα. Επισπροσθέτως, η αμυλοπηκτίνη είναι διαλυτή στο νερό σε αντίθεση με την αμυλόζη (Hoseney, 1992).

3.3 Βιομετατροπή διατροφικών απορριμμάτων σε βιοαιθανόλη

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



Εικόνα Α6: Διάγραμμα ροής διεργασίας παραγωγής βιοαιθανόλης από διατροφικά απορρίμματα με τεχνολογία SSF.

4. Προκατεργασία πρώτης ύλης

Στόχος της προκατεργασίας είναι η μείωση του δείκτη κρυσταλλικότητας της κυτταρίνης, η αύξηση του πορώδους της πρώτης ύλης, καθώς και η απομάκρυνση

της λιγνίνης και της ημικυτταρίνης, οι οποίες αποτελούν τα φυσικά εμπόδια της δράσης των κυτταρινασών, ώστε να βελτιωθεί ο ρυθμός της ενζυμικής υδρόλυσης και να αυξηθεί η απελευθέρωση ζυμώσιμων σακχάρων από την κυτταρίνη ή την ημικυτταρίνη. Η προκατεργασία πρέπει να πληροί τις ακόλουθες προϋποθέσεις: (1) να βελτιώνει την παραγωγή σακχάρων ή τη δυνατότητα παραγωγής τους με υδρόλυση, (2) να εμποδίζει την αποικοδόμηση ή την απώλεια των υδατανθράκων, (3) να εμποδίζει το σχηματισμό παραπροϊόντων, τα οποία αναστέλλουν τις μετέπειτα διεργασίες υδρόλυσης και ζύμωσης, (4) να ελαχιστοποιεί την ενεργειακή απαίτηση, (5) να μειώνει το κόστος των υλικών που απαιτούνται για την κατασκευή αντιδραστήρων προκατεργασίας, (6) να παράγει λιγότερα υπολείμματα και (7) να καταναλώνει λίγα και οικονομικά ή καθόλου χημικά (Χριστακόπουλος και Τόπακας, 2014 , Kumar et al. , 2009 , Taherzadeh and Karimi, 2008). Συγκεκριμένα, με την προκατεργασία προκαλούνται ρωγμές και θραύση του υλικού. Η ημικυτταρίνη υδρολύεται και η λιγνίνη υπόκειται σε δομικές αλλαγές που την αποδεσμεύουν από την κυτταρίνη. Αυτό έχει ως αποτέλεσμα τη μείωση της κρυσταλλικότητας και του βαθμού πολυμερισμού της κυτταρίνης και την αύξηση της ενεργής επιφάνειας του υλικού (Δόγαρης, 2009).

Σήμερα, γίνονται πολλές προσπάθειες με σκοπό την ανάπτυξη νέων τεχνολογιών για την περαιτέρω μείωση του κόστους προκατεργασίας, την παραγωγή λιγότερο τοξικών χημικών ουσιών και υψηλότερης αξίας παραπροϊόντων, και την επίτευξη υψηλότερης απόδοσης σακχάρων. Η επιλογή της μεθόδου προκατεργασίας που εφαρμόζεται, εξαρτάται από πολλούς παράγοντες, όπως ο τύπος της βιομάζας, η αξία των παραπροϊόντων, και η πολυπλοκότητα της διαδικασίας. Ο συνδυασμός διαφορετικών μεθόδων μπορεί να επιφέρει περισσότερα θετικά αποτελέσματα στο μέλλον. Οι μέθοδοι προκατεργασίας μπορούν να ταξινομηθούν σε τέσσερις κατηγορίες: τις φυσικές, τις φυσικοχημικές, τις χημικές, τις βιολογικές ή συνδυασμούς αυτών (Tong et al. , 2013 , Galbe and Zacchi , 2007).

4.2 Μέθοδοι προκατεργασίας

4.2.1 Φυσικές μέθοδοι προκατεργασίας

Οι φυσικές μέθοδοι προκατεργασίας μπορούν να αυξήσουν την ενεργή επιφάνεια και τους πόρους του υλικού, και να μειώσουν την κρυσταλλικότητα και το βαθμό πολυμερισμού της κυτταρίνης. Διαφορετικού τύπου φυσικές διεργασίες, όπως η άλεση (π.χ. με σφαίρα ή με δύο κυλίνδρους) και η ακτινοβολήση (π.χ. με ακτίνες γάμμα, με δέσμη ηλεκτρονίων ή με μικροκύματα) μπορούν να διευκολύνουν την ενζυμική υδρόλυση της πρώτης ύλης (Taherzadeh and Karimi, 2008).

Μηχανικός κατακερματισμός

Στόχος της προκατεργασίας με μηχανικό κατακερματισμό είναι η τροποποίηση της δομής της λιγνινοκυτταρίνης και η μείωση της κρυσταλλικότητάς της, αυξάνοντας, έτσι, την επιδεκτικότητα του υλικού στις κυτταρινάσες και διευκολύνοντας την αποδόμησή του και τη μετατροπή του σε αιθανόλη. Η άλεση του υλικού συνήθως προηγείται της ενζυμικής υδρόλυσης ή ακόμη και άλλων διεργασιών προκατεργασίας. Έχει, όμως, μελετηθεί και η εφαρμογή της ταυτόχρονα με την ενζυμική υδρόλυση. Στην τελευταία αυτή περίπτωση οι μηχανικές ενέργειες, η μεταφορά μάζας και η ενζυμική υδρόλυση εκτελούνται ταυτόχρονα. Ανάλογα με το είδος και τη δομή του εκάστοτε υλικού, εφαρμόζονται και διαφορετικές μέθοδοι άλεσης. Ένα από τα μειονεκτήματα της μεθόδου είναι ότι οι υψηλές ενεργειακές απαιτήσεις της και η συνεχής άνοδος των τιμών ενέργειας, καθιστούν τη διαδικασία οικονομικά ανέφικτη (*Alvira et al. , 2010*). Επιπλέον, δεν έχει την ικανότητα να απομακρύνει τη λιγνίνη, η οποία εμποδίζει την πρόσβαση των υδρολυτικών ενζύμων στην κυτταρίνη και αναστέλλει τη δράση τους (*Taherzadeh and Karimi, 2008*).

Ακτινοβόληση

Η ακτινοβόληση του υλικού π.χ. με ακτίνες γάμμα, δέσμη ηλεκτρονίων ή μικροκύματα μπορεί να αυξήσει την αποδόμηση της κυτταρίνης προς γλυκόζη και συνεπώς να βελτιώσει την ενζυμική υδρόλυση της λιγνινοκυτταρίνης. Ο συνδυασμός της προκατεργασίας με ακτινοβόληση με άλλες μεθόδους, όπως η κατεργασία με οξύ μπορεί να επιταχύνει περαιτέρω την ενζυμική υδρόλυση. Παρατηρήθηκε ότι η ενζυμική υδρόλυση διηθητικού χαρτιού, το οποίο δεν περιείχε καθόλου λιγνίνη δε βελτιώθηκε με την ακτινοβόληση, ενώ η ενζυμική υδρόλυση εφημερίδων, που περιείχαν μικρή ποσότητα λιγνίνης, παρουσίασε μικρή βελτίωση. Ως εκ τούτου, η επίδραση της ακτινοβολίας στο υλικό θα πρέπει να συσχετίζεται με την παρουσία της λιγνίνης, καθώς επίσης και με στοιχεία της δομής του, όπως η κρυσταλλικότητα και η πυκνότητα. Ωστόσο, η προκατεργασία με ακτινοβόληση είναι δαπανηρή, συνεπώς δύσκολα εφαρμόζεται σε βιομηχανική κλίμακα (*Taherzadeh and Karimi, 2008*).

4.2.2 Φυσικοχημικές μέθοδοι προκατεργασίας

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

Εκτόνωση ατμού (έκρηξη ατμού) συνδυαζόμενη με αυτοϋδρόλυση

Στην παρούσα διεργασία το υλικό θερμαίνεται με ατμό υψηλής πίεσης σε θερμοκρασίες 160-250 °C, για μια χρονική περίοδο μερικών δευτερολέπτων έως και μερικών λεπτών. Στη συνέχεια, το υλικό υφίσταται μία εκτονωτική αποσυμπίεση, που σε συνδυασμό με την αυτοϋδρόλυση που προκαλείται από το σχηματισμό διάφορων οργανικών οξέων από τα προϋπάρχοντα οξικά οξέα του υλικού λόγω της θερμοκρασίας, προκαλείται μερική υδρόλυση και διαλυτοποίηση της ημικυτταρίνης, με ταυτόχρονη βελτίωση του δυναμικού αποικοδόμησης της κυτταρίνης. Μειονέκτημα αυτής της διεργασίας αποτελεί η αποικοδόμηση των σακχάρων λόγω της υψηλής θερμοκρασίας και του μεγάλου χρόνου κατεργασίας (Χριστακόπουλος και Τόπακας, 2014).

Εκτόνωση ατμού συνδυαζόμενη με προσθήκη όξινου καταλύτη

Η προσθήκη ενός όξινου καταλύτη στην προηγούμενη διεργασία αυξάνει τη δυνατότητα υδρόλυσης της κυτταρίνης. Έτσι, το υλικό πριν την προκατεργασία με εκτόνωση ατμού εμποτίζεται με 0.5-6% (w/w) θειικού οξέος (H_2SO_4) ή διοξειδίου του θείου (SO_2). Κατά τη διάρκεια της παροχής ατμού, το διοξείδιο του θείου μετατρέπεται σε θειικό οξύ, που αποτελεί και τον όξινο καταλύτη. Η χρήση του διοξειδίου του θείου πλεονεκτεί σε σύγκριση με αυτήν του θειικού οξέος, μιας και έχει τη δυνατότητα να εμποτίζει καλύτερα και γρηγορότερα το υλικό. Για να αποφύγουμε το σχηματισμό παρεμποδιστών και να μεγιστοποιήσουμε ταυτόχρονα την ανάκτηση των σακχάρων, μπορούμε να εφαρμόσουμε διεργασίες δύο βημάτων. Στο πρώτο στάδιο, και σε σχετικά ήπιες συνθήκες (θερμοκρασία χαμηλότερη των 180 °C), διαλυτοποιείται το κλάσμα της ημικυτταρίνης. Επακολουθεί ένα δεύτερο στάδιο, όπου στο κλάσμα της κυτταρίνης εφαρμόζεται εκτόνωση ατμού σε υψηλότερη θερμοκρασία (μεγαλύτερη των 210 °C) (Χριστακόπουλος και Τόπακας, 2014).

Εκτόνωση ίνας με αμμωνία (Ammonia fiber explosion, AFEX)

Η εκτόνωση ίνας με αμμωνία είναι μία αλκαλική φυσικοχημική μέθοδος προκατεργασίας βιομάζας. Η βιομάζα κατεργάζεται με υγρή αμμωνία σε ήπια θερμοκρασία (π.χ. 90-100 °C) και σε συνθήκες υψηλής πίεσης (πάνω από 3 MPa) για ένα χρονικό διάστημα περίπου 30 min. Στη συνέχεια, η πίεση μειώνεται απότομα. Περίπου 2 kg αμμωνίας χρησιμοποιούνται ανά kg ξηρού υλικού. Η αμμωνία ανακυκλώνεται μετά από την προκατεργασία και τη μείωση της πίεσης, δεδομένου ότι είναι πολύ πτητική όταν βρίσκεται στα επίπεδα ατμοσφαιρικής πίεσης. Από τη

διεργασία αυτή, προκύπτει μόνο στερεό προκατεργασμένο υλικό, σε αντίθεση με άλλες μεθόδους, από τις οποίες προκύπτει ένας πολτός που διαχωρίζεται σε στερεό και υγρό κλάσμα. Η εκτόνωση ίνας με αμμωνία μπορεί να μειώσει αποτελεσματικά το κλάσμα της λιγνίνης στο υλικό, ενώ τα κλάσματα της ημικυτταρίνης και της κυτταρίνης παραμένουν σχεδόν ανέπαφα. Στις βέλτιστες συνθήκες, η μέθοδος αυτή μπορεί να βελτιώσει σημαντικά την ενζυμική υδρόλυση. Σημαντικό πλεονέκτημα της μεθόδου έναντι άλλων, αποτελεί η απουσία σχηματισμού ανασταλτικών ουσιών. Η μέθοδος, όμως, είναι αποτελεσματική σε υλικά που περιέχουν μικρό ποσοστό λιγνίνης και δε διαλυτοποιεί σχεδόν καθόλου την ημικυτταρίνη. Επιπλέον, η αμμωνία μετά το τέλος της κατεργασίας πρέπει να ανακυκλωθεί για τη μείωση του κόστους της διεργασίας και την προστασία του περιβάλλοντος (Χριστακόπουλος και Τόπακας, 2014, Taherzadeh and Karimi, 2008).

Έκρηξη διοξειδίου του άνθρακα (CO₂)

Η μέθοδος αυτή βασίζεται στη χρήση διοξειδίου του άνθρακα (CO₂) ως υπερκρίσιμου ρευστού. Η προκατεργασία σε υπερκρίσιμες συνθήκες μπορεί να απομακρύνει αποτελεσματικά τη λιγνίνη, αυξάνοντας την ικανότητα διάσπασης του υποστρώματος. Σε υδατικά διαλύματα, το CO₂ σχηματίζει ανθρακικό οξύ (H₂CO₃), το οποίο ευνοεί το στάδιο της υδρόλυσης, ενώ η προσθήκη διαλυτών, όπως η αιθανόλη, ευνοεί την απολιγνινοποίηση του υλικού. Η διαδικασία γίνεται υπό συνθήκες υψηλής πίεσης και μετά την εκτονωτική αποσυμπίεση του CO₂, παρατηρείται αλλαγή στη δομή της κυτταρίνης και της ημικυτταρίνης και, κατά συνέπεια, αύξηση της ενεργής επιφάνειας του υποστρώματος. Τα μόρια του CO₂ έχουν παρόμοιο μέγεθος με αυτά του νερού και της αμμωνίας, και μπορούν να διεισδύσουν με τον ίδιο τρόπο στους μικρούς πόρους του υλικού. Οι αποδόσεις των ανακτώμενων σακχάρων με τη μέθοδο της έκρηξης CO₂ είναι μικρότερες σε σχέση με τις αποδόσεις των μεθόδων εκτόνωσης ατμού ή αμμωνίας. Μία σύγκριση, όμως, μεταξύ διαφορετικών μεθόδων προκατεργασίας σε διάφορα υποστρώματα, έδειξε ότι η έκρηξη CO₂ είναι οικονομικά πιο αποδοτική από την προκατεργασία με εκτόνωση αμμωνίας και σχηματίζει λιγότερους παρεμποδιστές σε σχέση με την προκατεργασία με εκτόνωση ατμού. Πρόκειται για μία ελκυστική εναλλακτική μέθοδο, η οποία βοηθάει στη μείωση του κόστους, αφού το CO₂ παράγεται κατά τη ζύμωση. Άλλα πλεονεκτήματα είναι η μη τοξικότητά του, η μη αναφλεξιμότητά του και η εύκολη ανάκτησή του μετά από εκχύλιση. Παρ' όλα αυτά, η απαίτηση της μεθόδου για υψηλές πιέσεις αποτελεί μειονέκτημα και έτσι οι προσπάθειες για βελτίωσή της δεν εγγυώνται την οικονομική βιωσιμότητά της (Alvira et al., 2010).

Υδροθερμική προκατεργασία

Πρόκειται για μία μέθοδο, η οποία δεν απαιτεί γρήγορη αποσυμπίεση και χρήση καταλύτη ή χημικών. Κατά την υδροθερμική προκατεργασία ασκείται πίεση ώστε να διατηρηθεί το νερό σε υγρή κατάσταση σε υψηλές θερμοκρασίες (160-240 °C) και να μεταβληθεί η δομή της λιγνινοκυτταρίνης. Στόχος της προκατεργασίας είναι η διαλυτοποίηση της ημικυτταρίνης, ώστε να αυξηθεί η προσβασιμότητα της κυτταρίνης και να αποφευχθεί ο σχηματισμός παρεμποδιστών. Ο πολτός που παραλαμβάνεται μετά την προκατεργασία μπορεί να φιλτραρισθεί, ώστε να ληφθούν δύο κλάσματα: ένα στερεό, πλούσιο σε κυτταρίνη και ένα υγρό, πλούσιο σε σάκχαρα προερχόμενα από ημικυτταρίνη. Για την αποφυγή σχηματισμού παρεμποδιστών, το pH πρέπει να διατηρείται σε τιμές μεταξύ 4 και 7. Έχει αποδειχθεί ότι με τη μέθοδο αυτή απομακρύνεται έως και το 80% της ημικυτταρίνης και ενισχύεται η ενζυμική υδρόλυση του υλικού. Γενικά, η υδροθερμική προκατεργασία είναι μία ελκυστική διεργασία λόγω του χαμηλού της κόστους. Πιο συγκεκριμένα, δεν απαιτείται χρήση καταλύτη και χρησιμοποιείται αντιδραστήρας χαμηλού κόστους κατασκευής, αφού δεν υπάρχει παρά πολύ μικρή πιθανότητα διάβρωσής του. Έχει, επίσης, το μεγάλο πλεονέκτημα ότι τα διαλυτοποιημένα προϊόντα της ημικυτταρίνης και της κυτταρίνης βρίσκονται σε χαμηλή συγκέντρωση. Αυτό έχει ως συνέπεια τη χαμηλή συγκέντρωση των προϊόντων αποικοδόμησης. Η υδροθερμική προκατεργασία οδηγεί σε μεγαλύτερη ανάκτηση πεντοζών και σχηματισμό λιγότερων παρεμποδιστών σε σχέση με την προκατεργασία με εκτόνωση ατμού. Παρ' όλα αυτά, απαιτεί μεγαλύτερη ποσότητα νερού και περισσότερη ενέργεια. Για το λόγο αυτό, η μέθοδος αυτή δεν εφαρμόζεται σε βιομηχανική κλίμακα (*Alvira et al. , 2010*).

Προκατεργασία με μικροκύματα και χημικά αντιδραστήρια

Η προκατεργασία με μικροκύματα περιλαμβάνει τόσο θερμικά όσο και μη θερμικά φαινόμενα. Η βιομάζα εμβαπτίζεται σε αραιά χημικά αντιδραστήρια και στη συνέχεια ακτινοβολείται με μικροκύματα για ένα χρονικό διάστημα που κυμαίνεται από 5 έως 20 λεπτά. Πειραματικά αποδείχθηκε ότι κατάλληλα χημικά αντιδραστήρια για προκατεργασία με μικροκύματα είναι τα αλκάλια. Πιο συγκεκριμένα, η μελέτη διαφορετικών αλκαλίων κατέδειξε το υδροξείδιο του νατρίου (NaOH) ως το πιο αποτελεσματικό (*Alvira et al. , 2010*).

4.2.3 Χημικές μέθοδοι προκατεργασίας

Αλκαλική προκατεργασία

Η μέθοδος αυτή αφορά στη χρήση αλκαλικών διαλυμάτων, όπως το υδροξείδιο του νατρίου (NaOH), το υδροξείδιο του ασβεστίου (Ca(OH)₂) ή η αμμωνία (NH₃) για την απομάκρυνση της λιγνίνης και ενός μέρους της ημικυτταρίνης, με σκοπό την αύξηση της προσβασιμότητας του υδρολυτικού ενζύμου στην κυτταρίνη. Η αλκαλική προκατεργασία μπορεί να οδηγήσει σε πολλαπλασιασμό της απόδοσης σακχαροποίησης (Taherzadeh and Karimi, 2008).

Προκατεργασία με αλκαλικό υπεροξείδιο του υδρογόνου (H₂O₂)

Πρόκειται για μία πολύ αποτελεσματική μέθοδο στην προκατεργασία βιομάζας, κατά την οποία η λιγνινοκυτταρίνη εμποτίζεται σε νερό, το οποίο περιέχει H₂O₂ σε θερμοκρασία δωματίου για ορισμένο χρονικό διάστημα (6-24 ώρες). Το pH του νερού έχει προηγουμένως ρυθμιστεί σε τιμή 11-12 χρησιμοποιώντας NaOH. Η διαδικασία αυτή μπορεί να βελτιώσει την ενζυμική υδρόλυση με απομάκρυνση της λιγνίνης (Taherzadeh and Karimi, 2008).

Προκατεργασία με οργανικούς διαλύτες

Η συγκεκριμένη μέθοδος χρησιμοποιεί οργανικούς διαλύτες ή μείγματα νερού με οργανικούς διαλύτες για να απομακρυνθεί ή να διασπαστεί το δίκτυο της λιγνίνης και πιθανόν ένα μέρος της ημικυτταρίνης. Έτσι, παρέχει κατεργασμένη κυτταρίνη, κατάλληλη για ενζυμική υδρόλυση (Taherzadeh and Karimi, 2008).

Υγρή προκατεργασία οξειδωσης

Η υγρή προκατεργασία οξειδωσης περιλαμβάνει την κατεργασία της βιομάζας με νερό και αέρα, ή και καθαρό οξυγόνο, σε θερμοκρασίες μεγαλύτερες από 120 °C, μερικές φορές με την προσθήκη ενός αλκαλικού καταλύτη. Μία συνηθισμένη συνθήκη προκατεργασίας υγρής οξειδωσης περιλαμβάνει την κατεργασία της βιομάζας σε θερμοκρασίες από 170 °C έως 200 °C και σε πιέσεις από 10 έως 12 bar οξυγόνου για 10 έως 15 min. Η μέθοδος αυτή αρμόζει σε υλικά με χαμηλή περιεκτικότητα σε λιγνίνη, μιας και το μεγαλύτερο μέρος αυτής (μέχρι 60-70%) οξειδώνεται και διαλυτοποιείται (Χριστακόπουλος και Τόπακας, 2014).

Προκατεργασία με οξύ

Η κατεργασία με οξύ μπορεί να βελτιώσει αποτελεσματικά την ενζυμική υδρόλυση. Συνήθως χρησιμοποιείται το θειικό οξύ, ενώ έχουν αναφερθεί και άλλα οξέα, όπως το υδροχλωρικό και το νιτρικό. Η μέθοδος αυτή μπορεί να εφαρμοστεί είτε υπό συνθήκες υψηλής θερμοκρασίας και χαμηλής συγκέντρωσης οξέος είτε υπό συνθήκες χαμηλής θερμοκρασίας και υψηλής συγκέντρωσης οξέος. Η προκατεργασία με πυκνό οξύ σε χαμηλή θερμοκρασία πλεονεκτεί έναντι εκείνης με αραιό οξύ. Παρ' όλα αυτά, τα πυκνά οξέα είναι ιδιαίτερα διαβρωτικά και επικίνδυνα, και η χρήση τους απαιτεί ειδικές, μη μεταλλικές κατασκευές, γεγονός που καθιστά τη διαδικασία δαπανηρή. Η κατεργασία με αραιό οξύ είναι η πιο συχνά χρησιμοποιούμενη μέθοδος μεταξύ των χημικών μεθόδων προκατεργασίας. Μπορεί να εφαρμοστεί είτε ως προκατεργασία της λιγνινοκυτταρίνης πριν την ενζυμική υδρόλυση είτε ως μέθοδος υδρόλυσης, αυτή καθ' εαυτή, των ζυμώσιμων σακχάρων. Με τη μέθοδο αυτή, η ημικυτταρίνη διαλυτοποιείται, αυξάνοντας, έτσι, την επιδεκτικότητα της κυτταρίνης στην ενζυμική υδρόλυση. Η προκατεργασία με αραιό οξύ μπορεί να πραγματοποιηθεί σε υψηλή θερμοκρασία (π.χ. 180 °C) για μικρό χρονικό διάστημα (π.χ. 5 min) ή σε χαμηλή θερμοκρασία (π.χ. 120 °C) για σχετικά μεγάλο χρονικό διάστημα (π.χ. 30-90 min). Το μεγαλύτερο ποσοστό ανάκτησης ημικυτταρίνης και η υψηλότερη απόδοση ενζυμικής υδρόλυσης επιτυγχάνονται υπό πολύ διαφορετικές συνθήκες. Το κύριο μειονέκτημα ορισμένων μεθόδων προκατεργασίας, ιδιαίτερα αυτών που διεξάγονται σε χαμηλές τιμές pH, είναι ο σχηματισμός διάφορων ειδών αναστολέων, όπως καρβοξυλικά οξέα, φουράνια και φαινολικές ενώσεις. Αυτές οι χημικές ουσίες δεν επηρεάζουν την ενζυμική υδρόλυση, αλλά συνήθως αναστέλλουν την μικροβιακή ανάπτυξη και ζύμωση, γεγονός που οδηγεί σε μικρότερη απόδοση και παραγωγή αιθανόλης. Ως εκ τούτου, οι προκατεργασίες σε χαμηλές τιμές pH πρέπει να επιλέγονται κατάλληλα, έτσι ώστε να αποφεύγεται ή τουλάχιστον να μειώνεται ο σχηματισμός αυτών των αναστολέων (Tahezadeh and Karimi, 2008).

Προκατεργασία με οζονόλυση

Πρόκειται για κατεργασία της πρώτης ύλης με όζον. Η μέθοδος αυτή μπορεί να αποικοδομήσει αποτελεσματικά τη λιγνίνη και ένα μέρος της ημικυτταρίνης. Οι κύριες παράμετροι της προκατεργασίας με οζονόλυση είναι η περιεκτικότητα του δείγματος σε υγρασία, το μέγεθος των σωματιδίων και η συγκέντρωση του όζοντος. Μεταξύ αυτών των παραμέτρων, το ποσοστό του νερού στην τροφοδοσία παίζει τον πιο σημαντικό ρόλο στη διαλυτοποίηση. Η βέλτιστη περιεκτικότητα νερού βρέθηκε ότι είναι περίπου 30%, ποσοστό που αντιστοιχεί στο σημείο κορεσμού των ινών. Συνήθως διεξάγεται σε θερμοκρασία δωματίου και πίεση 1 atm. Η μέθοδος αυτή

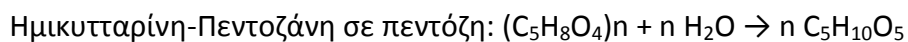
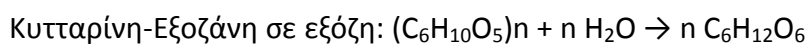
είναι πολύ ελκυστική, διότι δεν αφήνει όξινα, βασικά ή τοξικά υπολείμματα στο κατεργασμένο υλικό και δεν οδηγεί στην παραγωγή ανασταλτικών ενώσεων. Παρ' όλα αυτά, η οζονόλυση μπορεί να είναι δαπανηρή διαδικασία, αφού απαιτείται μεγάλη ποσότητα όζοντος (Taherzadeh and Karimi, 2008).

4.2.4 Βιολογικές μέθοδοι προκατεργασίας

Στις βιολογικές προκατεργασίες χρησιμοποιούνται μικροοργανισμοί, όπως οι βασιδιομύκητες, οι οποίοι μπορούν να αποικοδομήσουν τη λιγνίνη. Οι μέθοδοι αυτές θεωρούνται φιλικές προς το περιβάλλον και ενεργειακά οικονομικές, καθώς δεν απαιτούν υψηλές θερμοκρασίες και χρήση χημικών. Όμως, ο ρυθμός κατεργασίας των βιολογικών μεθόδων είναι πολύ χαμηλός ώστε να εφαρμοστούν σε βιομηχανική κλίμακα και ένα μέρος της πρώτης ύλης χάνεται, λόγω της κατανάλωσής της από τους μικροοργανισμούς (Δόγαρης, 2009).

5. Υδρόλυση

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



(Χριστακόπουλος και Τόπακας, 2014).

Οι παραπάνω αντιδράσεις καταλύονται από αραιό οξύ, πυκνό οξύ ή ένζυμα. Η ενζυμική υδρόλυση παρουσιάζει πολλά πλεονεκτήματα, καθώς, λόγω των πολύ ήπιων συνθηκών, στις οποίες πραγματοποιείται, ($pH \approx 4,8$ και θερμοκρασία 45-50 οC) δίνει υψηλές αποδόσεις. Επιπλέον, το κόστος συντήρησης είναι χαμηλό σε σχέση με την αλκαλική και την όξινη υδρόλυση, αφού δεν αντιμετωπίζονται προβλήματα διάβρωσης. Υδρόλυση υλικού, το οποίο δεν έχει υποστεί προκατεργασία, δίνει, συνήθως, αποδόσεις μικρότερες από 20%, ενώ υδρόλυση υλικού, που έχει υποστεί προκατεργασία, μπορεί να δώσει αποδόσεις μεγαλύτερες από 90%. Με την πάροδο των χρόνων, έχουν αναπτυχθεί πολλές διεργασίες υδρόλυσης της κυτταρίνης προς σχηματισμό γλυκόζης. Η συντριπτική πλειοψηφία αυτών χρησιμοποιεί είτε κυτταρινολυτικά ένζυμα είτε θειικό οξύ σε διάφορες συγκεντρώσεις. Ανέκαθεν, τα ένζυμα ήταν πάρα πολύ ακριβά για μία οικονομικά αποδοτική διεργασία παραγωγής βιοαιθανόλης. Όμως, ένα πολύ σημαντικό μειονέκτημα της χρήσης θειικού οξέος είναι ότι, στις υψηλές θερμοκρασίες που απαιτούνται για την υδρόλυση της κυτταρίνης, διασπά εύκολα και τη γλυκόζη. Η

πλούσια σε λιγνινοκυτταρινούχα υλικά βιομάζα μπορεί να υδρολυθεί με τη βοήθεια ακτίνων γάμμα, δέσμης ηλεκτρονίων ή μικροκυμάτων. Πρόκειται, όμως, για μία πιο πολύπλοκη διαδικασία, λόγω της παρουσίας λιγνίνης και ημικυτταρίνης (Balat et al. , 2008).

5.1 Όξινη υδρόλυση

Έρευνες έχουν δείξει ότι η όξινη υδρόλυση, υπό ελεγχόμενες συνθήκες, παράγει κυρίως ξυλόζη από ξυλάνη, που είναι το βασικό πολυμερές της ημικυτταρίνης, ενώ τα κλάσματα της κυτταρίνης και της λιγνίνης παραμένουν αναλλοίωτα. Η ξυλάνη είναι επιδεκτική στην υδρόλυση με ήπια κατεργασία με οξύ, λόγω της άμορφης δομής της. Αντίθετα, η κυτταρίνη, λόγω της κρυσταλλικής της φύσης, απαιτεί έντονες συνθήκες κατεργασίας. Κατά τη διάρκεια της όξινης υδρόλυσης, η ξυλόζη διασπάται γρήγορα σε φουρφουράλη και άλλα παραπροϊόντα, τα οποία αναστέλλουν τη δράση των μικροοργανισμών. Οι πιο συχνά χρησιμοποιούμενες μέθοδοι υδρόλυσης είναι η υδρόλυση με αραιό οξύ και η υδρόλυση με πυκνό οξύ (Balat et al. , 2008).

5.1.1 Υδρόλυση με αραιό οξύ

Πρόκειται για την πιο παλαιά μέθοδο μετατροπής βιομάζας σε αιθανόλη. Η μέθοδος πραγματοποιείται σε δύο στάδια, καθώς το κλάσμα της ημικυτταρίνης αποπολυμερίζεται σε χαμηλότερη θερμοκρασία από το κλάσμα της κυτταρίνης. Το πρώτο στάδιο γίνεται σε χαμηλή θερμοκρασία, ώστε να μεγιστοποιηθεί η απόδοση από την ημικυτταρίνη, ενώ το δεύτερο σε υψηλότερη θερμοκρασία, ώστε να βελτιστοποιηθεί η υδρόλυση της κυτταρίνης. Το μεγαλύτερο πλεονέκτημα της υδρόλυσης με αραιό οξύ είναι ο γρήγορος ρυθμός αντίδρασης, ενώ το μεγαλύτερο μειονέκτημά της είναι η χαμηλή απόδοση σε σάκχαρα (Balat et al. , 2008).

5.1.2 Υδρόλυση με πυκνό οξύ

Η υδρόλυση με πυκνό οξύ παρέχει ολοκληρωμένη και ταχεία μετατροπή της κυτταρίνης σε γλυκόζη και της ημικυτταρίνης σε πεντόζες. Για να είναι η διαδικασία οικονομικά βιώσιμη, απαραίτητη είναι η βελτιστοποίηση της ανάκτησης σακχάρων και η ανάκτηση του οξέος για επαναχρησιμοποίηση. Οι χαμηλές θερμοκρασίες και πιέσεις οδηγούν στην ελαχιστοποίηση της αποικοδόμησης των σακχάρων. Το κύριο πλεονέκτημα της υδρόλυσης με πυκνό οξύ είναι το υψηλό ποσοστό ανάκτησης προϊόντος. Όμως, το πυκνό θειικό ή υδροχλωρικό οξύ είναι δύσκολα στη χρήση,

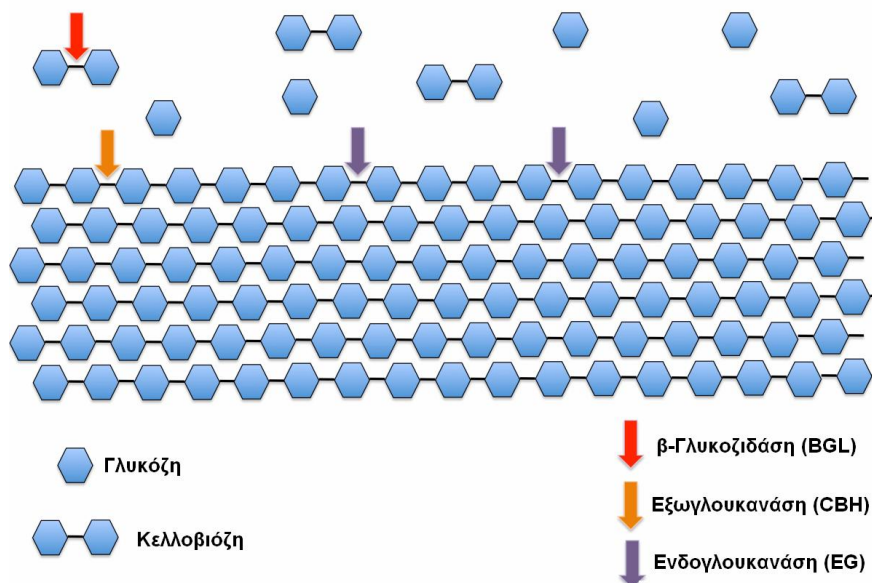
καθώς όλη η ποσότητα οξέος πρέπει να ανακτηθεί και να συμπυκνωθεί για να είναι η διεργασία οικονομικά αποδοτική (Balat et al. , 2008).

5.2 Ενζυμική υδρόλυση

Η ενζυμική υδρόλυση των διατροφικών απορριμμάτων είναι μία πολύ αργή διαδικασία γιατί η υδρόλυση της κυτταρίνης παρεμποδίζεται από δομικές παραμέτρους του υποστρώματος, όπως το περιεχόμενό του σε λιγνίνη και ημικυτταρίνη, η επιφάνεια επαφής και η κρυσταλλικότητα της κυτταρίνης. Είναι μία ελκυστική διεργασία, διότι δίνει καλύτερες αποδόσεις σε σχέση με την καταλυόμενη από οξύ υδρόλυση. Επιπλέον, οι κατασκευαστές ενζύμων έχουν μειώσει σημαντικά το κόστος τους, χρησιμοποιώντας σύγχρονες μεθόδους βιοτεχνολογίας. Κατά την ενζυμική υδρόλυση της κυτταρίνης, η καταλυτική δράση του μείγματος κυτταρινασών περιορίζεται από πολλούς παράγοντες. Θεωρείται ότι οι περιορισμοί αυτοί αφείλονται σε παράγοντες, οι οποίοι σχετίζονται τόσο με το υπόστρωμα όσο και με τα ένζυμα. Ο ρυθμός της ενζυμικής υδρόλυσης της κυτταρίνης μειώνεται σχετικά γρήγορα. Γενικά, η ενζυμική αποικοδόμηση της κυτταρίνης χαρακτηρίζεται από μία ταχεία αρχική φάση, η οποία ακολουθείται από μία βραδεία δευτερεύουσα φάση, που μπορεί να διαρκέσει έως ότου καταναλωθεί όλο το υπόστρωμα. Αυτό οφείλεται συνήθως στη γρήγορη υδρόλυση του εύκολα προσβάσιμου κλάσματος της κυτταρίνης, στην αναστολή του προϊόντος και στην αργή απενεργοποίηση των μορίων του ενζύμου που απορροφώνται (Balat et al. , 2008).

Ο ευρέως αποδεκτός μηχανισμός της ενζυμικής υδρόλυσης της κυτταρίνης περιλαμβάνει τρεις συνεργιστικές ενζυμικές δράσεις (Εικόνα Α7):

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



Εικόνα Α7: Συνεργιστική δράση κυτταρινασών.

Αρχικά, η ενδογλουκανάση δρα τυχαία στις άμορφες περιοχές της κυτταρινικής αλυσίδας, δημιουργώντας νέα «ελεύθερα άκρα», όπου μπορεί να δράσει η εξωγλουκανάση, απελευθερώνοντας μόρια κελλοβιόζης. Η κελλοβιόζη, τελικά, υδρολύεται σε γλυκόζη με τη δράση της β-γλυκοζιδάσης. Η δράση της β γλυκοζιδάσης είναι πολύ σημαντική, καθώς η κελλοβιόζη είναι πολύ ισχυρότερος παρεμποδιστής της εξωγλουκανάσης από την γλυκόζη. Η συσσώρευση της κελλοβιόζης μπορεί να επηρεάσει αρνητικά τη συνολική υδρολυτική απόδοση του συστήματος των κυτταρινασών (Balat et al. , 2008 και Χριστακόπουλος και Τόπακας, 2014). Για την αποτελεσματική αξιοποίηση του υλικού, όμως, απαιτείται η αποικοδόμηση τόσο της κυτταρίνης όσο και της ημικυτταρίνης. Η ξυλάνη, υδρολύεται σε ξυλο-ολιγοσακχαρίτες από ενδο-β-1,4-ξυλανάσες και στη συνέχεια οι β-ξυλοζιδάσες υδρολύουν τους ξυλο-ολιγοσακχαρίτες (κυρίως την ξυλοβιόζη) σε μόρια ξυλόζης. Άλλα ένζυμα που συνεισφέρουν στην αποικοδόμηση της ημικυτταρίνης είναι οι α-γλυκουρονοζιδάσες, οι α-L-αραβινοφουρανοζιδάσες, οι ακετυλ-εστεράσες και οι εστεράσες του φερουλικού οξέος. Η αποικοδόμηση των γλυκομαννάνων γίνεται από β-μαννανάσες και β-μαννοζιδάσες (Δόγαρης, 2009).

Με την προσθήκη αμυλολυτικών ενζύμων επιτυγχάνεται και υδρόλυση του περιεχόμενου στο υπόστρωμα αμύλου . Η υδρόλυση του αμύλου αυξάνει την περιεκτικότητα σε ζυμώσιμα σάκχαρα και ως εκ τούτου και την τελική παραγωγή αιθανόλης. Τα αμυλολυτικά ένζυμα λειτουργούν με δύο διαφορετικούς τρόπους. Οι α- αμυλάση χαρακτηρίζεται ως ενδο-υδρολάση επειδή δρα επί το πλείστον στους εσωτερικούς γλυκοζιτικούς δεσμούς παρά στα άκρα του υποστρώματος. Καθώς το σημείο του δεσμού δεν είναι καθορισμένο, από την υδρολυτική της δράση

παράγεται μίγμα προϊόντων. Όλες οι άλλες αμυλάσες (β-αμυλάση, γλυκοαμυλάση κ.α.) χαρακτηρίζονται ως εξω-υδρολάσες εφόσον αντιδρούν με τα άκρα του υποστρώματος, σε συγκεκριμένο σημείο, παράγοντας καθορισμένο προϊόν. Η διαφορά που παρατηρείται στα παραγόμενα προϊόντα είναι συνάρτηση της δομής του ενεργού κέντρου του κάθε ενζύμου. Στα ενδοένζυμα, το άμυλο τοποθετείται σε διάφορες θέσεις και έτσι κόβονται δεσμοί σε διάφορες θέσεις. Η αντίδραση όμως ακολουθεί συγκεκριμένα μοτίβα (*Chang Rupp and Schwartz, 1988*). Αντιθέτως, στα εξωένζυμα το υπόστρωμα τοποθετείται με ορισμένη διεύθυνση με αποτέλεσμα την παραγωγή ενός προϊόντος. Πέρα από τη σημαντική διαφορά του τρόπου λειτουργίας, όλες οι αμυλάσες αντιμετωπίζονται σαν μία ενότητα λόγω του ότι δρουν στα ίδια υποστρώματα και συνήθως χρησιμοποιούνται στις ίδιες βιομηχανικές διεργασίες (*Schomburg and Salzmann, 1991*).

A-αμυλάση

Η α-αμυλάση αποτελεί ενδοένζυμο και παράγει ολιγοσακχαρίτες με α- διαμόρφωση υδρολύοντας τον α-(1,4) γλυκοζιτικό δεσμό σε αμυλόζη, αμυλοπηκτίνη και γλυκογόνο. Αν και δεν δύναται να διασπάσει α-(1,6) γλυκοζιτικού δεσμού, μπορεί να τους προσπεράσει με αποτέλεσμα την παραγωγή διακλαδισμένων δεξτρινών. Δρα σε εσωτερικούς δεσμούς του υποστρώματος με προτίμηση αυτούς που βρίσκονται κοντά στα άκρα και είναι πιο δραστική σε μακριές παρά σε κοντές αλυσίδες (*Dordick, 1991*). Η δράση της όμως δεν είναι αποκλειστικά επιφανειακή. Με το που σχηματίζονται μεγάλοι πόροι στην επιφάνεια του κόκκου η υδρόλυση συνεχίζεται και στο εσωτερικό. Μελέτες με α-αμυλάση από *B. licheniformis* έδειξαν ότι η υδρόλυση αρχίζει με την προσρόφηση της αμυλάσης στον αμυλόκοκκο (*Helbert et al. , 1996*). Στα σημεία αυτά ξεκινά η υδρόλυση και συνεχίζεται ακτινικά σχηματίζοντας πόρους. Οι πόροι αυτοί εμποδίζουν την ελεύθερη διάχυση του ενζύμου έξω από τον κόκκο και σχηματίζονται κανάλια τα οποία καταλήγουν στο κέντρο του κόκκου. Τα ένζυμα βρίσκονται πλέον παγιδευμένα στο εσωτερικό του κόκκου όπου και συνεχίζουν την υδρόλυση με φυγόκεντρη κατεύθυνση έχοντας ως αποτέλεσμα την πλήρη αποικοδόμηση του ευπρόσβλητου από το ένζυμο πυρήνα (*Helbert et al. , 1996 , Textor et al. , 1998*).

Γλυκοαμυλάση

Η γλυκοαμυλάση [α -(1,4)-glucan glucanohydrolase, EC 3.2.1.3] σαν ενδοένζυμο υδρολύει κατ'αρχή α-(1,4) γλυκοζιτικούς δεσμούς στο μη ανάγον άκρο αμυλόζης και αμυλοπηκτίνης παράγοντας β-D-γλυκόζη (*Schomburg and Salzmann, 1991*). Σε αντίθεση με την α- αμυλάση αντιστρέφει την διαμόρφωση του δεσμού από α σε β

και έχει τη δυνατότητα υδρόλυσης των α -(1,6), α -(1,3), α -(1,2) και α,β -(1,1) γλυκοζιτικών δεσμών, σε αργότερους όμως ρυθμούς από του α -(1,4) (Dordick, 1991). Η ιδιότητά της να υδρολύει α -(1,6) γλυκοζιτικούς δεσμούς, έστω και σε πολύ μικρότερη ταχύτητα, καθώς και υψηλή της εξειδίκευση, την καθιστούν πολύτιμη στη βιομηχανική παραγωγή γλυκόζης από άμυλο. Η ταχύτητα υδρόλυσης 1,6 δεσμών είναι συνάρτηση της συγκέντρωσης του υποστρώματος καθώς η παρουσία διακλαδώσεων παρέχει επιπλέον σημεία υδρόλυσης στο ένζυμο αυξανόμενης όμως της συγκέντρωσης του υποστρώματος περιορίζεται η μεταφορά μάζας με αποτέλεσμα τη μείωση της ταχύτητας (Miranda et al. , 1991 , Sanroman et al. , 1996). Από τα τρία στάδια της αντίδρασης υδρόλυσης (προσρόφηση υποστρώματος, υδρόλυση, αποδέσμευση προϊόντων) το στάδιο της αποδέσμευσης των προϊόντων είναι αυτό που επηρεάζει περισσότερο την ταχύτητα της αντίδρασης (Natarajan and Sierks, 1996). Μια άλλη σημαντική ιδιότητα της γλυκοαμυλάσης είναι η δυνατότητα σύνθεσης προϊόντων συμπύκνωσης, τα λεγόμενα προϊόντα αναστροφής. Ως αποτέλεσμα όταν υδρολύονται από γλυκοαμυλάση υψηλές συγκεντρώσεις δεξτρινών δεν επιτυγχάνεται ολοκληρωτική μετατροπή σε γλυκόζη (Meagher and Reilly, 1989). Η παραγωγή αυτών των προϊόντων μειώνει το βαθμό μετατροπής του αμύλου σε γλυκόζη σε 95% της θεωρητικής τιμής (Schomburg and Salzmann, 1991). Η εμφάνιση των προϊόντων αναστροφής είναι συνάρτηση κυρίως της συγκέντρωσης της γλυκόζης αλλά και της συγκέντρωσης της γλυκοαμυλάσης (Hamad et al. , 1996). Η γλυκόζη είναι παρεμποδιστής του ενζύμου σε συγκεντρώσεις μεγαλύτερες του 3% (Matsumura et al., 1988, Zanin and Demoraes, 1993). Η παραγωγή σακχάρων, από την υδρόλυση αμύλου, με το συνδυασμό των δύο ενζύμων είναι μεγαλύτερη από το άθροισμα της παραγωγής της α -αμυλάσης και της γλυκοαμυλάσης, όταν χρησιμοποιούνται μόνες , δηλαδή τα ένζυμα λειτουργούν συνεργιστικά . Κατά τη συνεργιστική δράση, η α -αμυλάση υδρολύει τυχαία τα μόρια του υποστρώματος παρέχοντας υπόστρωμα για τη γλυκοαμυλάση (Shevelkova and Sinitsyn, 1991). Οι παραγόμενες όμως δεξτρίνες παραμένουν στην επιφάνεια του αμυλόκοκκου. Η γλυκοαμυλάση υδρολύει τις παραγόμενες δεξτρίνες σε διαλυτά σάκχαρα, τα οποία απομακρύνονται από την επιφάνεια του κόκκου, αποκαλύπτοντας νέους γλυκοζιτικούς δεσμούς στους οποίους δρα η α -αμυλάση και συνεχίζεται το φαινόμενο . Οι παράγοντες που ενισχύουν τη συνεργιστική δράση είναι : 1) η υδρόλυση της μαλτόζης (η οποία παρεμποδίζει την α -αμυλάση) από τη γλυκοαμυλάση, 2) η υδρόλυση των 1,2 και 1,3 δεσμών και 3) η γρήγορη υδρόλυση των θραυσμάτων που παράγονται (Sun and Henson, 1991). Η ταυτόχρονη χρησιμοποίηση α -αμυλάσης και γλυκοαμυλάσης εκτός από την αυξημένη υδρολυτική δράση προσφέρει και έλεγχο του παραγόμενου προϊόντος. Μεταβάλλοντας την αναλογία των δύο ενζύμων μπορούμε να πάρουμε μια ποικιλία προϊόντων, των οποίων η σύσταση μπορεί να είναι μόνο γλυκόζη όταν ο λόγος των ενζύμων βαραίνει από την πλευρά της γλυκοαμυλάσης έως προϊόντα πλούσια σε

μαλτοσακχαρίτες καθώς χρησιμοποιείται περισσότερη α -αμυλάση (Franco et al., 1989).

6. Αλκοολική Ζύμωση

6.1 Διεργασίες Παραγωγής Βιοαιθανόλης

Κατά τη διεργασία παραγωγής αιθανόλης από διατροφικά απορρίμματα, η ενζυμική υδρόλυση και η ζύμωση της γλυκόζης μπορεί να διεξαχθούν ξεχωριστά σε διαφορετικούς αντιδραστήρες, με τεχνολογία SHF (Separate Hydrolysis and Fermentation: διακριτή υδρόλυση και ζύμωση) ή ταυτόχρονα στον ίδιο αντιδραστήρα, με τεχνολογίες SSF (Simultaneous Saccharification and Fermentation: ταυτόχρονη σακχαροποίηση και ζύμωση) και CBP (Consolidated Bioprocess: ενοποιημένη βιοδεργασία) (Χριστακόπουλος και Τόπακας, 2014).

6.1.2 Ταυτόχρονη Σακχαροποίηση και Ζύμωση (SSF)

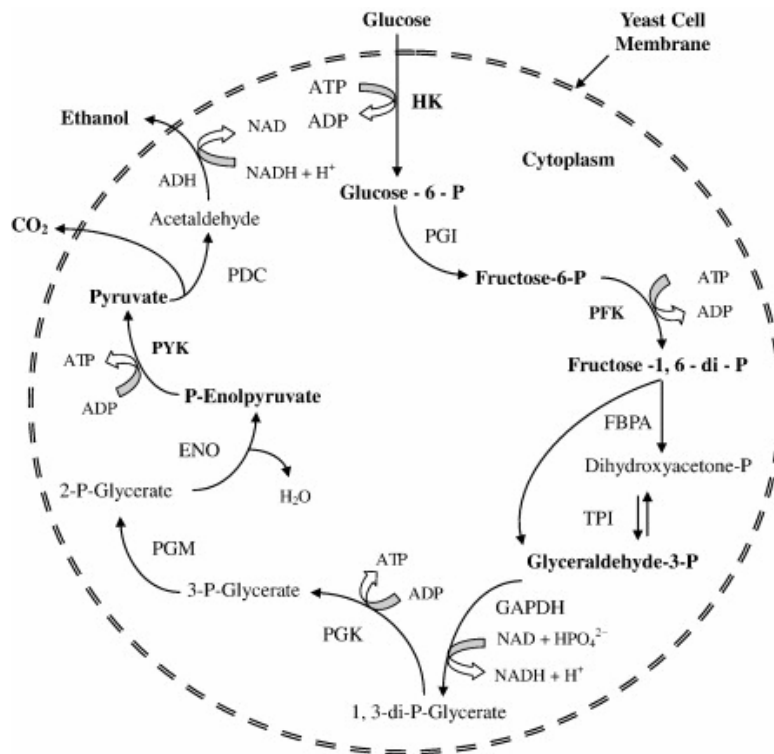
Η διεργασία ταυτόχρονης σακχαροποίησης και ζύμωσης πραγματοποιείται σε έναν αντιδραστήρα, υπό συνθήκες όσο το δυνατόν άριστες τόσο για τα ένζυμα που χρησιμοποιούνται για την υδρόλυση, όσο και για το μικροοργανισμό που χρησιμοποιείται για τη ζύμωση. Τα σάκχαρα που υδρολύονται από τα ένζυμα, μετατρέπονται άμεσα σε αιθανόλη από το μικροοργανισμό της ζύμωσης, διατηρώντας τη συγκέντρωση των σακχάρων στον αντιδραστήρα σε χαμηλά επίπεδα. Η διεργασία αυτή έχει σαν αποτέλεσμα την παραγωγή μεγαλύτερων αποδόσεων παραγωγής αιθανόλης, ενώ απαιτούνται και μικρότερες ποσότητες ενζύμων. Αυτό συμβαίνει διότι η πιθανή παρεμπόδιση από την παραγωγή της γλυκόζης και της κελλοβιόζης, που σχηματίζονται κατά τη διάρκεια της ενζυμικής υδρόλυσης, αντιμετωπίζονται από την άμεση κατανάλωσή τους, κατά τη διάρκεια της ζύμωσης (Χριστακόπουλος και Τόπακας, 2014). Άλλα πλεονεκτήματα της διεργασίας ταυτόχρονης σακχαροποίησης και ζύμωσης είναι οι μικροί χρόνοι διεργασίας, οι χαμηλότερες απαιτήσεις για στείρες συνθήκες, δεδομένου ότι η γλυκόζη μετατρέπεται κατευθείαν σε βιοαιθανόλη, ο μικρότερος όγκος αντιδραστήρα, η λιγότερη κατανάλωση ενέργειας και το χαμηλότερο κόστος παραγωγής, αφού τόσο η υδρόλυση όσο και η ζύμωση γίνονται στην ίδια δεξαμενή (Balat et al. , 2008). Το μεγαλύτερο μειονέκτημα της διεργασίας ταυτόχρονης σακχαροποίησης και ζύμωσης είναι οι διαφορετικές άριστες συνθήκες (κυρίως η θερμοκρασία), που απαιτούνται για την υδρόλυση της κυτταρίνης και για τη ζύμωση. Οι κυτταρινάσες υδρολύουν σε ένα άριστο pH 4-5 και σε θερμοκρασία 40-

50°C, ενώ η ζύμωση των εξοζών πραγματοποιείται περίπου στους 30 °C και σε pH επίσης 4-5 (Χριστακόπουλος και Τόπακας, 2014). Έχει βρεθεί ότι οι βέλτιστες συνθήκες μίας διεργασίας SSF με χρήση ζύμης *Saccharomyces cerevisiae* είναι θερμοκρασία 37°C και pH 4,5 (Balat et al. , 2008). Για την αποτελεσματική ταυτόχρονη σακχαροποίηση και ζύμωση της κυτταρίνης και ημικυτταρίνης, πρέπει να χρησιμοποιηθούν ανασυνδυασμένοι μικροοργανισμοί, οι οποίοι μπορούν να ζυμώσουν τη γλυκόζη, την ξυλόζη και την αραβινόζη (Χριστακόπουλος και Τόπακας, 2014). Η ενζυμική υδρόλυση στη διεργασία ταυτόχρονης σακχαροποίησης και ζύμωσης πραγματοποιείται σε θερμοκρασία μικρότερη της βέλτιστης. Έτσι, η απαιτούμενη ποσότητα του ενζύμου αυξάνεται, καθώς η ενεργότητά του μειώνεται. Για να αντιμετωπιστεί αυτό το πρόβλημα, προτάθηκε μία διεργασία μη ισοθερμοκρασιακής ταυτόχρονης σακχαροποίησης και ζύμωσης (Nonisothermal Simultaneous Saccharification and Fermentation, NSSF). Στη διεργασία αυτή, η σακχαροποίηση και η ζύμωση πραγματοποιούνται ταυτόχρονα, αλλά σε διαφορετικούς αντιδραστήρες και στη βέλτιστη, για την κάθε μία, θερμοκρασία. Η διεργασία NSSF έχει οδηγήσει σε μείωση της συνολικής απαίτησης για ένζυμα κατά 30-40% περίπου. Έχει παρατηρηθεί, ακόμη, ότι η διεργασία NSSF δίνει υψηλότερες αποδόσεις σε αιθανόλη και χρειάζεται λιγότερο συνολικό χρόνο σχέση με την SSF (Tahezadeh and Karimi, 2007).

6.2 Μικροοργανισμοί στην παραγωγή βιοαιθανόλης

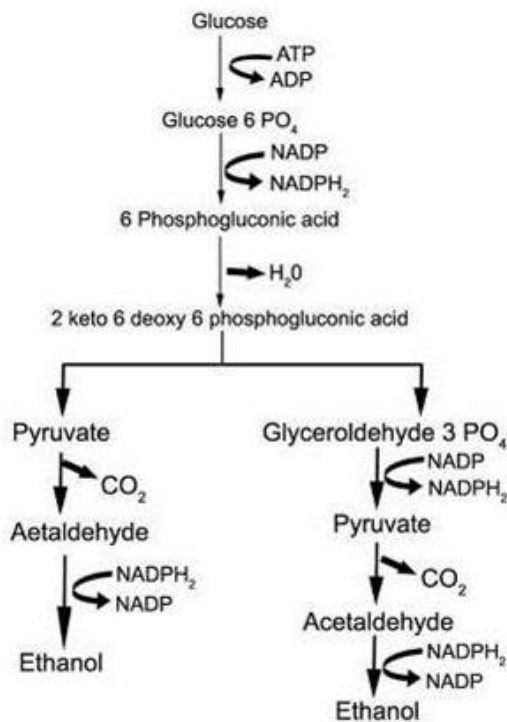
Το στάδιο της βιομετατροπής περιλαμβάνει τη χρήση μικροοργανισμών που μεταβολίζουν τα παραγόμενα από την ενζυμική υδρόλυση ζυμώσιμα σάκχαρα για την ανάπτυξή τους, παράγοντας αιθανόλη, CO₂ και άλλα παραπροϊόντα. Αρκετές μελέτες και αναφορές έχουν δημοσιευτεί για την παραγωγή αιθανόλης από διάφορους μικροοργανισμούς, όπως βακτήρια, ζύμες και μύκητες. Οι γενικές απαιτήσεις ενός μικροοργανισμού για χρήση στην παραγωγή αιθανόλης περιλαμβάνουν τις υψηλές αποδόσεις σε αιθανόλη, την υψηλή παραγωγικότητα και την ανθεκτικότητα σε μεγάλες συγκεντρώσεις αιθανόλης (Δόγαρης, 2009).

Η ζύμη *Saccharomyces cerevisiae* μεταβολίζει τη γλυκόζη σε αιθανόλη, μέσω του μονοπατιού Embden-Meyerhof-Parnas (EMP ή γλυκόλυση). (Εικόνα Α7)



Εικόνα Α7: Μεταβολικό μονοπάτι Embden-Meyerhof-Parnas (EMP).

Ένα διαφορετικό μονοπάτι αφομοίωσης της γλυκόζης είναι το Entner-Doudoroff (ED) (Εικόνα Α8), που αξιοποιείται συνοδευτικά με το EMP από πολλά βακτήρια, όπως του γένους *Zyotomonas*.



Εικόνα Α8: Μεταβολικό μονοπάτι Entner-Doudoroff (ED).

Τα βακτήρια αυτά είναι οι μόνοι μικροοργανισμοί που μεταβολίζουν αναερόβια τη γλυκόζη μέσω του ED μονοπατιού, σε αντίθεση με το EMP. Το μονοπάτι ED αποδίδει μόνο το μισό ποσοστό ATP ανά mol γλυκόζης σε σχέση με το EMP, με αποτέλεσμα τα βακτήρια *Zygomonas* να παράγουν λιγότερη κυτταρική βιομάζα σε σχέση με τη ζύμη και να διοχετεύουν μεγαλύτερο ποσοστό της πηγής άνθρακα προς μεταβολικά προϊόντα. Το βακτήριο *Zygomonas mobilis* είναι ένας μικροοργανισμός, που χρησιμοποιείται στη βιομηχανική παραγωγή αιθανόλης, ο οποίος, λόγω παραγωγής λιγότερης βιομάζας, έχει υψηλότερες αποδόσεις από τις ζύμες, αλλά αναπτύσσεται με πιο αργό ρυθμό (Δόγαρης, 2009). Είναι φανερό ότι σε μία διεργασία παραγωγής αιθανόλης είναι επιθυμητό να χρησιμοποιηθούν όλα τα σάκχαρα που έχουν παραχθεί από την προκατεργασία και την υδρόλυση του υλικού και που κυρίως αποτελούνται από εξόζες και πεντόζες (Χριστακόπουλος και Τόπακας, 2014). Όμως, η ζύμη *S. cerevisiae* και το βακτήριο *Z. mobilis* δε διαθέτουν την ικανότητα μεταβολισμού των πεντοζών. Στη φύση, ορισμένα βακτήρια, μύκητες και κάποιες ζύμες έχουν την ικανότητα να μεταβολίζουν πεντόζες, αλλά με χαμηλή απόδοση σε αιθανόλη. Η χρήση σε μεγάλη κλίμακα ζυμών που μεταβολίζουν πεντόζες (*Pichia stipitis*, *Pachysolen tannophilus* και *Candida shehatae*) παρουσιάζει προβλήματα λόγω της ευαισθησίας τους σε υψηλές συγκεντρώσεις αιθανόλης, της απαίτησης για συγκεκριμένες συνθήκες αερισμού, την υψηλή ευαισθησία σε παρεμποδιστές και την ανικανότητα να ζυμώσουν τις πεντόζες σε χαμηλά pH (Δόγαρης, 2009).

6.2.1 *Saccharomyces cerevisiae*

Η ζύμη *Saccharomyces cerevisiae* έχει εδραιωθεί στην παραγωγή αιθανόλης, μέσω διεργασιών ζύμωσης σακχάρων, καθώς εμφανίζει υψηλές αποδόσεις και παραγωγικότητα, αντοχή σε χαμηλές τιμές pH και ανθεκτικότητα στην αιθανόλη, σε παραπροϊόντα της ζύμωσης και σε άλλες παρεμποδιστικές ενώσεις που είναι παρούσες σε λιγνινοκυτταρινούχα υλικά. Σε αναερόβιες συνθήκες, μετατρέπει 1 mol γλυκόζης σε 2 mol αιθανόλης (Χριστακόπουλος και Τόπακας, 2014, Δόγαρης, 2009). Ο μικροοργανισμός αυτός ζυμώνει όλες τις εξόζες που προέρχονται από την πρώτη ύλη και παράγει αιθανόλη με απόδοση πλησίον της μέγιστης θεωρητικής (0.51 g αιθανόλης ανά g γλυκόζης). Παρ' όλα αυτά, η χρήση του για υποστρώματα πλούσια σε ημικυτταρίνη είναι περιοριστική, αφού, όπως αναφέρθηκε και παραπάνω, δεν μπορεί να ζυμώσει τις πεντόζες, που είναι το κύριο συστατικό σάκχαρο των ημικυτταρινών. Λόγω της έλλειψης στη φύση ενός μικροοργανισμού ικανού να ζυμώνει αποτελεσματικά υποστρώματα πλούσια σε λιγνινοκυτταρινούχα υλικά, έχει δοθεί ιδιαίτερη έμφαση στην "κατασκευή" ενός αποτελεσματικού βιοκαταλύτη μέσω των τεχνικών της μεταβολικής μηχανικής, δηλαδή τεχνικών που έχουν ως στόχο τη βελτίωση της παραγωγής ενός προϊόντος ή των ιδιοτήτων ενός κυττάρου μέσω της τροποποίησης μιας συγκεκριμένης βιοχημικής αντίδρασης ή την

εισαγωγή νέας, με τεχνολογία ανασυνδυασμένου DNA. Χρησιμοποιώντας τέτοιου τύπου τεχνικές, επιχειρήθηκε η εισαγωγή στο φυσικό γονιδίωμα του *S. cerevisiae* των γονιδίων που είναι υπεύθυνα για το μεταβολισμό της ξυλόζης από ευκαρυωτικούς ή προκαρυωτικούς μικροοργανισμούς, τα οποία είναι ικανά να βιομετατρέψουν την ξυλόζη σε αιθανόλη (Χριστακόπουλος και Τόπακας, 2014).

6.2.2 *Zymomonas mobilis*

Ο δεύτερος σημαντικός αιθανολοπαράγωγος μικροοργανισμός, είναι το βακτήριο *Zymomonas mobilis*, ο οποίος χρησιμοποιείται στη βιομηχανία οινοπνευματωδών και έχει την ικανότητα να πραγματοποιεί ζυμώσεις σε pH=5 και θερμοκρασίες μεταξύ 30 °C και 40 °C. Μεταβολίζει τη γλυκόζη μέσω του μονοπατιού Entner-Doudoroff, το οποίο ανά 1 mol γλυκόζης αποδίδει 2 mol πυρασταφυλικού, παράγοντας 1 mol ATP. Για να μπορέσει να επιβιώσει με τόσο μικρή ενεργειακή απόδοση, ο μεταβολισμός του μικροοργανισμού επιταχύνεται τρομερά. Για το λόγο αυτό ο *Z. mobilis*, κατέχει υψηλότερα επίπεδα ενεργότητας γλυκολυτικών και αιθανολοπαράγωγων ενζύμων, με αποτέλεσμα εξαιρετικές αποδόσεις αιθανόλης, που προσεγγίζουν την τιμή της θεωρητικής απόδοσης (0.47 g αιθανόλης ανά g γλυκόζης) και υψηλή ογκομετρική παραγωγικότητα. Ο μικροοργανισμός αυτός δεν έχει τη δυνατότητα να ζυμώνει τις πεντόζες. Έτσι, όπως και για τον *S. cerevisiae*, έχουν εφαρμοστεί στρατηγικές εισαγωγής γονιδίων που ευθύνονται για την αποτελεσματική ζύμωση της ξυλόζης (Χριστακόπουλος και Τόπακας, 2014).

6.2.3 *Escherichia coli*

Ο *Escherichia coli* έχει τη φυσική ικανότητα να καταναλώνει ένα μεγάλο εύρος υποστρωμάτων, μετατρέποντας εξόζες, πεντόζες και ουρονικά οξέα στον κεντρικό μεταβολίτη, το πυροσταφυλικό. Αυτός ο μεταβολίτης μετατρέπεται, ακολούθως, σε ένα μείγμα αποτελούμενο από σχεδόν ίσα μέρη αιθανόλης, οξικού, γαλακτικού και φορμικού οξέος. Κατά κανόνα, οι ζυμώσεις γίνονται σε pH=7 και θερμοκρασίες μεταξύ 30°C και 35°C. Η παρουσία οργανικών οξέων, όπως είναι το οξικό και το γαλακτικό οξύ, στο τελικό ζυμωτικό υλικό ταυτόχρονα με την αιθανόλη, κάνει τη χρησιμοποίηση του *E. coli* μία μη ελκυστική επιλογή για την παραγωγή αιθανόλης. Επιπλέον, οι αποδόσεις παραγωγής αιθανόλης είναι χαμηλότερες από 0.2 g ανά g σακχάρων (γλυκόζης ή ξυλόζης). Η κύρια στρατηγική για την αύξηση της παραγωγής αιθανόλης από τον *E. coli*, με στόχο να καταστεί κατάλληλος για διεργασίες χρησιμοποίησης λιγνινοκυτταρινούχων υλικών σαν πρώτες ύλες για την παραγωγή αιθανόλης, ήταν να στραφούν οι ροές άνθρακα προς την παραγωγή αιθανόλης, σε βάρος εκείνων των ροών που οδηγούσαν στην παραγωγή παραπροϊόντων, όπως το

οξικό και το γαλακτικό. Αυτό επιτεύχθηκε με την εισαγωγή των γονιδίων *pdC* και *adhB* από τον *Z. Mobilis* (Χριστακόπουλος και Τόπακας, 2014).

6.2.4 *Pichia stipitis*

Το ενδιαφέρον για τη ζύμη *Pichia stipitis* ξεκίνησε λόγω της ικανότητας του μικροοργανισμού να μεταβολίζει φυσικά, εκτός από τη γλυκόζη, και την ξυλόζη. Το μειονέκτημα της διεργασίας παραγωγής αιθανόλης από το μικροοργανισμό αυτόν είναι ότι παρεμποδίζεται από τις ουσίες που σχηματίζονται κατά τη διάρκεια της προκατεργασίας και υδρόλυσης των λιγνινοκυτταρινούχων υλικών, καθώς και το γεγονός ότι για το συμμαεταβολισμό της γλυκόζης και της ξυλόζης απαιτούνται μικροαερόβιες συνθήκες. Για μια βιομηχανική ζυμωτική διεργασία παραγωγής αιθανόλης, όπου οι συνθήκες ελέγχου του αερισμού είναι δύσκολες, είναι επιθυμητή η αναερόβια παραγωγή αιθανόλης. Η στρατηγική απου ακολουθήθηκε ήταν η εισαγωγή του γονιδίου *URA1* από τον *S. Cerevisiae*. Έτσι, η ανασυνδυασμένη ζύμη μπόρεσε να αναπτυχθεί αναερόβια μεταβολίζοντας τη γλυκόζη και την ξυλόζη (Χριστακόπουλος και Τόπακας, 2014).

6.3 Παραπροϊόντα της αλκοολικής ζύμωσης

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

- *Μεθανόλη*: Δεν προέρχεται από το μηχανισμό της αλκοολικής ζύμωσης, αλλά παράγεται από την απομεθυλίωση των ηηκτινών που περιέχονται στο υπόστρωμα.
- *Ανώτερες αλκοόλες*: Οι κυριότερες ανώτερες αλκοόλες είναι οι προπανόλη-1, βουτανόλη-1, βουτανόλη-2, 2-μεθυλοπροπανόλη-1, 2-μεθυλοβουτανόλη-1, πεντανόλη-1 και εξανόλη-1. Παράγονται κατά την απαμίνωση των ελεύθερων αμινοξέων, αλλά και των αμινοξέων που προκύπτουν από την πρωτεολυτική διάσπαση των πρωτεϊνών της ζύμης και του υποστρώματος.
- *Γλυκερόλη*: Είναι ενδιάμεσο προϊόν της αλκοολικής ζύμωσης. Ο σχηματισμός της ευνοείται από χαμηλές θερμοκρασίες, υψηλή περιεκτικότητα σε τρυγικό οξύ και από την προσθήκη SO_2 .
- *Ακεταλδεΐδη*: Είναι ενδιάμεσο προϊόν της αλκοολικής ζύμωσης που προκύπτει, από την αποκαρβοξυλίωση του πυροσταφυλικού οξέος. Αν προστεθεί $NaHSO_3$ και SO_2 στο σακχαρούχο υπόστρωμα πριν τη ζύμωση ή κατά την διάρκεια της, η παραγόμενη ακεταλδεΐδη σχηματίζει προϊόν προσθήκης και έτσι δεν ανάγεται περαιτέρω προς αιθανόλη.

- *Εστέρες*: Σπουδαιότερος είναι ο οξικός αιθυλεστέρας $\text{CH}_3\text{COOC}_2\text{H}_5$, ο οποίος σχηματίζεται από την αντίδραση του οξικού οξέος με την αιθανόλη.
- *Οξέα*: Κυριότερο είναι το οξικό οξύ, το οποίο παράγεται ως κανονικό προϊόν της αλκοολικής ζύμωσης σε ποσότητες μικρότερες από 300 mg/L. Υψηλά επίπεδα οξικού οξέος, συνήθως σχετίζονται με παρουσία στο εκχύλισμα βακτηρίων του οξικού και του γαλακτικού οξέος.
- *Ακετάλες*: Σχηματίζονται από την αντίδραση της ακεταλδεΐδης με την αιθανόλη (Παπανικολάου, 2006).

6.4 Αναστολείς της αλκοολικής ζύμωσης

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

- *Αιθανόλη*: Το ίδιο το προϊόν δρα σαν αναστολέας σε συγκεκριμένες συγκεντρώσεις. Αλκοολικοί βαθμοί μεγαλύτεροι των 5 αναστέλλουν τον πολλαπλασιασμό ορισμένων ζυμών, ενώ σε βαθμούς μεγαλύτερους των 12 τα περισσότερα κύτταρα θανατώνονται.
- *Φορμαλδεΐδη*: Η HCHO που χρησιμοποιείται με την μορφή φορμόλης ως αντισηπτικό ενάντια στα βακτήρια, υπό ορισμένες συνθήκες αναστέλλει την αλκοολική ζύμωση.
- *Θειώδες οξύ*: Το H_2SO_3 , που χρησιμοποιείται συνήθως για τη θείωση στις οινοδεξαμενές, πρέπει να είναι ελεύθερο αρσενικού, γιατί σε αντίθετη περίπτωση αποτελεί αναστολέα της ζύμωσης.
- *Μέταλλα*: Ορισμένα μέταλλα όπως το Cd, ο Cu, ο Pb, και ο Hg σε ορισμένες συγκεντρώσεις δρουν σαν αναστολείς (Παπανικολάου, 2006).

B. Πειραματικό Μέρος

1. Όργανα

- Φωτόμετρο (Hitachi UV 2000)
- pH-μετρο 537 (WTW, Γερμανία)
- Ηλεκτρονικοί ζυγοί ακριβείας
- microplate reader (SpectraMax 250, Molecular Devices)
- αέριος χρωματογράφος Perkin Elmer 8500
- φούρνος ξήρανσης
- αναλυτικός ζυγός με ακρίβεια 0.1 mg
- ξηραντήρας (με silica gel)
- θερμοστατούμενος περιστροφικός αναδευτήρας (Zhicheng 211C, Κίνα, LABLINE Incubator-Shaker, Η.Π.Α.)
- διάταξη διήθησης υπό κενό
- Vortex
- Φυγόκεντρος

2. Πρώτη ύλη

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

3. Ανάλυση σύστασης της πρώτης ύλης

Προσδιορισμός υγρασίας (NREL/TP-510-42618)

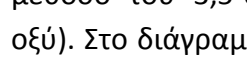
Για τον προσδιορισμό της υγρασίας των διατροφικών απορριμμάτων, τοποθετήθηκε ποσότητα δείγματος σε ξηρά, προζυγισμένα “πιατάκια” αλουμινίου και καταγράφηκε το βάρος του. Στη συνέχεια, τα “πιατάκια” μαζί με το δείγμα τοποθετήθηκαν στο φούρνο ξήρανσης για 16 ώρες σε θερμοκρασία 106 °C. Μετά το πέρας των 16 ωρών, μεταφέρθηκαν σε ξηραντήρα (με silica gel) για τουλάχιστον 30 λεπτά προκειμένου να αποκτήσουν θερμοκρασία περιβάλλοντος χωρίς να επαναπροσλάβουν επιπλέον υγρασία. Τέλος, καταγράφηκε το βάρος των “πιάτων” αλουμινίου μαζί με το ξηρό πλέον δείγμα. Να σημειωθεί ότι ο χειρισμός των “πιάτων” αλουμινίου έγινε με χρήση λαβίδας και η διαδικασία της ξήρανσης στο φούρνο επανελήφθη μέχρι σταθερού βάρους (ο όρος σταθερό βάρος ορίζεται ως η

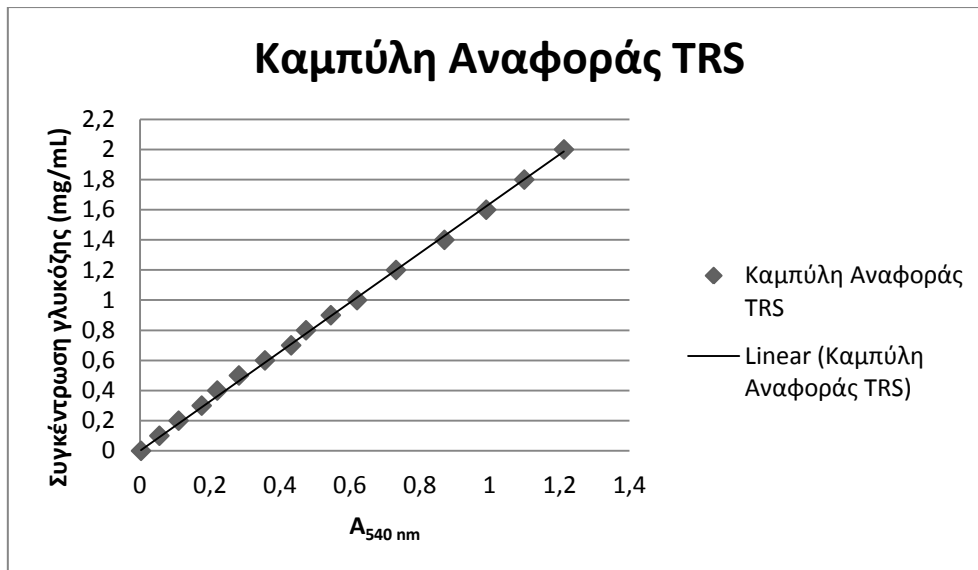
μεταβολή κατά ± 0.1 % στο ποσοστό των στερεών μετά από μία ώρα επαναξήρανση του δείγματος). Επιπλέον, όλες οι ζυγίσεις πραγματοποιήθηκαν σε αναλυτικό ζυγό με ακρίβεια 0.1 mg.

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

Στα υδατοδιαλυτά συστατικά περιλαμβάνονται ανόργανα υλικά, μη δομικά σάκχαρα (γλυκόζη, φρουκτόζη, σακχαρόζη) και αζωτούχα υλικά μεταξύ άλλων. Η απομάκρυνσή τους από το δείγμα είναι απαραίτητη προκειμένου να προληφθεί οποιαδήποτε εμπλοκή με τα επόμενα στάδια ανάλυσης. Σε κωνική φιάλη τύπου Erlenmeyer τοποθετήθηκε κατάλληλη ποσότητα διατροφικών απορριμμάτων μαζί με κατάλληλη ποσότητα απιονισμένου νερού, έτσι ώστε η τελική συγκέντρωση του αιωρήματος να είναι 2.5% (w/v). Η φιάλη πωματίστηκε και τοποθετήθηκε για 1 ώρα σε θερμοστατούμενο αναδευτήρα σε θερμοκρασία 50 °C. Ακολούθησε διήθηση υπό κενό με χρήση ξηρού, προζυγισμένου γυάλινου ηθμού και έκπλυση του στερεού υπολείμματος με απιονισμένο νερό. Το στερεό υπόλειμμα μεταφέρθηκε εκ νέου στη φιάλη τύπου Erlenmeyer με 200 mL απιονισμένου νερού και η διαδικασία επανελήφθη. Ο γυάλινος ηθμός με το στερεό υπόλειμμα υπέστη ξήρανση σε φούρνο και στη συνέχεια αναλύθηκε βάσει της διαδικασίας που περιγράφεται παρακάτω. Τα διηθήματα και τα εκπλύματα συλλέχθηκαν και προσδιορίστηκε η συγκέντρωση των μη δομικών σακχάρων σε αυτά.

Προσδιορισμός αναγωγικών σακχάρων

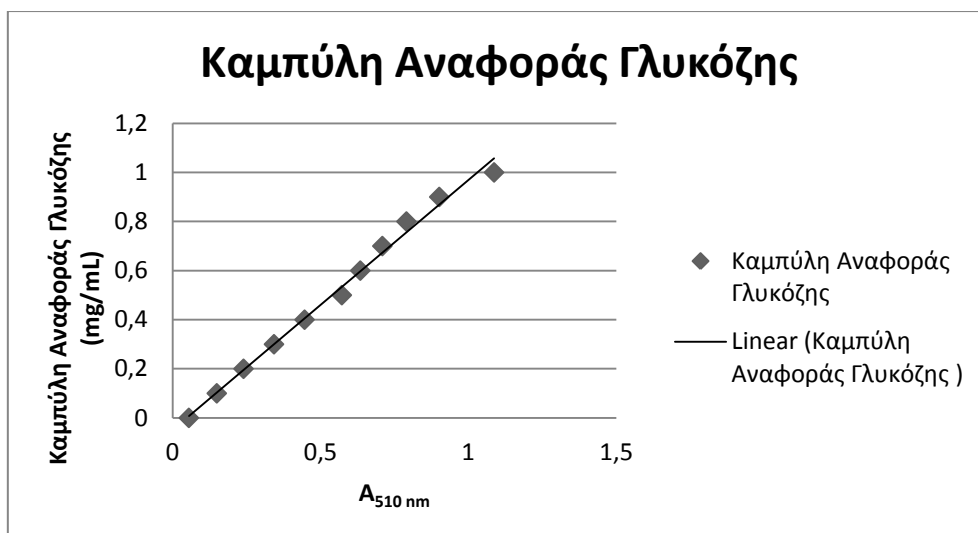
Ο προσδιορισμός των αναγωγικών σακχάρων πραγματοποιείται με τη φωτομετρική μέθοδο του 3,5-δινιτροσαλικυλικού οξέος (DNS ή 2-υδρόξυ-3,5-δινιτροβενζοϊκό οξύ). Στο διάγραμμα , φαίνεται η καμπύλη αναφοράς των αναγωγικών σακχάρων σε ισοδύναμα γλυκόζης. Η εξίσωση της καμπύλης είναι ίση με $y=1,6386 \cdot \text{ABS}_{540}$ ($R^2 = 0,9989$).



Διάγραμμα Β1 Καμπύλη αναφοράς ολικών αναγωγικών σακχάρων σε ισοδύναμα γλυκόζης

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

Η συγκεκριμένη μέθοδος βασίζεται στη μετατροπή της γλυκόζης σε ένα προϊόν ερυθρού χρώματος το οποίο είναι αποτέλεσμα της διαδοχικής δράσης των ενζύμων οξειδάση και υπεροξειδάση της γλυκόζης. Αρχικά, η γλυκόζη με τη δράση της οξειδάσης της γλυκόζης μετατρέπεται σε γλυκονικό οξύ με την ταυτόχρονη παραγωγή υπεροξειδίου του υδρογόνου. Ακολούθως, το υπεροξείδιο του υδρογόνου παρουσία αμινοφαιναζόνης και κάποιου φαινολικού παραγώγου με τη δράση της υπεροξειδάσης μετατρέπεται σε κάποιο προϊόν ερυθρού χρώματος το οποίο παρουσιάζει μέγιστη απορρόφηση στα 510 nm . Ο προσδιορισμός της συγκέντρωσης της γλυκόζης γίνεται με τη βοήθεια microplate reader. Στο διάγραμμα ? , φαίνεται η καμπύλη αναφοράς της γλυκόζης η οποία ισούται με $y=1,0159 \cdot ABS_{510} - 0,0473$ ($R^2=0,9925$) .



Διάγραμμα Β2 Καμπύλη αναφοράς γλυκόζης

Ανάλυση στερεού υπολείμματος

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

Προσδιορισμός στερεού αμύλου

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

Προσδιορισμός διαλυτού αμύλου

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

4. Προκατεργασία

Η δοθείσα πρώτη ύλη προκατεργάστηκε με δύο μεθόδους, μία φυσική και μία φυσικοχημική. Την φυσική προκατεργασία αποτέλεσε η άλεση του υλικού, ενώ η την φυσικοχημική, η υδροθερμική κατεργασία με και χωρίς οξύ. Ύστερα από την άλεση του, το υλικό ξηράνθηκε και αναλύθηκε ως προς την σύσταση του. Μετά την ολοκλήρωση και της ανάλυσης του υλικού, ποσότητα των διατροφικών απορριμμάτων ίση με 6 g, προκατεργάστηκε απουσία και παρουσία θειικού οξέος στους 85°C, 100°C και 120°C για 60 min. Η συγκέντρωση του στερεού ήταν 30% (β/ο) ενώ το προστέθηκε οξύ σε αναλογία 1 g H₂SO₄/100 g ξηρού στερεού. Μετά τη διαδικασία αυτή και ύστερα από φυγοκέντρηση το υπερκείμενο αναλύθηκε ως προς τα ολικά αναγωγικά σάκχαρα, τη γλυκόζη, τη σακχαρόζη και το υδατοδιαλυτό άμυλο. Το στερεό της προκατεργασίας εκπλύθηκε διαδοχικά δύο φορές και στα εκπλύματα έγιναν μετρήσεις για τα ολικά αναγωγικά σάκχαρα και τη γλυκόζη. Παράλληλα, στο στερεό υπόλειμμα ύστερα από ξήρανση μετρήθηκε το άμυλο καθώς και η κυτταρίνη.

5. Ενζυμική Υδρόλυση

Στην φάση αυτή επιλέχθηκε ως θερμοκρασία προκατεργασίας οι 120 °C και σε αυτή έγινε κατεργασία του υλικού για 1 ώρα παρουσία θειικού οξέος. Αρχικά τοποθετήθηκαν 30 φιάλες κάθε μια από τις οποίες περιείχε 6 g υλικού και 20 ml θειικού οξέος. Μετά το πέρας της προκατεργασίας, έγινε διόρθωση του pH στην τιμή 5 με προσθήκη καυστικού νατρίου 1M και κατόπιν στις 14 από τις 28 φιάλες προστέθηκε αυξανόμενη ποσότητα ενζύμου Cellic® CTec2 5,10,20,40,60,80 και 100 FPU / g κυτταρίνης. Πριν την προσθήκη του ενζύμου, από κάθε κωνική φιάλη έγινε δειγματοληψία ούτως ώστε να μετρηθούν τα ολικά αναγωγικά σάκχαρα και η

γλυκόζη. Μετά λοιπόν και την προσθήκη του ενζύμου οι 14 κωνικές με ένζυμο καθώς και οι 14 χωρίς το ένζυμο τοποθετήθηκαν σε επωαστήρα υπό ανάδευση στους 50 °C για 72 ώρες. Από τις φιάλες που περιέχουν το ένζυμο, κάθε 4,8,12,24,48 και 72 ώρες γίνεται δειγματοληψία και ύστερα από φυγοκέντρωση μετρώνται τα ολικά αναγωγικά σάκχαρα και η γλυκόζη. Μετά το πέρας των 72 ωρών, το περιεχόμενο των κωνικών που δεν περιείχαν ένζυμο φυγοκεντρήθηκε και εκπλύθηκε. Στα διηθήματα έγιναν αναλύσεις ολικών αναγωγικών σακχάρων, γλυκόζης, σακχαρόζης και υδατοδιαλυτού αμύλου ενώ στα εκπλύματα ολικών αναγωγικών σακχάρων και γλυκόζης. Στο στερεό μετρήθηκε άμυλο ενώ από την όξινη υδρόλυση προσδιορίστηκε η κυτταρίνη.

6. Ζύμωση

Πραγματοποιήθηκαν τρεις δοκιμές βιομετατροπής των προκατεργασμένων διατροφικών απορριμμάτων προς παραγωγή βιοαιθανόλης με χρήση διαφορετικών συνδυασμών ενζυμικών σκευασμάτων. Τα δείγματα προκαεργάστηκαν για 1 ώρα στους 120 °C παρουσία οξέος. Η βιομετατροπή των διατροφικών απορριμμάτων προσεγγίστηκε με τη μέθοδο της μη ισοθερμοκρασιακής ταυτόχρονης σακχαροποίησης και ζύμωσης (Non Isothermal Simultaneous Saccharification and Fermentation, NSSF). Η πρώτη δοκιμή πραγματοποιήθηκε με προσθήκη κυτταρινολυτικού σκευάσματος Cellic CTec2 5,10,20,40,60,80 και 100 FPU / g κυτταρίνης . Τα δείγματα υδρολύθηκαν για 6 ώρες στους 50 °C . Στη δεύτερη δοκιμή τα δείγματα αρχικά υδρολύθηκαν στους 65 °C για 30 λεπτά με αμυλολυτικό ενζυμικό σκεύασμα Spirizyme 20,40,60,80 και 100 U / g αμύλου και έπειτα για 6 ώρες στους 50 °C με προσθήκη Cellic CTec2 60 FPU / g κυτταρίνης . Τέλος , στη τρίτη δοκιμή αρχικά πραγματοποιήθηκε υδρόλυση με : αμυλολυτικό ενζυμικό σκεύασμα-: Liquozyme 2,65 , 5,3 , 7,95 , 10,6 και 13,25 U/g_{αμύλου} στους 85 °C για 30 λεπτά , ύστερα για άλλα 30 λεπτά υδρόλυση με Spirizyme 80 U / g_{αμύλου} και τέλος με Cellic CTec2 60 FPU / g κυτταρίνης . Μετά το πέρας των υδρολύσεων κάθε δοκιμής προστίθεται 90 mg ξερής μαγιάς Γιώτης και τα δείγματα αφήνονται σε θερμοστατούμενο περιστροφικό αντιδραστήρα (80 rpm) για 72 ώρες. Πραγματοποιήθηκαν δειγματοληψίες κάθε 0 , 8 , 12 , 24 , 48 και 72 ώρες όπου μέσω αέριας χρωματογραφίας μετρήθηκε η παραγόμενη βιοαιθανόλη.

7. Μέτρηση ενζυμικής ενεργότητας α-αμυλάσης

Υπόστρωμα: Παρασκευάζεται διάλυμα 0,1% υδατοδιαλυτού αμύλου (*Stärke löslich zur analyse, Merck*), σε ρυθμιστικό διάλυμα κιτρικών – φωσφορικών 100mM, pH=5.5.

Προσδιορισμός: Σε κωνική φιάλη τύπου Erlenmeyer τοποθετούνται 10ml διαλύματος υποστρώματος και 1.0ml κατάλληλα αραιωμένου ενζυμικού σκευάσματος. Ακολουθεί επώαση σε υδατόλουτρο υπό ανάδευση σε θερμοκρασία 50°C. Σε διαστήματα 10min για συνολικό χρόνο 30min λαμβάνεται 0.500ml δείγματος μετά από έντονη ανάδευση και τοποθετούνται σε δοκιμαστικό σωλήνα οποίος είναι βυθισμένος σε παγόλουτρο. Ακολουθεί προσθήκη 0.500 mL διαλύματος DNS, βρασμός 5 min και στη συνέχεια προσθήκη 4 mL απιονισμένου νερού. Η φωτομέτρηση πραγματοποιείται σε μήκος κύματος 540 nm (Μέτρηση αναγωγικών υδατανθράκων § 1.1).

Σημειώνεται ότι για τον μηδενισμό του φωτομέτρου χρησιμοποιείται δείγμα στο οποίο αντί του ενζυμικού σκευάσματος κατάλληλα αραιωμένου περιέχει απενεργοποιημένου ενζυμικού σκευάσματος (η απενεργοποίηση του ενζυμικού σκευάσματος πραγματοποιείται με βρασμό αυτού για περίπου 20 min) και ακολουθεί όλη την διαδικασία που αναφέρεται παραπάνω.

Οι προσδιορισμοί ανά δείγμα πραγματοποιούνται εις τριπλούν και λαμβάνεται ο μέσος όρος των μετρήσεων.

Ορισμός ενεργότητας α-αμυλάσης : 1 Unit ενεργότητας α-αμυλάσης ορίζεται ως η ποσότητα του ενζύμου που απαιτείται για την παραγωγή 1 μmol μαλτόζης ανά min σε pH=5.5 και θερμοκρασία 50 °C (U/g*min).

Η ενεργότητα της α-αμυλάσης προσδιορίστηκε σύμφωνα με την παραπάνω μέθοδο ίση με 177.74 U/g σκευάσματος (d=1.25g/ml). (Zhao et al., 2008 , Wu et al., 2006)

8. Μέτρηση ενζυμικής ενεργότητας αμυλογλυκοζιδάσης.

Υπόστρωμα: Παρασκευάζεται διάλυμα 0,1% υδατοδιαλυτού αμύλου (*Stärke löslich zur analyse, Merck*), σε ρυθμιστικό διάλυμα κιτρικών – φωσφορικών 100mM, pH=5.0.

Προσδιορισμός: Σε κωνική φιάλη τύπου Erlenmeyer τοποθετούνται 10ml διαλύματος υποστρώματος και 1,0ml κατάλληλα αραιωμένου ενζυμικού σκευάσματος. Ακολουθεί επώαση σε υδατόλουτρο υπό ανάδευση σε θερμοκρασία 50°C. Σε διαστήματα 10min για συνολικό χρόνο 30min λαμβάνεται 0.500ml δείγματος μετά από έντονη ανάδευση και τοποθετούνται σε δοκιμαστικό σωλήνα οποίος είναι βυθισμένος σε παγόλουτρο. Ακολουθεί προσθήκη 0.500 mL διαλύματος DNS, βρασμός 5 min και στη συνέχεια προσθήκη 4 mL απιονισμένου νερού.

νερού. Η φωτομέτρηση πραγματοποιείται σε μήκος κύματος 540 nm (Μέτρηση αναγωγικών υδατανθράκων § 1.1).

Σημειώνεται ότι για τον μηδενισμό του φωτομέτρου χρησιμοποιείται δείγμα στο οποίο αντί του ενζυμικού σκευάσματος κατάλληλα αραιωμένου περιέχει απενεργοποιημένου ενζυμικού σκευάσματος (η απενεργοποίηση του ενζυμικού σκευάσματος πραγματοποιείται με βρασμό αυτού για περίπου 20 min) και ακολουθεί όλη την διαδικασία που αναφέρεται παραπάνω.

Οι προσδιορισμοί ανά δείγμα πραγματοποιούνται εις τριπλούν και λαμβάνεται ο μέσος όρος των μετρήσεων.

Ορισμός ενεργότητας αμυλογλυκοζιδάσης: 1 Unit ενεργότητας αμυλογλυκοζιδάσης ορίζεται ως η ποσότητα του ενζύμου που απαιτείται για την παραγωγή 1 μmol γλυκόζης ανά min σε pH=5.0 και θερμοκρασία 50 °C (U/g*min).

Η ενεργότητα της αμυλογλυκοζιδάσης προσδιορίστηκε σύμφωνα με την παραπάνω μέθοδο ίση με 2108.59U/g σκευάσματος (d=1.15 g/ml). (Zhao et al., 2008 , Wu et al., 2006)

Γ. Αποτελέσματα

1. Σύσταση διατροφικών απορριμμάτων

Η σύσταση της πρώτης ύλης παρουσιάζεται στον πίνακα Γ1. Η υγρασία του υλικού μετρήθηκε ίση με $10,97 \pm 0,09$ % (w/w) .

Πίνακας Γ1 . Σύσταση διατροφικών απορριμμάτων

Συστατικό	Περιεκτικότητα (%, w/w, ξηρή βάση)
Ολικά Διαλυτά	$37,77 \pm 0,83$
TRS	$11,99 \pm 0,72$
Γλυκόζη	$1,76 \pm 0,08$
Σακχαρόζη	$6,01 \pm 0,5$
Κυτταρίνη	$15,89 \pm 1,28$
Άμυλο	$12,48 \pm 0,13$

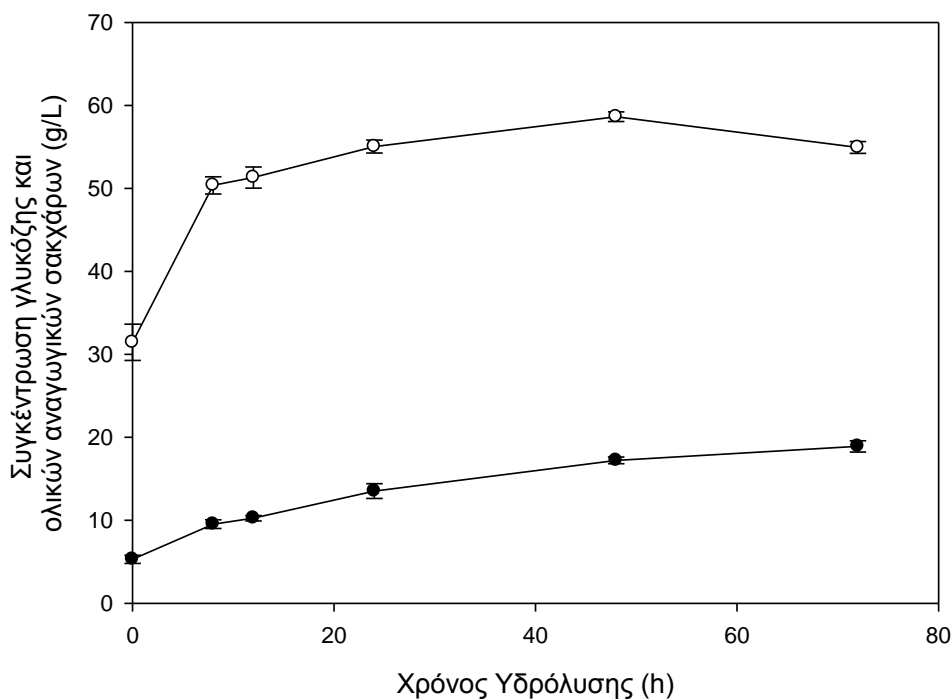
Η σύσταση των διατροφικών εξαρτάται από διάφορους παράγοντες όπως η διατροφικές συνήθειες, εποχικότητα και η περιοχή από την οποία συλλέγονται. Γι αυτό το λόγο η σύσταση τους μπορεί να ποικίλει κάνοντας έτσι τη βιομετατροπή τους μια ευαίσθητη και περίπλοκη διεργασία. (Kumar Karmee,2016)

2. Ενζυμική υδρόλυση διατροφικών απορριμμάτων : επίδραση ενζυμικού φορτίου

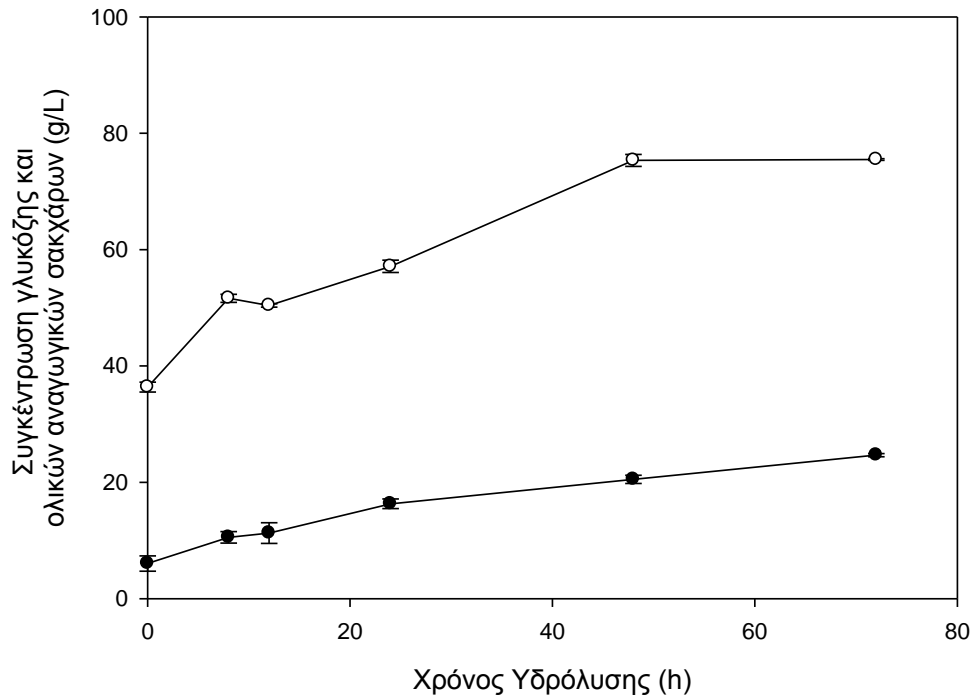
Τα πειράματα της ενζυμικής υδρόλυσης, με σκοπό τη μελέτη της επίδρασης του ενζυμικού φορτίου σε αυτήν, διεξήχθησαν σε δείγματα διατροφικών απορριμμάτων συγκέντρωσης στερεών 30% (w/v). Η πρώτη ύλη προκατεργάστηκε υδροθερμικά στους 120°C για 60 min παρουσία οξέος. Στη συνέχεια, τα προκατεργασμένα διατροφικά απορρίμματα υποβλήθηκαν σε ενζυμική υδρόλυση με χρήση του εμπορικού σκευάσματος Cellic® CTec2 έτσι ώστε η ολική ενεργότητα κυτταρινάσης να είναι: 5, 10 , 20 , 40 , 60 , 80 και 100 FPU/g ξηρού υλικού. Το εμπορικό σκεύασμα Cellic® CTec2 περιέχει υψηλότερη ενεργότητα β-γλυκοζιδάσης σε σχέση με το ευρέως χρησιμοποιούμενο μίγμα Celluclast/Novozymes 188 και επιπλέον περιέχει Lytic Polysaccharides Monooxygenases (LPMO's, ή AA9 πρωτεΐνες, προηγούμενη ονομασία GH61), πρωτεΐνες οι οποίες διεγείρουν την υδρόλυση της κυτταρίνης.

Πειραματικά αποτελέσματα της εταιρείας Novozymes, Inc. κατέδειξαν την ικανότητα AA9 πρωτεϊνών να μειώνουν το ενζυμικό φορτίο των κυτταρινασών που απαιτείται για την επίτευξη δεδομένου ποσοτού υδρόλυσης κυτταρίνης (Viikari et al., 2012).

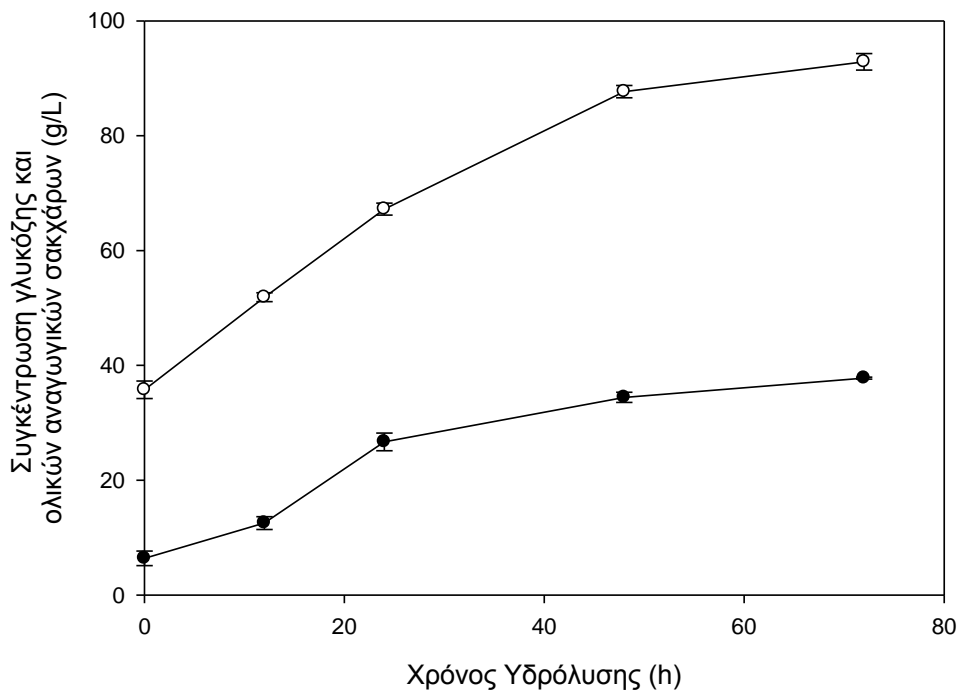
Τα αποτελέσματα της ενζυμικής υδρόλυσης παρουσιάζονται στα Διαγράμματα Γ1-Γ7.



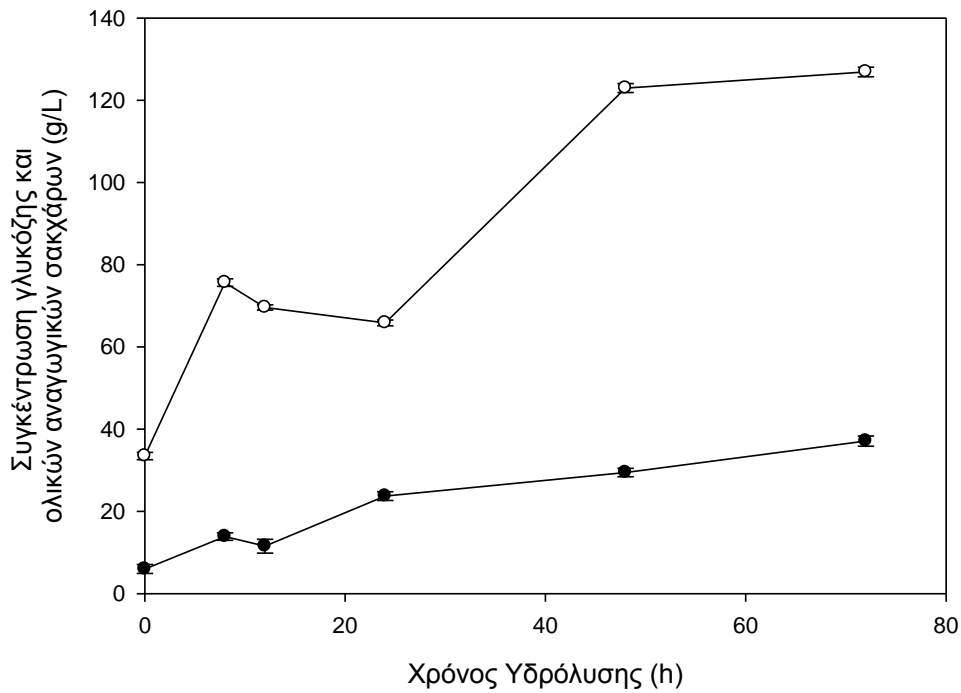
Διάγραμμα Γ1. Χρονική μεταβολή της συγκέντρωσης ολικών αναγωγικών σακχάρων και γλυκόζης κατά την υδρόλυση διατροφικών απορριμμάτων. Συνθήκες: συγκέντρωση υποστρώματος 30 % w/v , κυτταρινολυτικό ενζυμικό σκεύασμα-ενζυμικό φορτίο: Cellic® CTec 2– 5 FPU/g_{κυτταρίνης} , T: 50 °C , t_{υδρόλυσης} : 72 h , Σύμβολα : (○) ολικά αναγωγικά σάκχαρα , (●) γλυκόζη .



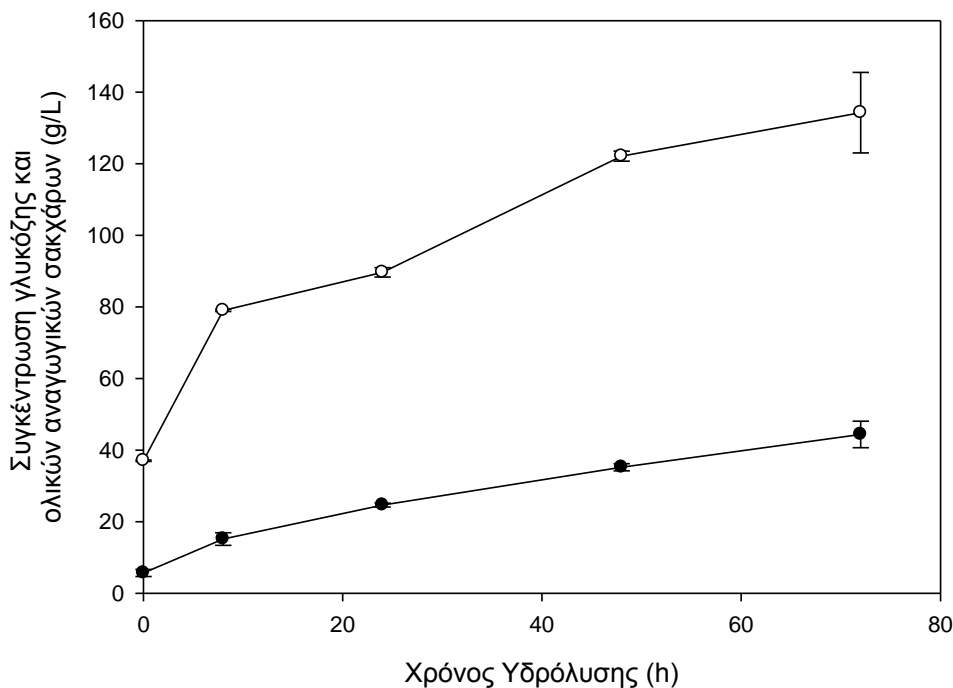
Διάγραμμα Γ2. Χρονική μεταβολή της συγκέντρωσης ολικών αναγωγικών σακχάρων και γλυκόζης κατά την υδρόλυση διατροφικών απορριμμάτων. Συνθήκες: συγκέντρωση υποστρώματος 30 % w/v, κυτταρινολυτικό ενζυμικό σκεύασμα-ενζυμικό φορτίο : Celllic® CTec 2 – 10 FPU/g_{κυτταρίνης} , T: 50 °C , t_{υδρόλυσης} : 72 h , Σύμβολα : (○) ολικά αναγωγικά σάκχαρα , (●) γλυκόζη .



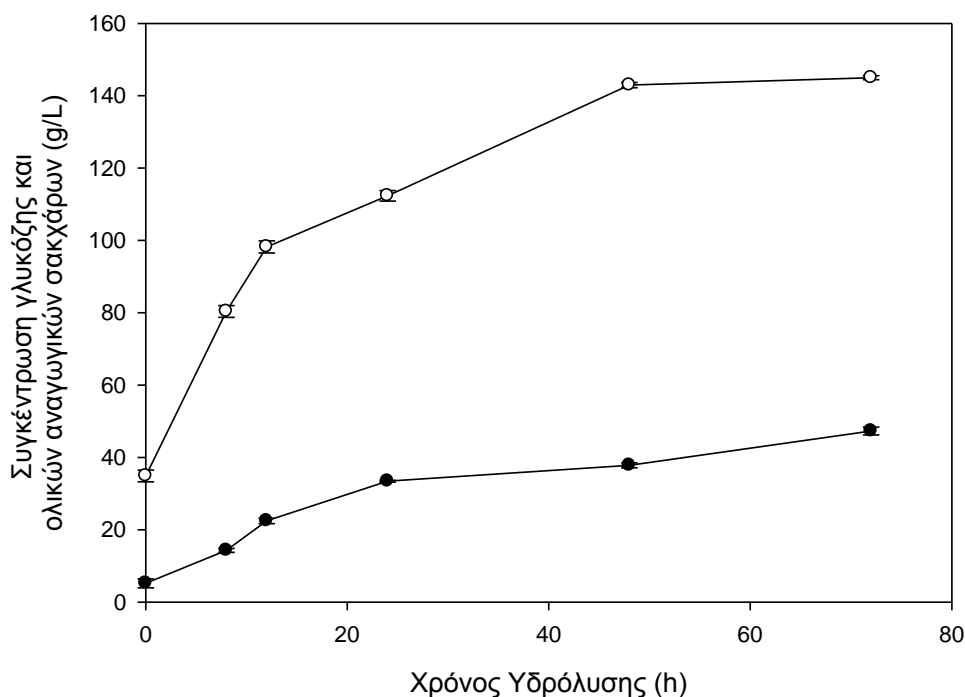
Διάγραμμα Γ3. Χρονική μεταβολή της συγκέντρωσης ολικών αναγωγικών σακχάρων και γλυκόζης κατά την υδρόλυση διατροφικών απορριμμάτων . Συνθήκες : συγκέντρωση υποστρώματος 30 % w/v , κυτταρινολυτικό ενζυμικό σκεύασμα-ενζυμικό φορτίο : Celllic® CTec 2 – 20 FPU/g_{κυτταρίνης} , T: 50 °C , t_{υδρόλυσης} : 72 h , Σύμβολα : (○) ολικά αναγωγικά σάκχαρα , (●) γλυκόζη .



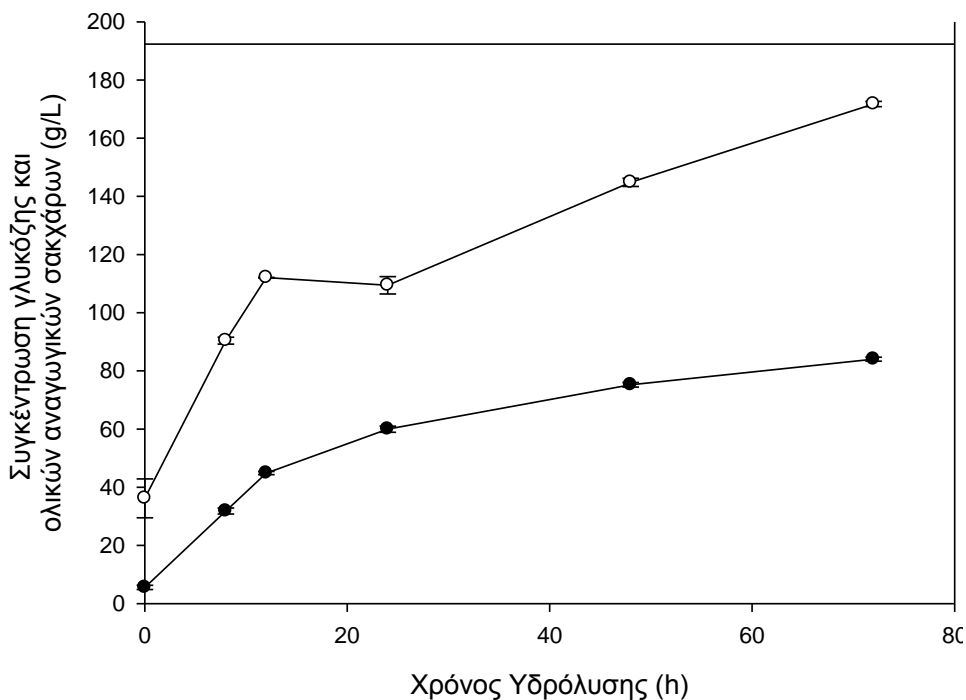
Διάγραμμα Γ4. Χρονική μεταβολή της συγκέντρωσης ολικών αναγωγικών σακχάρων και γλυκόζης κατά την υδρόλυση διατροφικών απορριμμάτων . Συνθήκες : συγκέντρωση υποστρώματος 30 % w/v , κυτταρινολυτικό ενζυμικό σκεύασμα-ενζυμικό φορτίο : Cellic® CTec 2 – 40 FPU/g_{κυτταρίνης} , T: 50 °C , t_{υδρόλυσης} : 72 h , Σύμβολα :(○) ολικά αναγωγικά σάκχαρα , (●) γλυκόζη .



Διάγραμμα Γ5. Χρονική μεταβολή της συγκέντρωσης ολικών αναγωγικών σακχάρων και γλυκόζης κατά την υδρόλυση διατροφικών απορριμμάτων . Συνθήκες : συγκέντρωση υποστρώματος 30 % w/v , κυτταρινολυτικό ενζυμικό σκεύασμα-ενζυμικό φορτίο : Cellic® CTec 2 – 60 FPU/g_{κυτταρίνης} , T: 50 °C , τ_{υδρόλυσης} : 72 h , Σύμβολα : (○) ολικά αναγωγικά σάκχαρα , (●) γλυκόζη .



Διάγραμμα Γ6. Χρονική μεταβολή της συγκέντρωσης ολικών αναγωγικών σακχάρων και γλυκόζης κατά την υδρόλυση διατροφικών απορριμμάτων . Συνθήκες : συγκέντρωση υποστρώματος 30 % w/v , κυτταρινολυτικό ενζυμικό σκεύασμα-ενζυμικό φορτίο : Cellic® CTec 2 – 80 FPU/g_{κυτταρίνης} , T: 50 °C , τ_{υδρόλυσης} : 72 h , Σύμβολα : (○) ολικά αναγωγικά σάκχαρα , (●) γλυκόζη .



Διάγραμμα Γ7. Χρονική μεταβολή της συγκέντρωσης ολικών αναγωγικών σακχάρων και γλυκόζης κατά την υδρόλυση διατροφικών απορριμμάτων . *Συνθήκες :* συγκέντρωση υποστρώματος 30 % w/v , κυτταρινολυτικό ενζυμικό σκεύασμα-ενζυμικό φορτίο : Cellic® CTec 2 – 100 FPU/g_{κυτταρίνης} , T: 50 °C , t_{υδρόλυσης} : 72 h , *Σύμβολα :* (○) ολικά αναγωγικά σάκχαρα , (●) γλυκόζη .

Με βάση τα άνωθεν διαγραμμάτων εξάγεται το συμπέρασμα ότι η αύξηση του ενζυμικού φορτίου οδηγεί στην αύξηση της αρχικής ταχύτητας παραγωγής γλυκόζης (Διαγράμματα Γ1-Γ7). Η μέγιστη συγκέντρωση γλυκόζης λαμβάνεται στις 72 ώρες αλλά πρακτικά ο ρυθμός της υδρόλυσης είναι μικρότερος μετά το πέρας των πρώτων 24 ωρών, γεγονός που δικαιολογείται από τη αναστολή της δράσης των ενζύμων λόγω της αύξησης της συγκέντρωσης των παραγόμενων σακχάρων (παρεμπόδιση από τον προϊόν : γλυκόζη και κελλοβιόζη).

Επιπλέον αύξηση του ενζυμικού φορτίου οδηγεί σε αύξηση της μέγιστης απελευθερούμενης γλυκόζης καθώς και των ολικών αναγωγικών σακχάρων (Πίνακας Γ2).

Το εμπορικό σκεύασμα Cellic® CTec 2 εκτός των κυτταρινολυτικών ενζύμων περιέχει και αμυλολυτικά ένζυμα η ενεργότητα των οποίων μετρήθηκε ίση με

α-αμυλάση: 33.55 Units/ml_{σκευάσματος}

γλυκοαμυλάση: 57.46 Units/ml_{σκευάσματος}

Κατά συνέπεια εκτός της υδρόλυσης της κυτταρίνης πραγματοποιείται και υδρόλυση του αμύλου. Το φορτίο αμυλολυτικών ενζύμων που προστέθηκε ανά συνθήκη παρουσιάζεται στον Πίνακα Γ3.

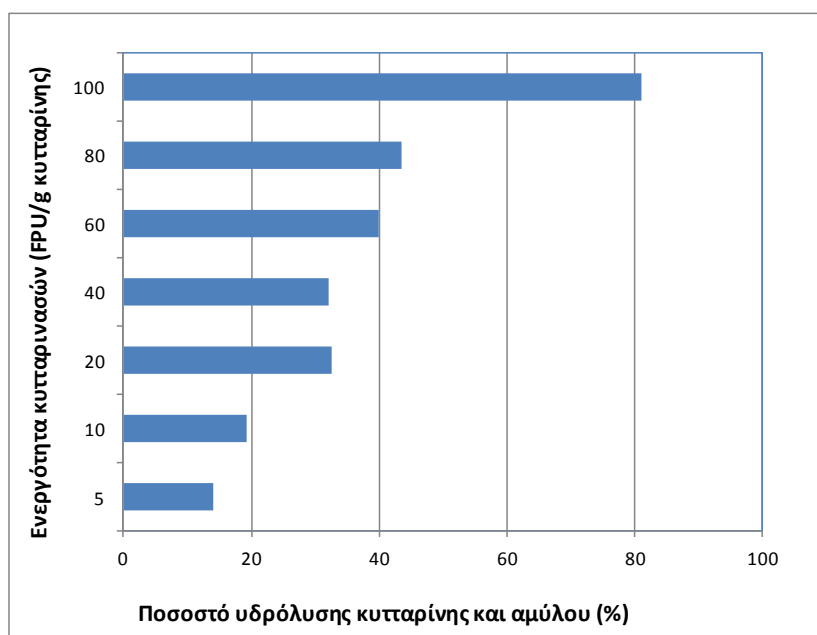
Πίνακας Γ2. Μέγιστες τιμές γλυκόζης και ολικών αναγωγικών σακχάρων

FPU/g κυτταρίνης	Γλυκόζη (g/L)	Ολικά αναγωγικά σάκχαρα (g/l)
5	18,91 ± 0,61	58,63 ± 0,58
10	24,68 ± 0,27	75,48 ± 0,79
20	37,78 ± 0,16	92,87 ± 1,43
40	37,11 ± 1,25	126,9 ± 1,09
60	44,37 ± 2,01	134,27 ± 3,7
80	47,20 ± 1,02	144,98 ± 1,54
100	84,03 ± 1,69	171,76 ± 1,73

Πίνακας Γ3. Ενεργότητες κυτταρινολυτικών και αμυλολυτικών ενζύμων που χρησιμοποιήθηκαν στην υδρόλυση των προκατεργασμένων διατροφικών απορριμμάτων

Cellic® CTec 2 (FPU/g κυτταρίνης)	α-αμυλάση (U/g αμύλου)	γλυκοαμυλάση (U/g αμύλου)
5	0.94	1.62
10	1.88	3.22
20	3.76	6.45
40	7.53	12.89
60	11.43	19.56
80	15.05	25.77
100	18.82	32.22

Με βάση τις μέγιστες τιμές απελευθερούμενης γλυκόζης η οποία προέρχεται τόσο από την υδρόλυση της κυτταρίνης όσο και από την υδρόλυση του αμύλου υπολογίστηκε το θεωρητικό ποσοστό υδρόλυσης κυτταρίνης και αμύλου (Διάγραμμα Δ8). Τα αποτελέσματα δείχνουν ότι με αύξηση του ενζυμικού φορτίου αυξάνεται και το ποσοστό υδρόλυσης των πολυσακχαριτών.



Διάγραμμα Δ8. Ποσοστό υδρόλυσης κυτταρίνης και αμύλου (υπολογίστηκε με βάση τη μέγιστη γλυκόζη της πρώτης ύλης)

3.Βιομετατροπή διατροφικών απορριμμάτων σε αιθανόλη με εφαρμογή Μη ισοθερμοκρασιακής σακχαροποίησης και ζύμωσης

Η βιομετατροπή των διατροφικών απορριμμάτων προσεγγίστηκε με τη μέθοδο της μη ισοθερμοκρασιακής ταυτόχρονης σακχαροποίησης και ζύμωσης (Non Isothermal Simultaneous Saccharification and Fermentation, NSSF). Μελετήθηκαν:

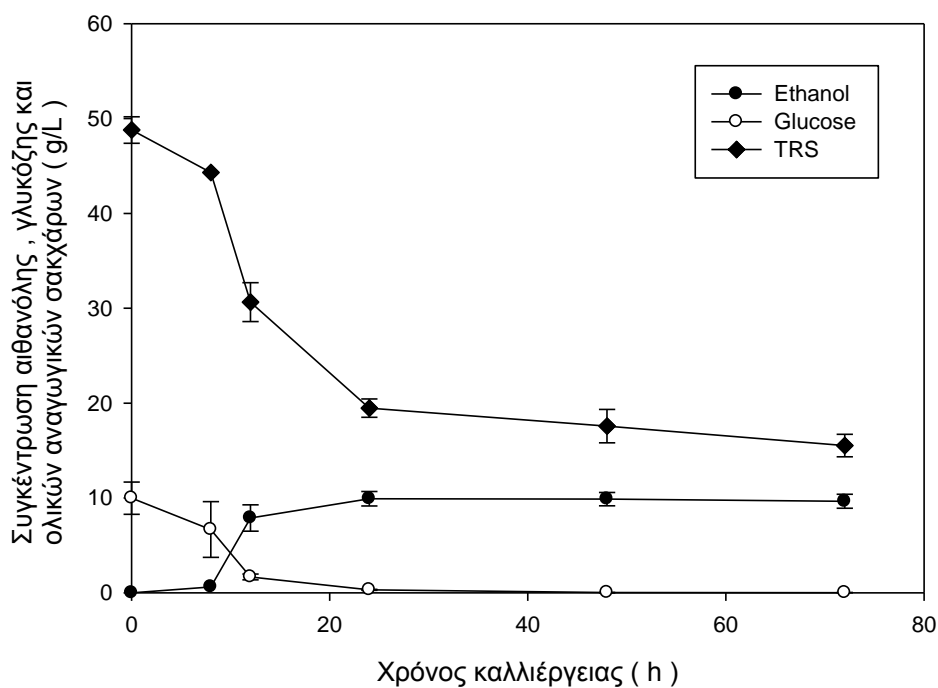
(α) η επίδραση του κυτταρινολυτικού φορτίου του ενζυμικού σκευάσματος Cellic® CTec 2 (ενζυμικά φορτία 5-100 FPU/g κυτταρίνης)

(β) η επίδραση του φορτίου της προστιθέμενης γλυκοαμυλάσης (Spirizyme) (20-100 Units/g αμύλου) διατηρώντας το κυτταρινολυτικό φορτίο σε σταθερή τιμή,

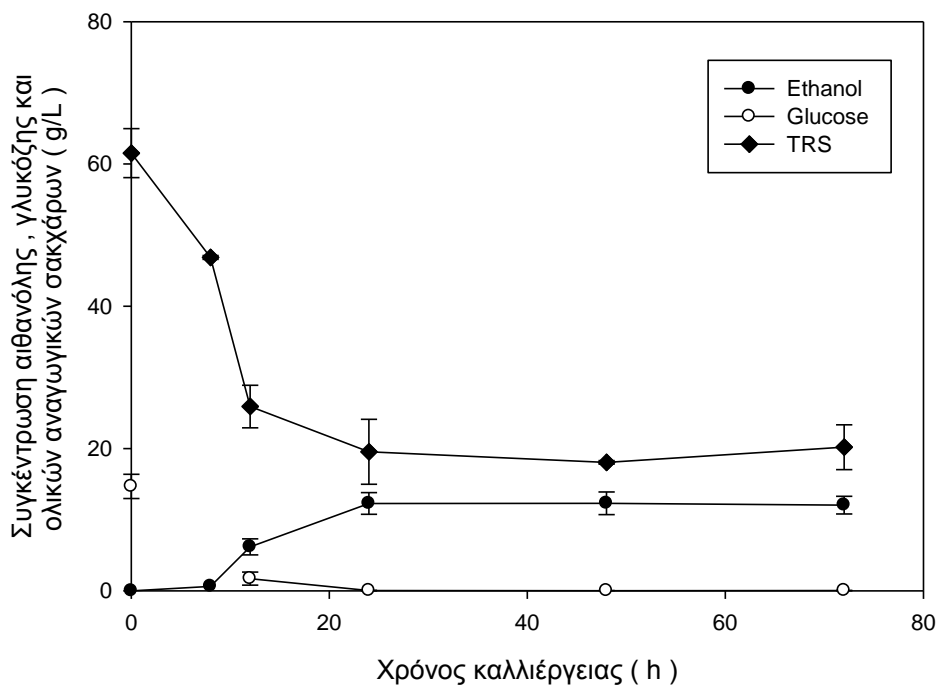
(γ) η επίδραση του φορτίου της προστιθέμενης α-αμυλάσης (Liquozyme) (2.65-13.25 Units/g αμύλου) διατηρώντας το κυτταρινολυτικό φορτίο καθώς και το φορτίο της γλυκοαμυλάσης σε σταθερή τιμή.

3.1 Επίδραση του ενζυμικού φορτίου κυτταριολυτικού σκευάσματος

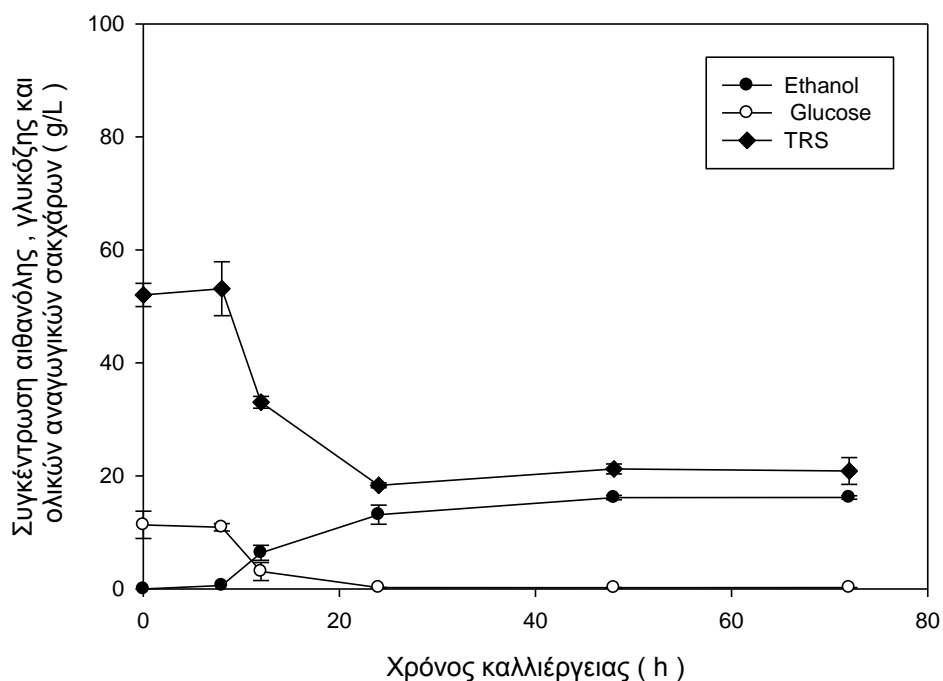
Στα Διαγράμματα Γ9-Γ15 παρουσιάζονται τα αποτελέσματα της βιομετατροπής των διατροφικών απορριμμάτων σε αιθανόλη .



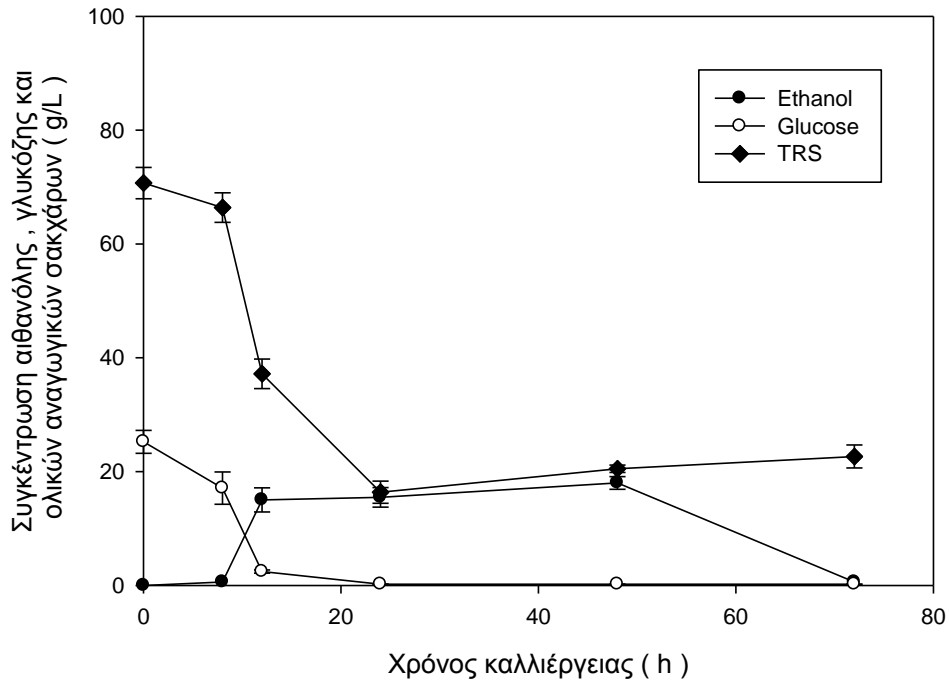
Διάγραμμα Γ9. Παραγωγή βιοαιθανόλης από διατροφικά απορρίμματα με εφαρμογή με ισοθερμοκρασιακής ταυτόχρονης σακχαροποίησης και ζύμωσης. Συνθήκες : κυτταριολυτικό ενζυμικό σκεύασμα-ενζυμικό φορτίο : Cellic® CTec 2 – 5 FPU/g_{κυτταρίνης} , T: 50 °C, t_{προϋδρόλυσης} : 6 h, μικροοργανισμός ζύμωσης: *S. cerevisiae*



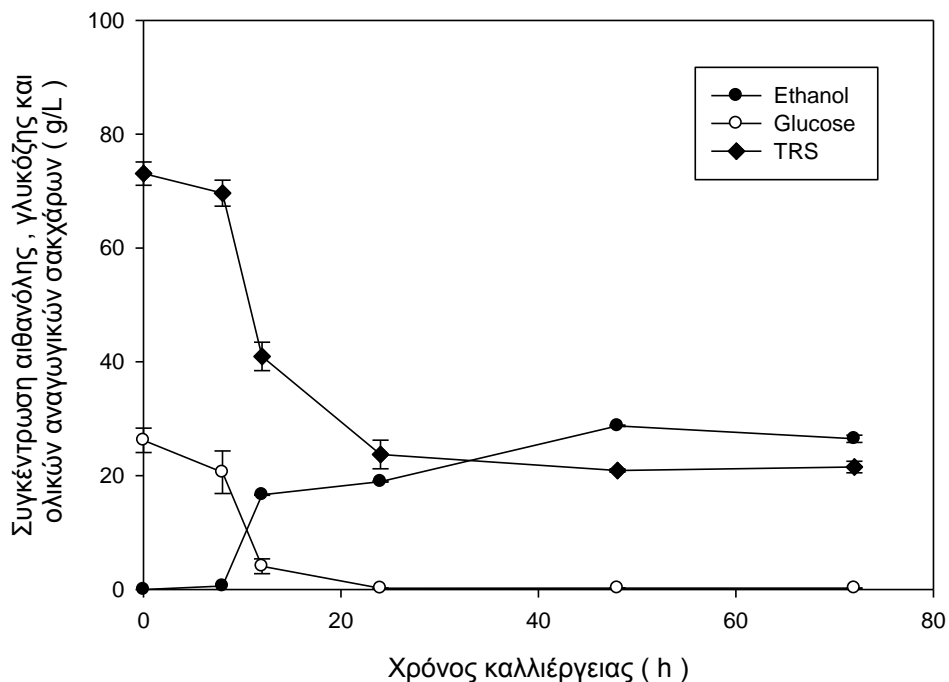
Διάγραμμα Γ10. Παραγωγή βιοαιθανόλης από διατροφικά απορρίμματα με εφαρμογή με ισοθερμοκρασιακής ταυτόχρονης σακχαροποίησης και ζύμωσης. **Συνθήκες :** κυτταρινολυτικό ενζυμικό σκεύασμα-ενζυμικό φορτίο : Cellic® CTec 2 – **10** FPU/g_{κυτταρίνης} , , T: 50 °C, t_{προϋδρόλυσης} : 6 h, μικροοργανισμός ζύμωσης: *S. cerevisiae*



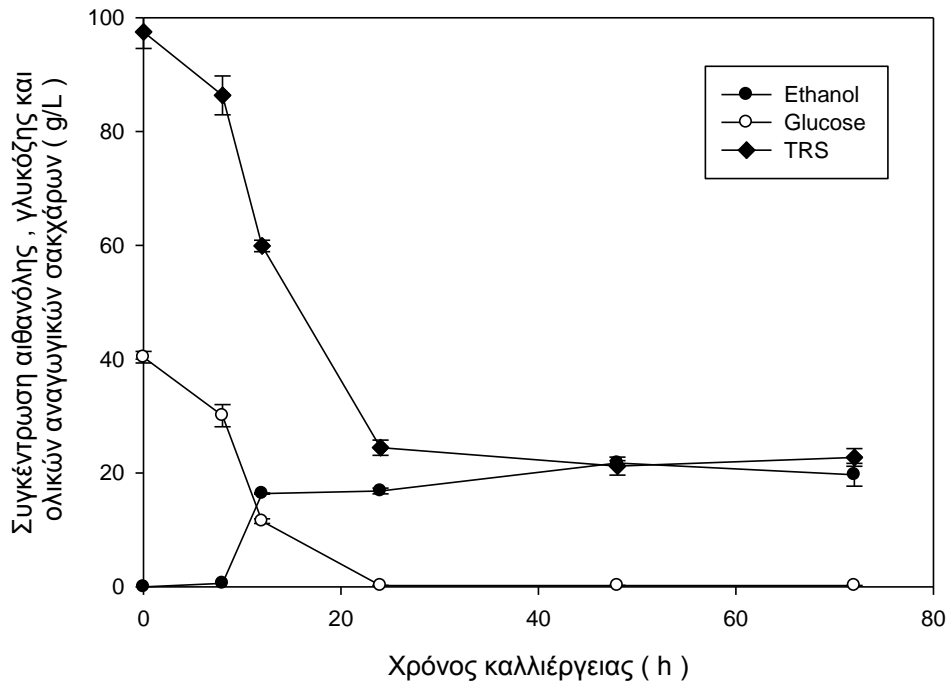
Διάγραμμα Γ11. Παραγωγή βιοαιθανόλης από διατροφικά απορρίμματα με εφαρμογή με ισοθερμοκρασιακής ταυτόχρονης σακχαροποίησης και ζύμωσης. **Συνθήκες :** κυτταρινολυτικό ενζυμικό σκεύασμα-ενζυμικό φορτίο : Cellic® CTec 2 – **20** FPU/g_{κυτταρίνης} , , T: 50 °C, t_{προϋδρόλυσης} : 6 h, μικροοργανισμός ζύμωσης: *S. cerevisiae*



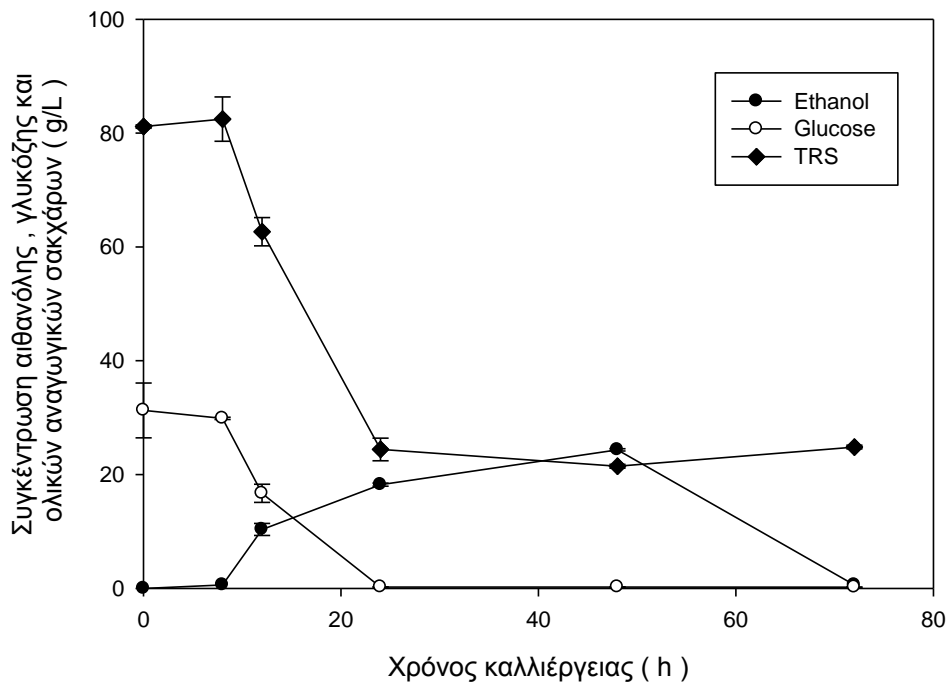
Διάγραμμα Γ12. Παραγωγή βιοαιθανόλης από διατροφικά απορρίμματα με εφαρμογή με ισοθερμοκρασιακής ταυτόχρονης σακχαροποίησης και ζύμωσης. Συνθήκες : κυτταρινολυτικό ενζυμικό σκεύασμα-ενζυμικό φορτίο : Cellic® CTec 2 – 40 FPU/g_{κυτταρίνης} , , T: 50 °C, t_{προϋδρόλυσης} : 6 h, μικροοργανισμός ζύμωσης: *S. cerevisiae*



Διάγραμμα Γ13. Παραγωγή βιοαιθανόλης από διατροφικά απορρίμματα με εφαρμογή με ισοθερμοκρασιακής ταυτόχρονης σακχαροποίησης και ζύμωσης. Συνθήκες : κυτταρινολυτικό ενζυμικό σκεύασμα-ενζυμικό φορτίο : Cellic® CTec 2 – 60 FPU/g_{κυτταρίνης} , , T: 50 °C, t_{προϋδρόλυσης} : 6 h, μικροοργανισμός ζύμωσης: *S. cerevisiae*

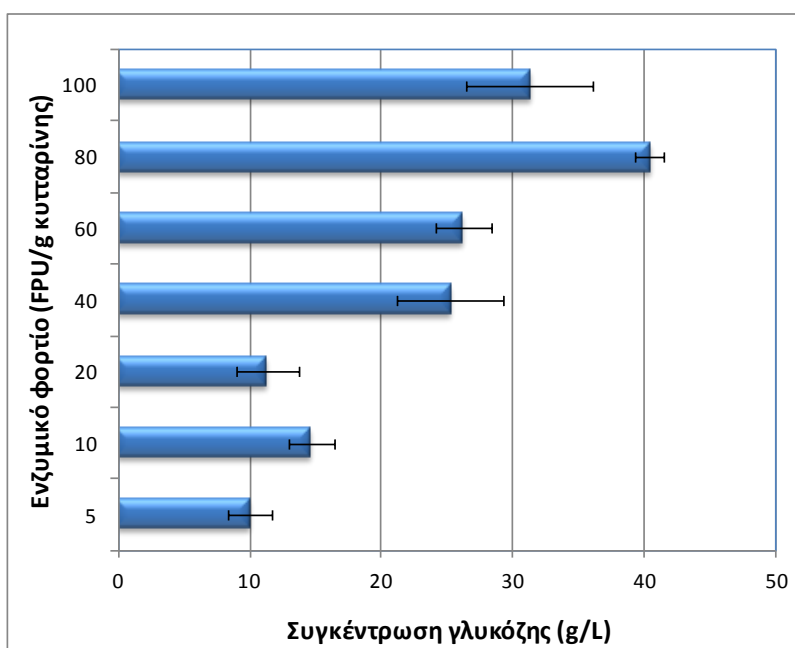


Διάγραμμα Γ14. Παραγωγή βιοαιθανόλης από διατροφικά απορρίμματα με εφαρμογή με ισοθερμοκρασιακής ταυτόχρονης σακχαροποίησης και ζύμωσης. Συνθήκες: κυτταρινολυτικό ενζυμικό σκεύασμα-ενζυμικό φορτίο : Cellic® CTec 2 – 80 FPU/g_{κυτταρίνης} , T: 50 °C, t_{προϋδρόλυσης} : 6 h, μικροοργανισμός ζύμωσης: *S. cerevisiae*



Διάγραμμα Γ15. Παραγωγή βιοαιθανόλης από διατροφικά απορρίμματα με εφαρμογή με ισοθερμοκρασιακής ταυτόχρονης σακχαροποίησης και ζύμωσης. Συνθήκες : κυτταρινολυτικό ενζυμικό σκεύασμα-ενζυμικό φορτίο : Cellic® CTec 2 – 100 FPU/g_{κυτταρίνης} , T: 50 °C, t_{προϋδρόλυσης} : 6 h, μικροοργανισμός ζύμωσης: *S. cerevisiae*

Από τα άνωθεν διαγράμματα είναι φανερό ότι η παραγωγή αιθανόλης ολοκληρώνεται εντός 24 ωρών. Η γλυκόζη αφομοιώνεται ταχύτατα από τη ζύμη και εξαντλείται εντός 24 ωρών καλλιέργειας. Ανάλογα με το ενζυμικό φορτίο επηρεάζεται και η συγκέντρωση της γλυκόζης στην έναρξη της ζύμωσης και συνεπαγωγικά η συγκέντρωση της παραγόμενης αιθανόλης (Διάγραμμα Γ16). Αναλυτικότερα, αύξηση του ενζυμικού φορτίου οδηγεί σε αποδοτικότερη υδρόλυση του υλικού και κατ' επέκταση σε μεγαλύτερη συγκέντρωση ζυμώσιμων σακχάρων. Η μέγιστη συγκέντρωση γλυκόζης στην αρχή της ζύμωσης λαμβάνεται όταν το ενζυμικό φορτίο του κυτταρινολυτικού σκευάσματος είναι ίσο με 80 FPU/g_{κυτταρίνης}.



Διάγραμμα Γ16. Παραγόμενη γλυκόζη (g/L) μετά το τέλος της υδρόλυσης με ενζυμικό σκεύασμα Celllic® CTec 2 συναρτήσεως του ενζυμικού φορτίου

Οι μέγιστες επιτευχθείσες τιμές αιθανόλης συναρτήσεως του ενζυμικού φορτίου παρουσιάζονται στον Πίνακα Γ4. Προσθήκη 60 FPU/g_{κυτταρίνης} Celllic® CTec 2 έδωσε τη μέγιστη συγκέντρωση σε βιοαιθανόλη ίση με 28,76 g/L. Επίσης η μέγιστη τιμή παραγωγικότητας, ίση με 1,39 g/L·h επιτεύχθηκε με την προσθήκη 60 FPU/g_{κυτταρίνης} Celllic® CTec 2. Η παραγωγικότητα εξαρτάται από τη συγκέντρωση των άμεσα μεταβολίσιμων σακχάρων και συνεπώς από το ρυθμό της ενζυμικής υδρόλυσης. Με την αύξηση του ενζυμικού φορτίου αρχικά παράγονται περισσότερα ζυμώσιμα σάκχαρα λόγω της υδρόλυσης του υλικού και εν συνεχεία παράγονται μεγαλύτερες συγκεντρώσεις αιθανόλης δεδομένου ότι ο *Saccharomyces cerevisiae* χρησιμοποιείται ως υπόστρωμα για την παραγωγή αιθανόλης τα σάκχαρα από το στάδιο της υδρόλυσης. Για παράδειγμα, φαίνεται ότι η προσθήκη 60 FPU/g_{κυτταρίνης} έναντι 40 FPU/g_{κυτταρίνης} οδηγεί σε αύξηση της τάξης του 37% στην συγκέντρωση της παραγόμενης αιθανόλης. Γενικότερα, επιδιώκεται η χρήση χαμηλών ενζυμικών φορτίων ούτως ώστε να διατηρείται σε χαμηλά επίπεδα το κόστος παραγωγής του

βιοκαυσίμου (Balat ,2011). Τέλος , η μέγιστη απόδοση με βάση τα άμεσα ζυμώσιμα σάκχαρα του υλικού και βάσει της υδρόλυσης όχι μόνο της κυτταρίνης αλλά και του αμύλου καθώς το Cellic® CTec 2 περιέχει και αμυλολυτικά ένζυμα εκτός από κυτταρινάσες , υπολογίστηκε ίση με 47,51% όταν το ενζυμικό φορτίο ήταν 60 FPU/g_{κυτταρίνης} .

Πίνακας Γ4. Αποτελέσματα παραγωγής βιοαιθανόλης από διατροφικά απορρίμματα με τη μέθοδο της μη ισοθερμοκρασιακής ταυτόχρονης σακχαροποίησης και ζύμωσης (NSSF)

Ενζυμικό Φορτίο (FPU/g _{κυτταρίνη})	Παραγωγή αιθανόλης (g/L)*	Παραγωγικότητα αιθανόλης (g/L·h)	Ποσοστό της μέγιστης θεωρητικής απόδοσης ^a	Απόδοση (g/ 100 g ξηρού υλικού)
5	9,92 ± 0,77	0,42 ± 0,04	16,26 ± 1,26	3,39 ± 0,26
10	12,30 ± 1,60	0,52 ± 0,06	20,28 ± 2,63	4,25 ± 0,55
20	16,16 ± 0,38	0,54 ± 0,08	26,59 ± 0,63	5,54 ± 0,13
40	18,01 ± 1,11	1,26 ± 0,18	29,63 ± 1,82	6,17 ± 0,38
60	28,76 ± 0,13	1,39 ± 0,01	47,51 ± 0,21	9,9 ± 0,04
80	21,74 ± 0,43	1,37 ± 0,01	36,06 ± 0,72	7,51 ± 0,15
100	24,35 ± 0,2	0,76 ± 0,01	40,54 ± 0,33	8,45 ± 0,07

* FPU/g_{κυτταρίνης} Cellic® CTec 2

^a επί της θεωρητικής απόδοσης με βάση τα άμεσα διαθέσιμα σάκχαρα (μη δομικά) και τα σάκχαρα από κυτταρίνη και άμυλο (δομικά)

Από την ανάλυση του στερεού υπολείμματος καθώς και της υγρής φάσης μετά το πέρας της ζύμωσης (Πίνακες Γ5, Γ7, Γ9, Γ11, Γ13, Γ15, Γ17) μπορούν να εξαχθούν συμπεράσματα σχετικά με την απόδοση της διεργασίας. Παρατηρείται ότι αυξανόμενου του ενζυμικού φορτίου μειώνεται η ανάκτηση του στερεού καθώς η υδρόλυση του υποστρώματος γίνεται αποδοτικότερη και συνεπώς το στερεό που παραλαμβάνεται μετά το τέλος της ζύμωσης μειώνεται.

Πίνακας Γ5. Σύσταση στερεού υπολείμματος βιομετατροπής διατροφικών απορριμάτων. Συνθήκες: συγκέντρωση διατροφικών απορριμμάτων 30% β/ο, ενζυμικό φορτίο 5 FPU/g κυτταρίνης Cellic[®] CTec2. Ανάκτηση στερεού: 46.96±0.09 %

Συστατικό	(%, β/β, ξηρή βάση)*
Κυτταρίνη	9.43 ± 2.94
Άμυλο	10.09 ± 0.17

* g/100 g στερεού υπολείμματος

Πίνακας Γ6. Γλυκόζη, ολικά αναγωγικά σάκχαρα και διαλυτό άμυλο μετά το πέρας της βιομετατροπής των διατροφικών απορριμμάτων. Συνθήκες: συγκέντρωση διατροφικών απορριμμάτων 30% β/ο, ενζυμικό φορτίο 5 FPU/g κυτταρίνης Cellic[®] CTec2.

Συστατικό	(g/L)
Γλυκόζη	0
Ολικά αναγωγικά σάκχαρα	15.52 ± 1.18
Διαλυτό άμυλο	8.35 ± 0.80

Πίνακας Γ7. Σύσταση στερεού υπολείμματος βιομετατροπής διατροφικών απορριμμάτων. Συνθήκες: συγκέντρωση διατροφικών απορριμμάτων 30% β/ο, ενζυμικό φορτίο 10 FPU/g κυτταρίνης Cellic[®] CTec2. Ανάκτηση στερεού: 40.58±4.70 %

Συστατικό	(%, β/β, ξηρή βάση)*
Κυτταρίνη	12.27 ± 6.74
Άμυλο	8.58 ± 1.14

* g/100 g στερεού υπολείμματος

Πίνακας Γ8. Γλυκόζη, ολικά αναγωγικά σάκχαρα και διαλυτό άμυλο μετά το πέρας της βιομετατροπής των διατροφικών απορριμμάτων. Συνθήκες: συγκέντρωση διατροφικών απορριμμάτων 30% β/ο, ενζυμικό φορτίο 10 FPU/g κυτταρίνης Cellic[®] CTec2.

Συστατικό	(g/L)
Γλυκόζη	0
Ολικά αναγωγικά σάκχαρα	20.19 ± 3.15
Διαλυτό άμυλο	8.68 ± 0.00

Πίνακας Γ9. Σύσταση στερεού υπολείμματος βιομετατροπής διατροφικών απορριμμάτων. Συνθήκες: συγκέντρωση διατροφικών απορριμμάτων 30% β/ο, ενζυμικό φορτίο 20 FPU/g κυτταρίνης Cellic® CTec2. Ανάκτηση στερεού: 38.39± 1.01%

Συστατικό	(%, β/β, ξηρή βάση)*
Κυτταρίνη	4.91 ± 0.98
Άμυλο	8.37 ± 1.18

* g/100 g στερεού υπολείμματος

Πίνακας Γ10. Γλυκόζη, ολικά αναγωγικά σάκχαρα και διαλυτό άμυλο μετά το πέρας της βιομετατροπής των διατροφικών απορριμμάτων. Συνθήκες: συγκέντρωση διατροφικών απορριμμάτων 30% β/ο, ενζυμικό φορτίο 20 FPU/g κυτταρίνης Cellic® CTec2.

Συστατικό	(g/L)
Γλυκόζη	0
Ολικά αναγωγικά σάκχαρα	20.88 ± 2.36
Διαλυτό άμυλο	7.38 ± 0.21

Πίνακας Γ11. Σύσταση στερεού υπολείμματος βιομετατροπής διατροφικών απορριμμάτων. Συνθήκες: συγκέντρωση διατροφικών απορριμμάτων 30% β/ο, ενζυμικό φορτίο 40 FPU/g κυτταρίνης Cellic® CTec2. Ανάκτηση στερεού: 33.98± 3.70%

Συστατικό	(%, β/β, ξηρή βάση)*
Κυτταρίνη	4.75 ± 0.80
Άμυλο	7.13 ± 0.96

* g/100 g στερεού υπολείμματος

Πίνακας Γ12. Γλυκόζη, ολικά αναγωγικά σάκχαρα και διαλυτό άμυλο μετά το πέρας της βιομετατροπής των διατροφικών απορριμμάτων. Συνθήκες: συγκέντρωση διατροφικών απορριμμάτων 30% β/ο, ενζυμικό φορτίο 40 FPU/g κυτταρίνης Cellic® CTec2.

Συστατικό	(g/L)
Γλυκόζη	0
Ολικά αναγωγικά σάκχαρα	22.66 ± 2.02
Διαλυτό άμυλο	δ.μ*

* δεν μετρήθηκε

Πίνακας Γ13. Σύσταση στερεού υπολείμματος βιομετατροπής διατροφικών απορριμάτων. Συνθήκες: συγκέντρωση διατροφικών απορριμμάτων 30% β/ο, ενζυμικό φορτίο 60 FPU/g κυτταρίνης Cellic® CTec2. Ανάκτηση στερεού: 29.87± 1.48%

Συστατικό	(%, β/β, ξηρή βάση)*
Κυτταρίνη	1.64 ± 0.15
Άμυλο	6.47 ± 1.78

* g/100 g στερεού υπολείμματος

Πίνακας Γ14. Γλυκόζη, ολικά αναγωγικά σάκχαρα και διαλυτό άμυλο μετά το πέρας της βιομετατροπής των διατροφικών απορριμμάτων. Συνθήκες: συγκέντρωση διατροφικών απορριμμάτων 30% β/ο, ενζυμικό φορτίο 60 FPU/g κυτταρίνης Cellic® CTec2.

Συστατικό	(g/L)
Γλυκόζη	0
Ολικά αναγωγικά σάκχαρα	21.53 ± 1.02
Διαλυτό άμυλο	1.53 ± 0.00

Πίνακας Γ15. Σύσταση στερεού υπολείμματος βιομετατροπής διατροφικών απορριμμάτων. Συνθήκες: συγκέντρωση διατροφικών απορριμμάτων 30% β/ο, ενζυμικό φορτίο 80 FPU/g κυτταρίνης Cellic® CTec2. Ανάκτηση στερεού: 30.53± 1.76%

Συστατικό	(%, β/β, ξηρή βάση)*
Κυτταρίνη	5.95 ± 0.97
Άμυλο	5.29 ± 0.87

* g/100 g στερεού υπολείμματος

Πίνακας Γ16. Γλυκόζη, ολικά αναγωγικά σάκχαρα και διαλυτό άμυλο μετά το πέρας της βιομετατροπής των διατροφικών απορριμμάτων. Συνθήκες: συγκέντρωση διατροφικών απορριμμάτων 30% β/ο, ενζυμικό φορτίο 80 FPU/g κυτταρίνης Cellic® CTec2.

Συστατικό	(g/L)
Γλυκόζη	0
Ολικά αναγωγικά σάκχαρα	22.73 ± 1.55
Διαλυτό άμυλο	1.46 ± 0.31

Πίνακας Γ17. Σύσταση στερεού υπολείμματος βιομετατροπής διατροφικών απορριμάτων. Συνθήκες: συγκέντρωση διατροφικών απορριμμάτων 30% β/ο, ενζυμικό φορτίο 100 FPU/g κυτταρίνης Cellic[®] CTec2. Ανάκτηση στερεού: 32.23± 2.77%

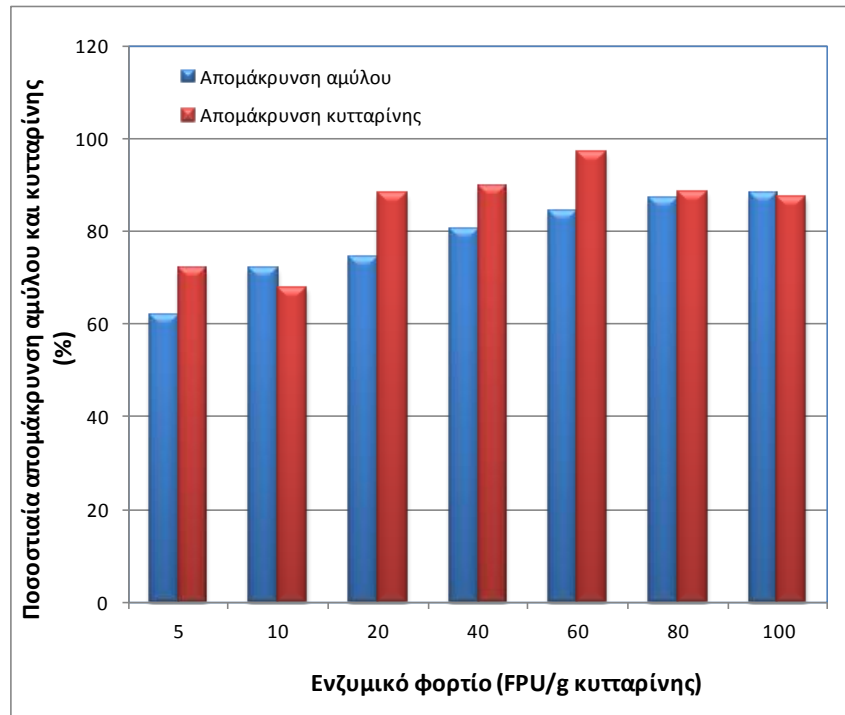
Συστατικό	(%, β/β, ξηρή βάση)*
Κυτταρίνη	6.17 ± 0.58
Άμυλο	4.62 ± 1.47

* g/100 g στερεού υπολείμματος

Πίνακας Γ18. Γλυκόζη, ολικά αναγωγικά σάκχαρα και διαλυτό άμυλο μετά το πέρας της βιομετατροπής των διατροφικών απορριμάτων. Συνθήκες: συγκέντρωση διατροφικών απορριμμάτων 30% β/ο, ενζυμικό φορτίο 100 FPU/g κυτταρίνης Cellic[®] CTec2.

Συστατικό	(g/L)
Γλυκόζη	0
Ολικά αναγωγικά σάκχαρα	24.82 ± 0.32
Διαλυτό άμυλο	1.69 ± 0.19

Στο *Διάγραμμα Γ17* παρουσιάζονται οι ποσοστιαίες απομακρύνσεις αμύλου και κυτταρίνης από το υλικό σύμφωνα με τις αναλύσεις που έγιναν στο στερεό υπόλειμμα.



Διάγραμμα Γ17. Ποσοστιαία απομάκρυνση πολυσακχαριτών από το στερεό υπόλειμμα συναρτήσει του ενζυμικού φορτίου

Όπως αναφέρθηκε παραπάνω (Πίνακας Γ3) το ενζυμικό σκεύασμα Cellic® CTec 2 περιέχει και αμυλολυτικά ένζυμα. Τα ποσοστά αυτά είναι αξιοσημείωτα μεγάλα και καταδεικνύουν την τάση για υψηλές συγκεντρώσεις αιθανόλης.

Ανάλυση της υγρής φάσης μετά το πέρας της ζύμωσης (Πίνακες Γ5, Γ8, Γ10, Γ11, Γ14, Γ16, Γ18) έδειξε ότι δεν υπάρχει γλυκόζη, η ποσότητα των ολικών αναγωγικών σακχάρων παραμένει σταθερή (περίπου 23 g/L) και η ποσότητα του διαλυτού αμύλου μειώνεται αυξανομένης της ενεργότητας των κυτταρινασών.

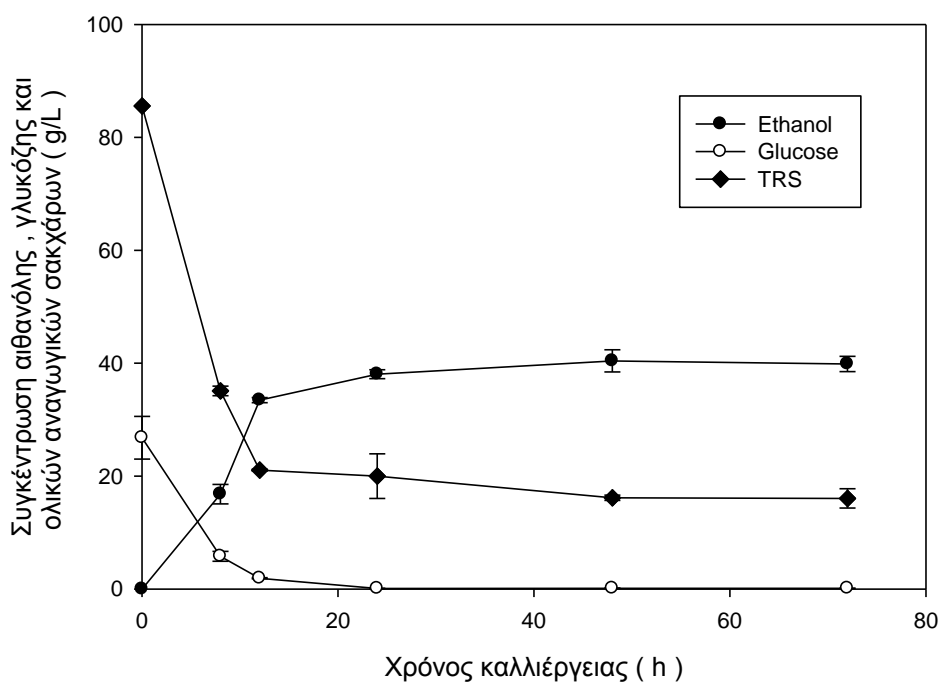
Τα ολικά αναγωγικά στο τέλος της ζύμωσης μπορεί να προέρχονται είτε από το κλάσμα της ημικυτταρίνης που δεν ζυμώνεται από τον μύκητα, δηλαδή τις πεντόζες (π.χ. αραβινόζη, ξυλόζη), είτε από oligομερή της γλυκόζης που προέρχονται από την υδρόλυση της κυτταρίνης και του αμύλου, είτε ακόμα και από την υδρόλυση της πηκτίνης (γαλακτουρονικό οξύ).

Με βάσει τα άνωθεν αποτελέσματα, επιλέχθηκε ως ενζυμική ενεργότητα για τα επόμενα πειράματα τα 60 FPU/g κυτταρίνης Cellic® CTec2 .

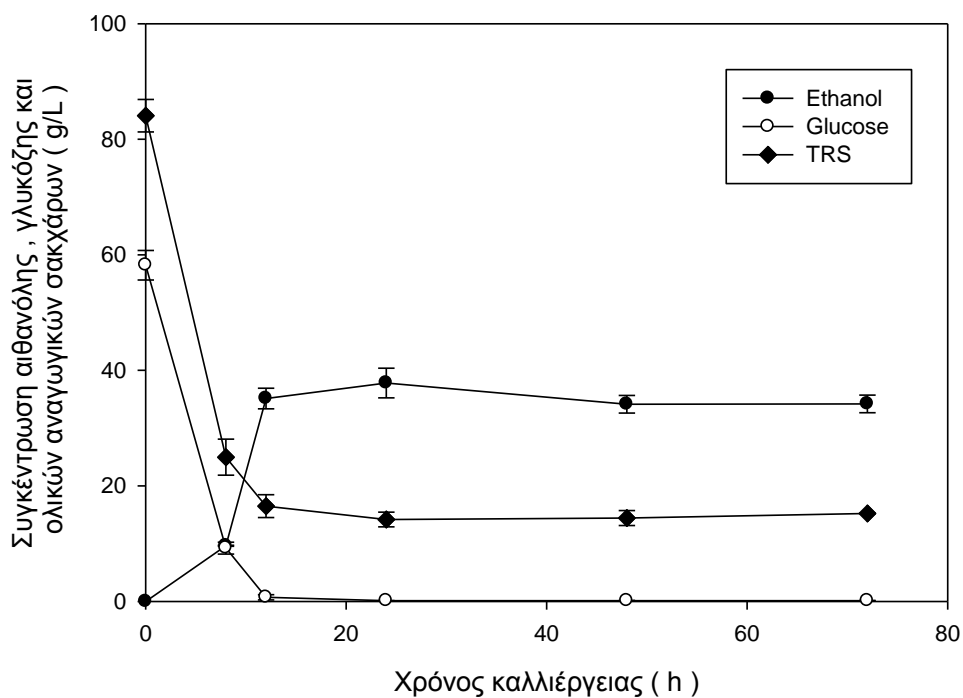
3.2 Επίδραση του ενζυμικού φορτίου γλυκοαμυλάσης

Στα διαγράμματα Γ18-Γ22 παρουσιάζονται τα αποτελέσματα της βιομετατροπής των διατροφικών απορριμμάτων σε αιθανόλη, το υπόστρωμα της οποίας είχε υποστεί υδρόλυση με ενζυμικό σκεύασμα γλυκοαμυλάσης παρουσία και κυτταρινολυτικών

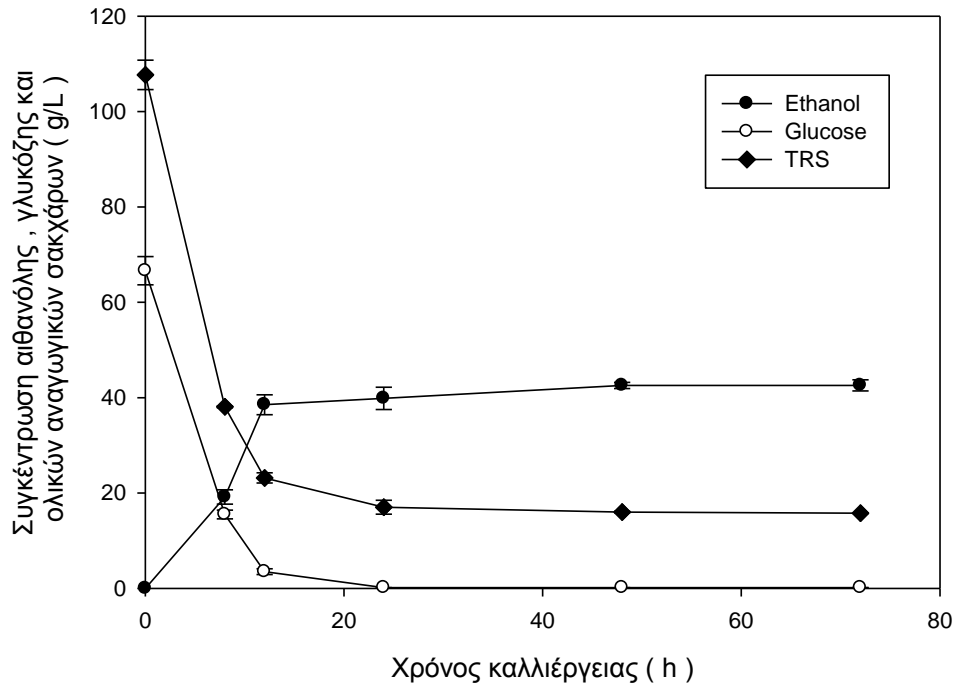
ενζύμων. Πρέπει να τονιστεί το γεγονός ότι τα αναγραφόμενα στα διαγράμματα και πίνακες ενζυμικά φορτία της γλυκοαμυλάσης αφορούν μονάχα την επιπλέον προστιθέμενη ποσότητα ενζύμου και όχι και αυτή που υπάρχει στο μείγμα του κυτταρινολυτικού ενζυμικού σκευάσματος (Στον Πίνακα Γ3 φαίνονται οι ενεργότητες των αμυλολυτικών ενζύμων που περιέχονται στο κυτταρινολυτικό σκεύασμα). Στον πίνακα Γ19 από την άλλη παρουσιάζεται το συνολικό ενζυμικό φορτίο για κάθε συνθήκη.



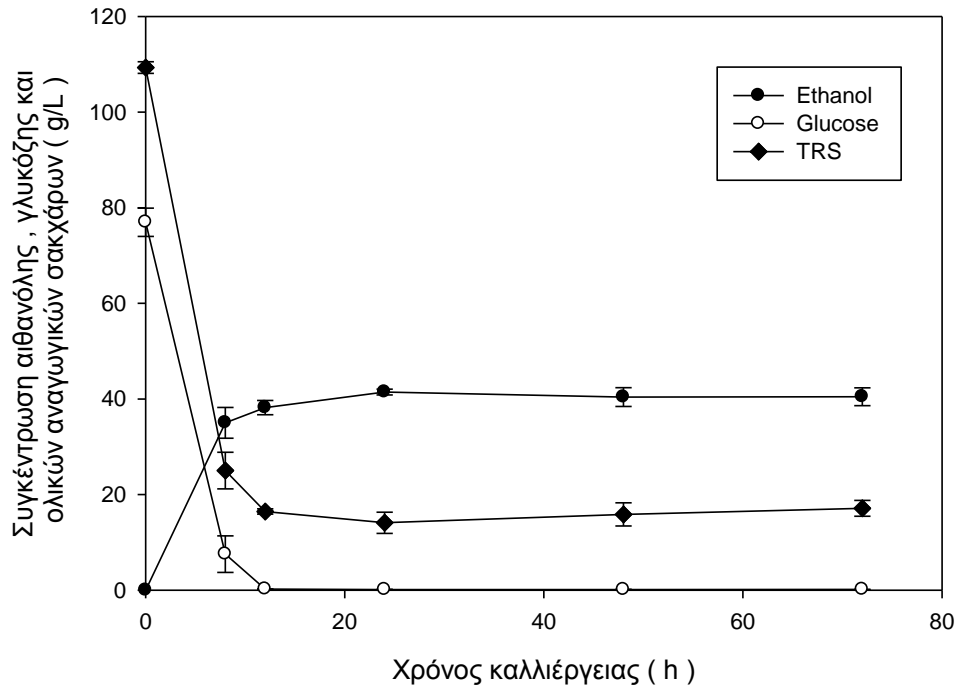
Διάγραμμα Γ18. Παραγωγή βιοαιθανόλης από διατροφικά απορρίμματα με εφαρμογή με ισοθερμοκρασιακής ταυτόχρονης σακχαροποίησης και ζύμωσης. **Συνθήκες :** αμυλολυτικό ενζυμικό σκεύασμα-ενζυμικό φορτίο: **Spirizyme-20 Units/g_{αμύλου}**, T: 65 °C, t_{προϋδρόλυσης} : 30 min , κυτταρινολυτικό ενζυμικό σκεύασμα-ενζυμικό φορτίο : Cellic® CTec 2 – **60 FPU/g_{κυτταρίνης}** , T: 50 °C, t_{προϋδρόλυσης} : 6 h, μικροοργανισμός ζύμωσης: *S. Cerevisiae*



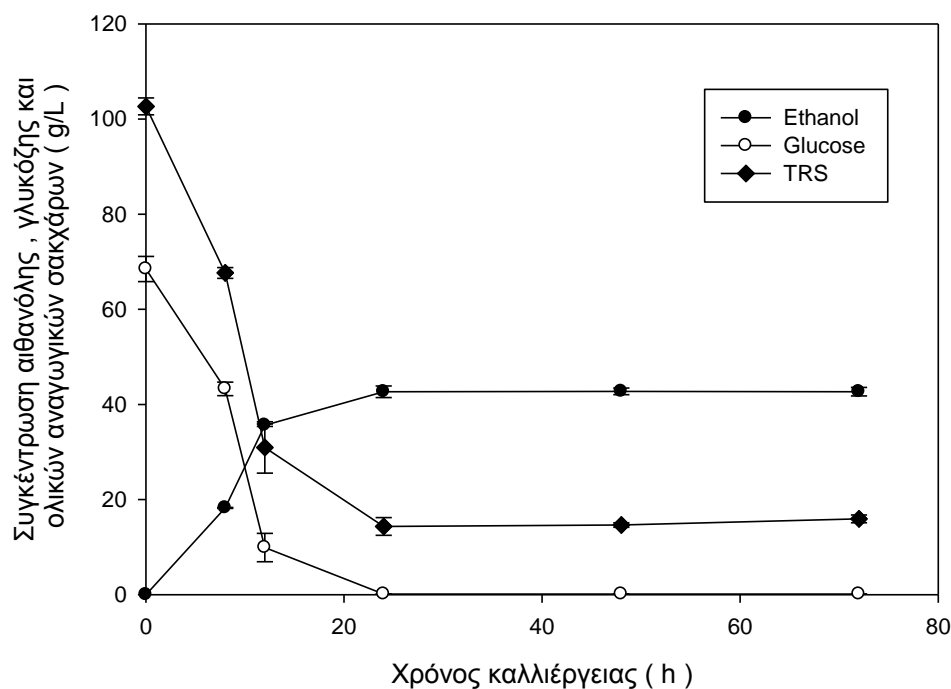
Διάγραμμα Γ19. Παραγωγή βιοαιθανόλης από διατροφικά απορρίμματα με εφαρμογή με ισοθερμοκρασιακής ταυτόχρονης σακχαροποίησης και ζύμωσης. Συνθήκες : αμυλολυτικό ενζυμικό σκεύασμα-ενζυμικό φορτίο: **Spirizyme-40 Units/g**αμύλου, T: 65 °C, $t_{\text{προϋδρόλυσης}}$: 30 min , κυτταρινολυτικό ενζυμικό σκεύασμα-ενζυμικό φορτίο : Cellic® CTec 2 – **60 FPU/g**κυτταρίνης , T: 50 °C, $t_{\text{προϋδρόλυσης}}$: 6 h, μικροοργανισμός ζύμωσης: *S. Cerevisiae*



Διάγραμμα Γ20. Παραγωγή βιοαιθανόλης από διατροφικά απορρίμματα με εφαρμογή με ισοθερμοκρασιακής ταυτόχρονης σακχαροποίησης και ζύμωσης. **Συνθήκες :** αμυλολυτικό ενζυμικό σκεύασμα-ενζυμικό φορτίο: **Spirizyme-60 Units/g_{αμύλου}**, T: 65 °C, $t_{\text{προϋδρόλωσης}}$: 30 min , κυτταρινολυτικό ενζυμικό σκεύασμα-ενζυμικό φορτίο : Cellic® CTec 2 – **60 FPU/g_{κυτταρίνης}** , T: 50 °C, $t_{\text{προϋδρόλωσης}}$: 6 h, μικροοργανισμός ζύμωσης: *S. Cerevisiae*



Διάγραμμα Γ21 . Παραγωγή βιοαιθανόλης από διατροφικά απορρίμματα με εφαρμογή με ισοθερμοκρασιακής ταυτόχρονης σακχαροποίησης και ζύμωσης. Συνθήκες : αμυλολυτικό ενζυμικό σκεύασμα-ενζυμικό φορτίο: **Spirizyme-80 Units/g**αμύλου, T: 65 °C, $t_{\text{προϋδρόλυσης}}$: 30 min , κυτταρινολυτικό ενζυμικό σκεύασμα-ενζυμικό φορτίο : Cellic® CTec 2 – **60 FPU/g**κυτταρίνης , T: 50 °C, $t_{\text{προϋδρόλυσης}}$: 6 h, μικροοργανισμός ζύμωσης: *S. Cerevisiae*



Διάγραμμα Γ22. Παραγωγή βιοαιθανόλης από διατροφικά απορρίμματα με εφαρμογή με ισοθερμοκρασιακής ταυτόχρονης σακχαροποίησης και ζύμωσης. **Συνθήκες :** αμυλολυτικό ενζυμικό σκεύασμα-ενζυμικό φορτίο: **Spirizyme-100 Units/g_{αμύλου}**, T: 65 °C, $t_{\text{προϋδρόλυσης}}$: 30 min , κυτταρινολυτικό ενζυμικό σκεύασμα-ενζυμικό φορτίο : Cellic® CTec 2 – **60 FPU/g_{κυτταρίνης}** , T: 50 °C, $t_{\text{προϋδρόλυσης}}$: 6 h, μικροοργανισμός ζύμωσης: *S. Cerevisiae*

Από τα άνωθεν διαγράμματα (Διαγράμματα Γ18-Γ22) είναι φανερό ότι η παραγωγή αιθανόλης ολοκληρώνεται εντός 12-24 ωρών. Η γλυκόζη αφομοιώνεται ταχύτατα από τη ζύμη και εξαντλείται εντός 12-24 ωρών καλλιέργειας.

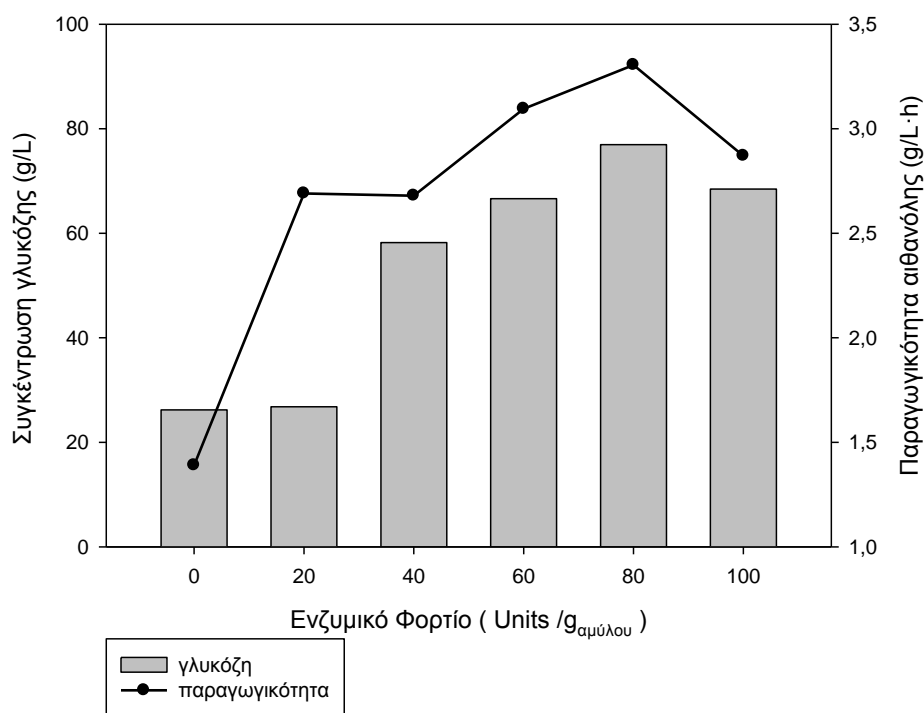
Στον πίνακα Γ19 παρουσιάζονται οι αποδόσεις της διεργασίας, η παραγωγικότητα καθώς και η παραγωγή αιθανόλης. Είναι φανερό πως η προσθήκη γλυκοαμυλάσης (20 Units/g αμύλου) επηρεάζει την συγκέντρωση της παραγόμενης αιθανόλης, αυξάνοντας την ποσότητα της κατά 28,83%. Περαιτέρω αύξηση του ενζυμικού φορτίου της γλυκοαμυλάσης δεν φαίνεται να έχει σημαντική επίδραση στην ποσότητα της παραγόμενης βιοαιθανόλης. Επιπροσθέτως, η παραγωγικότητα φαίνεται ότι αυξάνεται με την αύξηση της συγκέντρωσης του Spirizyme, καθώς το μέγεθος αυτό επηρεάζεται από την υδρόλυση και την συγκέντρωση των διαθέσιμων σακχάρων (Διάγραμμα Γ23). Στα δείγματα στα οποία έγινε προσθήκη Spirizyme η παραγωγικότητα ήταν 48-58% μεγαλύτερη συγκριτικά με εκείνα τα οποία περιείχαν μόνο Cellic® CTec 2 καθώς στα πρώτα η διαθέσιμη γλυκόζη μετά την ενζυμική υδρόλυση ήταν περισσότερη (Διάγραμμα Γ23) και επομένως ήταν ταχύτερα διαθέσιμη προς παραγωγή αιθανόλης.

Πίνακας Γ19. Αποτελέσματα παραγωγής βιοαιθανόλης από διατροφικά απορρίμματα με τη μέθοδο της μη ισοθερμοκρασιακής ταυτόχρονης σακχαροποίησης και ζύμωσης (NSSF)

Ενζυμικό Φορτίο* (Units /g _{αμύλου})	Παραγωγή αιθανόλης (g/L)	Παραγωγικότητα αιθανόλης (g/L·h)	Ποσοστό της μέγιστης θεωρητικής απόδοσης ^a	Απόδοση (g/ 100 g ξηρού υλικού)
19,56	28,76 ± 0,13	1,39 ± 0,01	47,51 ± 0,21	9,9 ± 0,04
39,56	40,41 ± 1,96	2,69 ± 0,06	67,29 ± 3,26	14,02 ± 0,68
59,56	37,80 ± 2,57	2,68 ± 0,13	62,82 ± 4,26	13,09 ± 0,89
79,56	42,55 ± 3,65	3,10 ± 0,18	70,85 ± 6,07	14,77 ± 1,27
99,56	41,44 ± 0,61	3,31 ± 0,12	69,13 ± 1,02	14,41 ± 0,21
119,56	42,74 ± 0,69	2,87 ± 0,01	70,60 ± 1,15	14,71 ± 0,24

* συνολικό φορτίο γλυκοαμύλασης (προστιθέμενη + υπάρχουσα στο Cellic®CTec)

^a επί της θεωρητικής απόδοσης με βάση τα άμεσα διαθέσιμα σάκχαρα (μη δομικά) και τα σάκχαρα από κυτταρίνη και άμυλο (δομικά)



Διάγραμμα Γ23 .Παραγόμενη γλυκόζη (g/L) μετά το τέλος της υδρόλυσης με ενζυμικά σκευάσματα Cellic® CTec 2 και Spirizyme και παραγωγικότητα (g/L·h) συναρτήσει του ενζυμικού φορτίου

Στους πίνακες Γ20-Γ29 , παρουσιάζεται η ανάλυση του στερεού υπολείμματος καθώς και της υγρής φάσης μετά το πέρας της ζύμωσης. Παρατηρείται ότι η ανάκτηση στερεού υπολείμματος παραμένει πρακτικά αμετάβλητη, ενώ ταυτόχρονα το περιεχόμενο στο στερεό, άμυλο είναι αρκετά μικρό.

Πίνακας 20. Σύσταση στερεού υπολείμματος βιομετατροπής διατροφικών απορριμμάτων. Συνθήκες: συγκέντρωση διατροφικών απορριμμάτων 30% β/ο, ενζυμικό φορτίο 60 FPU/g κυτταρίνης Cellic[®] CTec2 , Spirizyme-20 Units/g_{άμυλου} . Ανάκτηση στερεού: 36,04 ± 1,62 %

Συστατικό	(%, β/β, ξηρή βάση)*
Κυτταρίνη	8,96 ± 4,08
Άμυλο	2,02 ± 0,09

* g/100 g στερεού υπολείμματος

Πίνακας 21. Γλυκόζη, ολικά αναγωγικά σάκχαρα και διαλυτό άμυλο μετά το πέρας της βιομετατροπής των διατροφικών απορριμμάτων. Συνθήκες: συγκέντρωση διατροφικών απορριμμάτων 30% β/ο, ενζυμικό φορτίο 60 FPU/g κυτταρίνης Cellic[®] CTec2 , Spirizyme-20 Units/g_{άμυλου} .

Συστατικό	(g/L)
Γλυκόζη	0
Ολικά αναγωγικά σάκχαρα	16,06 ± 1,70
Διαλυτό άμυλο	< 0,05

Πίνακας Γ22. Σύσταση στερεού υπολείμματος βιομετατροπής διατροφικών απορριμμάτων. Συνθήκες: συγκέντρωση διατροφικών απορριμμάτων 30% β/ο, ενζυμικό φορτίο 60 FPU/g κυτταρίνης Cellic[®] CTec2 , Spirizyme-40 Units/g_{άμυλου} . Ανάκτηση στερεού: 37,39 ± 2,62 %

Συστατικό	(%, β/β, ξηρή βάση)*
Κυτταρίνη	10,06 ± 0,15
Άμυλο	1,95 ± 0,15

* g/100 g στερεού υπολείμματος

Πίνακας Γ23. Γλυκόζη, ολικά αναγωγικά σάκχαρα και διαλυτό άμυλο μετά το πέρας της βιομετατροπής των διατροφικών απορριμμάτων. Συνθήκες: συγκέντρωση διατροφικών απορριμμάτων 30% β/ο, ενζυμικό φορτίο 40 FPU/g κυτταρίνης Cellic[®] CTec2 , Spirizyme-20 Units/g_{άμυλου} .

Συστατικό	(g/L)
Γλυκόζη	0
Ολικά αναγωγικά σάκχαρα	15,24 ± 0,05
Διαλυτό άμυλο	< 0,05

Πίνακας Γ24. Σύσταση στερεού υπολείμματος βιομετατροπής διατροφικών απορριμάτων. Συνθήκες: συγκέντρωση διατροφικών απορριμμάτων 30% β/ο, ενζυμικό φορτίο 60 FPU/g κυτταρίνης Cellic[®] CTec2 , Spirizyme-60 Units/g_{άμυλου} . Ανάκτηση στερεού: 36,49 ± 3,83 %

Συστατικό	(%, β/β, ξηρή βάση)*
Κυτταρίνη	10,29 ± 2,07
Άμυλο	1,86 ± 0,02

* g/100 g στερεού υπολείμματος

Πίνακας Γ25. Γλυκόζη, ολικά αναγωγικά σάκχαρα και διαλυτό άμυλο μετά το πέρας της βιομετατροπής των διατροφικών απορριμάτων. Συνθήκες: συγκέντρωση διατροφικών απορριμμάτων 30% β/ο, ενζυμικό φορτίο 60 FPU/g κυτταρίνης Cellic[®] CTec2 , Spirizyme-60 Units/g_{άμυλου} .

Συστατικό	(g/L)
Γλυκόζη	0
Ολικά αναγωγικά σάκχαρα	15,78 ± 0,03
Διαλυτό άμυλο	< 0,05

Πίνακας Γ26. Σύσταση στερεού υπολείμματος βιομετατροπής διατροφικών απορριμάτων. Συνθήκες: συγκέντρωση διατροφικών απορριμμάτων 30% β/ο, ενζυμικό φορτίο 60 FPU/g κυτταρίνης Cellic[®] CTec2 , Spirizyme-80 Units/g_{άμυλου} . Ανάκτηση στερεού: 34,67 ± 2,62 %

Συστατικό	(%, β/β, ξηρή βάση)*
Κυτταρίνη	14,84 ± 3,82
Άμυλο	1,40 ± 0,10

* g/100 g στερεού υπολείμματος

Πίνακας Γ27. Γλυκόζη, ολικά αναγωγικά σάκχαρα και διαλυτό άμυλο μετά το πέρας της βιομετατροπής των διατροφικών απορριμάτων. Συνθήκες: συγκέντρωση διατροφικών απορριμμάτων 30% β/ο, ενζυμικό φορτίο 60 FPU/g κυτταρίνης Cellic[®] CTec2 , Spirizyme-80 Units/g_{άμυλου} .

Συστατικό	(g/L)
Γλυκόζη	0
Ολικά αναγωγικά σάκχαρα	17,12 ± 1,66
Διαλυτό άμυλο	< 0,05

Πίνακας Γ28. Σύσταση στερεού υπολείμματος βιομετατροπής διατροφικών απορριμμάτων. *Συνθήκες: συγκέντρωση διατροφικών απορριμμάτων 30% β/ο, ενζυμικό φορτίο 60 FPU/g κυτταρίνης Celllic[®] CTec2 , Spirizyme-100 Units/g_{αμύλου} . Ανάκτηση στερεού: 35,29 ± 0,80 %*

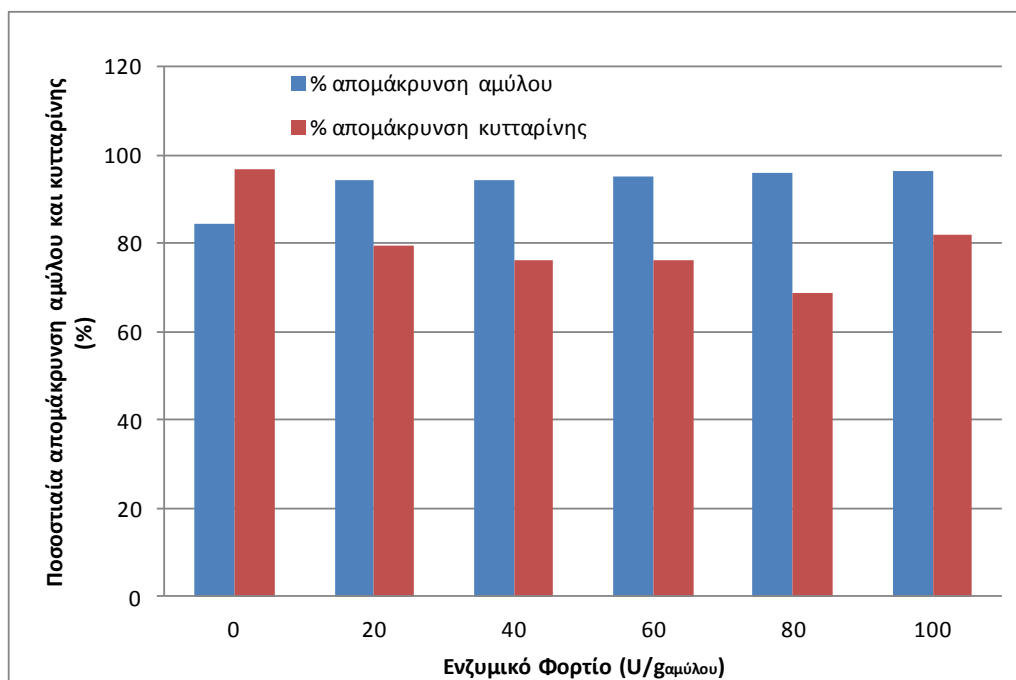
Συστατικό	(%, β/β, ξηρή βάση)*
Κυτταρίνη	8,07 ± 1,04
Άμυλο	1,34 ± 0,11

* g/100 g στερεού υπολείμματος

Πίνακας Γ29. Γλυκόζη, ολικά αναγωγικά σάκχαρα και διαλυτό άμυλο μετά το πέρας της βιομετατροπής των διατροφικών απορριμμάτων. *Συνθήκες: συγκέντρωση διατροφικών απορριμμάτων 30% β/ο, ενζυμικό φορτίο 60 FPU/g κυτταρίνης Celllic[®] CTec2 , Spirizyme-100 Units/g_{αμύλου} .*

Συστατικό	(g/L)
Γλυκόζη	0
Ολικά αναγωγικά σάκχαρα	15,94 ± 0,81
Διαλυτό άμυλο	< 0,05

Όσον αφορά την κυτταρίνη στο στερεό υπόλειμμα, παρατηρούνται κάποιες μεταβολές ανάλογα με την μεταβολή του ενζυμικού φορτίου, όμως η προσθήκη 20 και 100 Units/g_{αμύλου} γλυκοαμυλάσης φαίνεται να δίνει παρόμοια αποτελέσματα. Συνεπώς η αύξηση του ενζυμικού φορτίου της γλυκοαμυλάσης δεν διαφοροποιεί την απομάκρυνση της κυτταρίνης από το στερεό υπόλειμμα (Διάγραμμα Γ24).



Διάγραμμα Γ24. Ποσοστιαία απομάκρυνση πολυσακχαριτών από το στερεό υπόλειμμα συναρτήσεως του ενζυμικού φορτίου της γλυκοαμυλάσης. Όλα τα δείγματα περιέχουν 60 FPU/g κυτταρίνης Cellic[®] CTec2.

Ανάλυση της υγρής φάσης μετά το πέρας της ζύμωσης (Πίνακες Γ21, Γ23, Γ25, Γ27, Γ29) έδειξε ότι δεν υπάρχει γλυκόζη καθώς και υδατοδιαλυτό άμυλο ενώ η ποσότητα των ολικών αναγωγικών σακχάρων παραμένει σταθερή (περίπου 16-17 g/L).

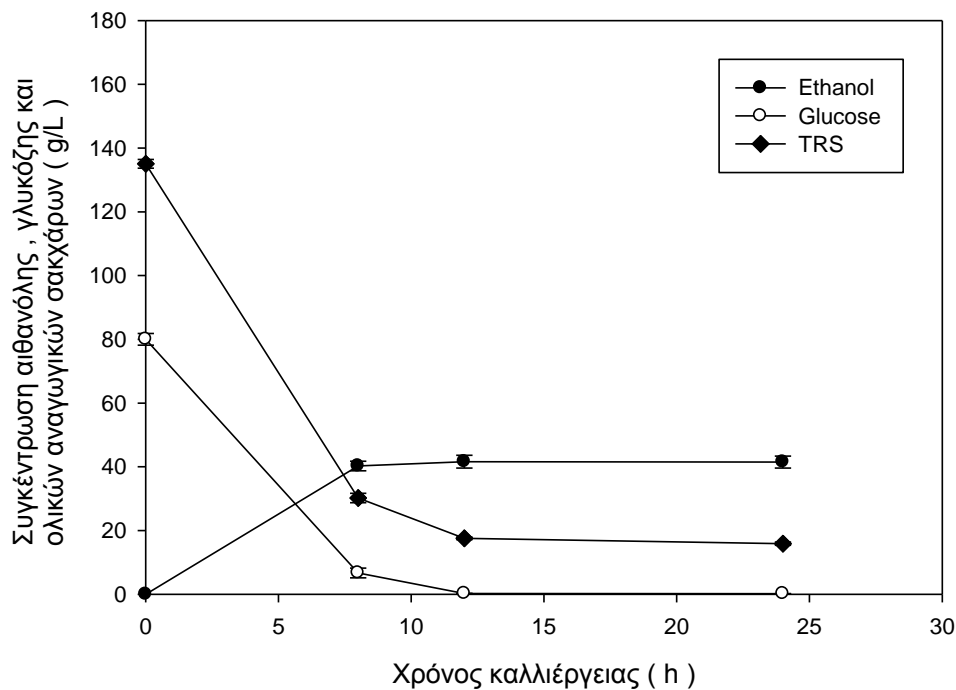
Το κυτταρινολυτικό σκεύασμα που χρησιμοποιήθηκε περιείχε και αμυλολυτικά ένζυμα (α-αμυλάση και γλυκοαμυλάση) με αποτέλεσμα η διάσπαση του αμύλου να πραγματοποιείται λόγω της ήδη υπάρχουσας στο Cellic[®] CTec 2 α-αμυλάσης.

Η γλυκοαμυλάση που προστέθηκε μετατρέπει τις δεξτρίνες που προέκυψαν ως προϊόν της δράσης των α-αμυλασών σε γλυκόζη, με αποτέλεσμα να συνεισφέρει στην αύξηση της αιθανόλης που παράγεται. Όπως διαπιστώθηκε όμως, η συνεισφορά αυτή έχει νόημα μόνο για την προσθήκη 20 Units /g_{αμύλου} Spirizyme .

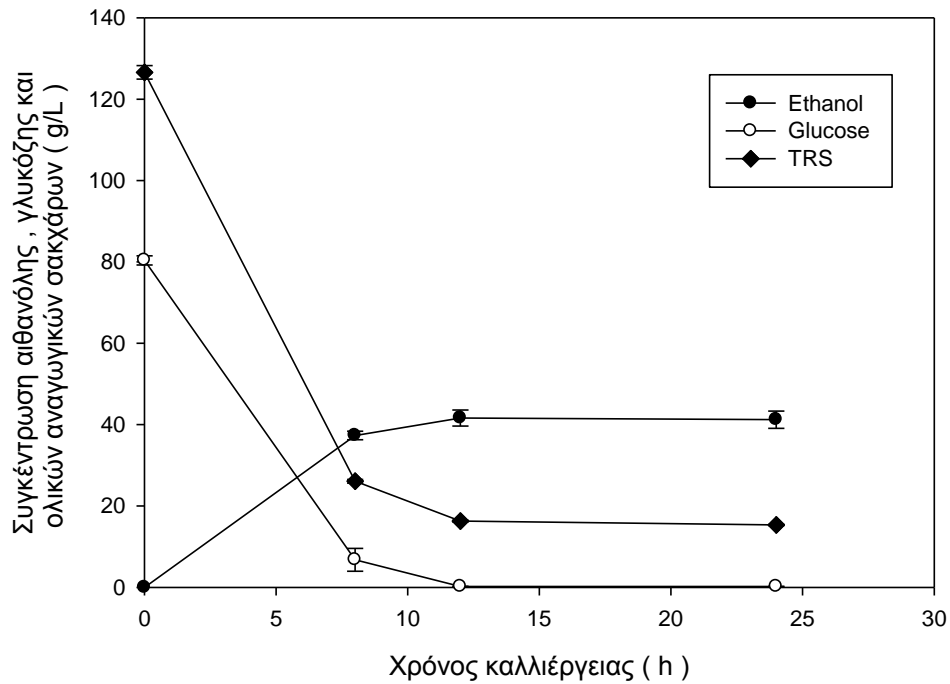
3.3 Επίδραση του ενζυμικού φορτίου α-αμυλάσης

Στα Διαγράμματα Γ25-Γ29 παρουσιάζονται τα αποτελέσματα της ζύμωσης , το υπόστρωμα της οποίας είχε υποστεί υδρόλυση με κυτταρολυτικά και αμυλολυτικά ένζυμα (γλυκοαμυλάση και α-αμυλάση). **Πρέπει να τονιστεί το γεγονός ότι τα αναγραφόμενα στα διαγράμματα και πίνακες ενζυμικά φορτία της γλυκοαμυλάσης και της α-αμυλάσης αφορούν μονάχα την επιπλέον προστιθέμενη ποσότητα ενζύμου και όχι και αυτή που υπάρχει στο μείγμα του κυτταρινολυτικού ενζυμικού σκευάσματος (Στον Πίνακα Γ3 φαίνονται οι**

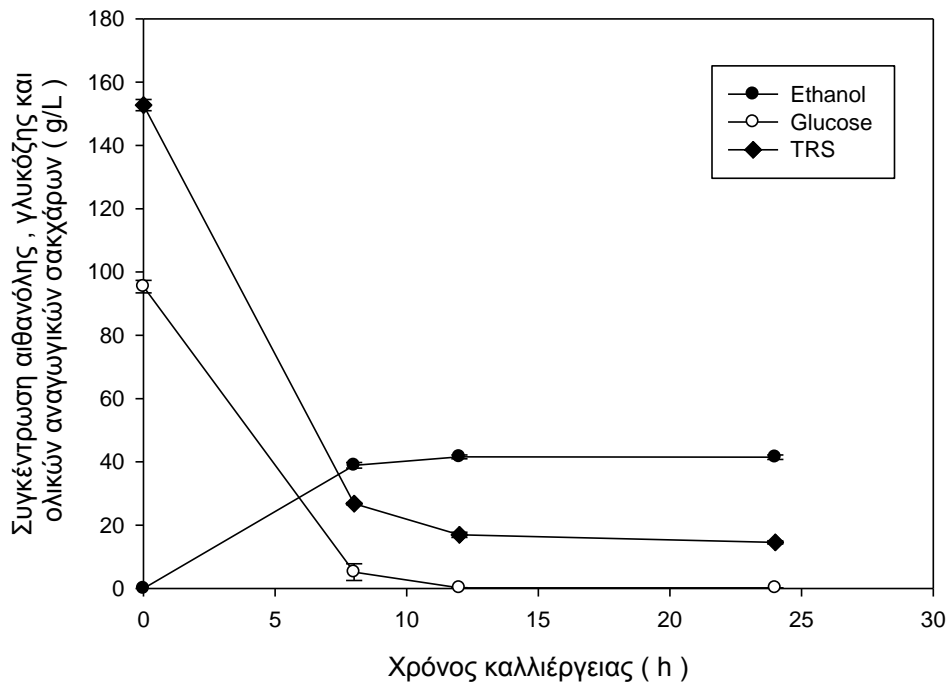
ενεργότητες των αμυλολυτικών ενζύμων που περιέχονται στο κυτταρινολυτικό σκεύασμα). Στον πίνακα Γ30 από την άλλη παρουσιάζεται το συνολικό ενζυμικό φορτίο για κάθε συνθήκη.



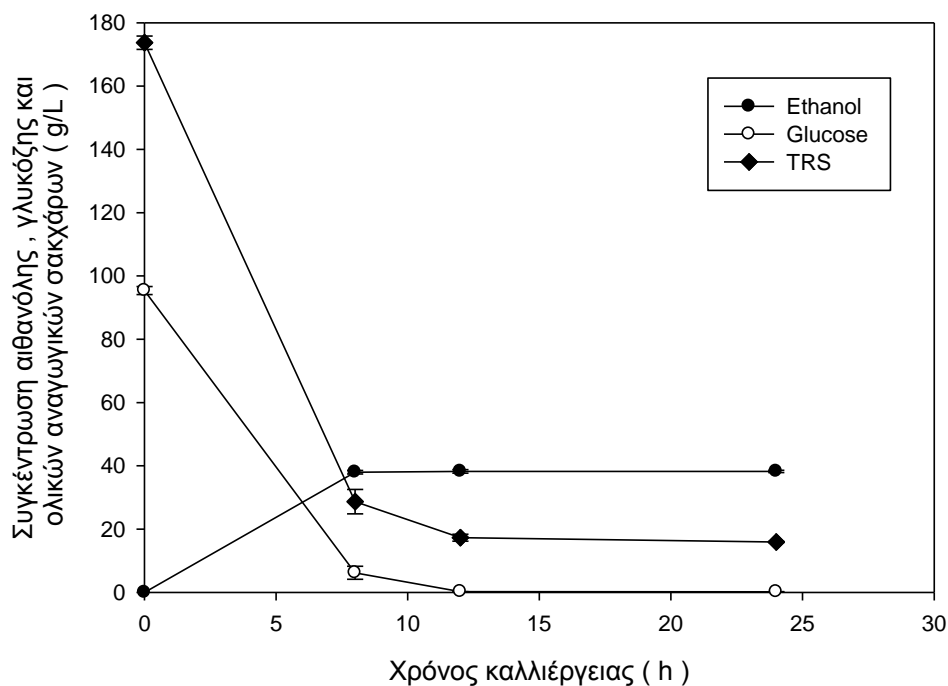
Διάγραμμα Γ25. Παραγωγή βιοαιθανόλης από διατροφικά απορρίμματα με εφαρμογή με ισοθερμοκρασιακής ταυτόχρονης σακχαροποίησης και ζύμωσης. Συνθήκες : αμυλολυτικό ενζυμικό σκεύασμα-ενζυμικό φορτίο: **Liquozyme- 2,65 Units/g_{αμύλου}**, T: 85 °C, t_{προϋδρόλυσης} : 30 min , αμυλολυτικό ενζυμικό σκεύασμα-ενζυμικό φορτίο: **Spirizyme-80 Units/g_{αμύλου}**, T: 65 °C, t_{προϋδρόλυσης} : 30 min , κυτταρινολυτικό ενζυμικό σκεύασμα-ενζυμικό φορτίο : **Cellic® C Tec 2 – 60 FPU/g_{κυτταρίνης}** , T: 50 °C, t_{προϋδρόλυσης} : 6 h, μικροοργανισμός ζύμωσης: *S. cerevisiae*



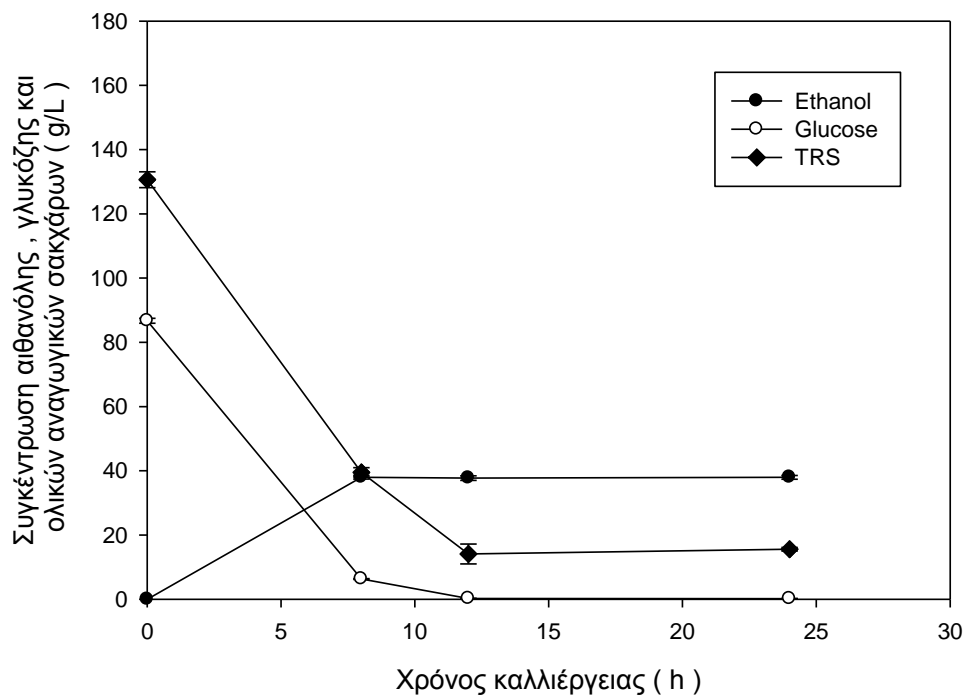
Διάγραμμα Γ26. Παραγωγή βιοαιθανόλης από διατροφικά απορρίμματα με εφαρμογή με ισοθερμοκρασιακής ταυτόχρονης σακχαροποίησης και ζύμωσης. **Συνθήκες :** αμυλολυτικό ενζυμικό σκεύασμα-ενζυμικό φορτίο: **Liquozyme- 5,3 Units/g_{αμύλου}**, T: 85 °C, $t_{\text{προϋδρόλυσης}}$: 30 min , αμυλολυτικό ενζυμικό σκεύασμα-ενζυμικό φορτίο: **Spirizyme-80 Units/g_{αμύλου}**, T: 65 °C, $t_{\text{προϋδρόλυσης}}$: 30 min , κυτταρινολυτικό ενζυμικό σκεύασμα-ενζυμικό φορτίο : **Cellic[®] CTec 2 – 60 FPU/g_{κυτταρίνης}** , T: 50 °C, $t_{\text{προϋδρόλυσης}}$: 6 h, μικροοργανισμός ζύμωσης: *S. cerevisiae*



Διάγραμμα Γ27. Παραγωγή βιοαιθανόλης από διατροφικά απορρίμματα με εφαρμογή με ισοθερμοκρασιακής ταυτόχρονης σακχαροποίησης και ζύμωσης. **Συνθήκες :** αμυλολυτικό ενζυμικό σκεύασμα-ενζυμικό φορτίο: **Liquozyme- 7,95 Units/g_{αμύλου}**, T: 85 °C, $t_{\text{προϋδρόλυσης}}$: 30 min , αμυλολυτικό ενζυμικό σκεύασμα-ενζυμικό φορτίο: **Spirizyme-80 Units/g_{αμύλου}**, T: 65 °C, $t_{\text{προϋδρόλυσης}}$: 30 min , κυτταρινολυτικό ενζυμικό σκεύασμα-ενζυμικό φορτίο : **Cellic® CTec 2 – 60 FPU/g_{κυτταρίνης}** , T: 50 °C, $t_{\text{προϋδρόλυσης}}$: 6 h, μικροοργανισμός ζύμωσης: *S. cerevisiae*



Διάγραμμα Γ28. Παραγωγή βιοαιθανόλης από διατροφικά απορρίμματα με εφαρμογή με ισοθερμοκρασιακής ταυτόχρονης σακχαροποίησης και ζύμωσης. **Συνθήκες :** αμυλολυτικό ενζυμικό σκεύασμα-ενζυμικό φορτίο: **Liquozyme- 10,6 Units/g_{αμούλου}**, T: 85 °C, $t_{\text{προϋδρόλυσης}}$: 30 min , αμυλολυτικό ενζυμικό σκεύασμα-ενζυμικό φορτίο: **Spirizyme-80 Units/g_{αμούλου}**, T: 65 °C, $t_{\text{προϋδρόλυσης}}$: 30 min , κυτταρινολυτικό ενζυμικό σκεύασμα-ενζυμικό φορτίο : **Cellic® CTec 2 – 60 FPU/g_{κυτταρίνης}** , T: 50 °C, $t_{\text{προϋδρόλυσης}}$: 6 h, μικροοργανισμός ζύμωσης: *S. cerevisiae*



Διάγραμμα Γ29. Παραγωγή βιοαιθανόλης από διατροφικά απορρίμματα με εφαρμογή με ισοθερμοκρασιακής ταυτόχρονης σακχαροποίησης και ζύμωσης. **Συνθήκες :** αμυλολυτικό ενζυμικό σκεύασμα-ενζυμικό φορτίο: **Liquozyme- 13,25 Units/g_{αμύλου}**, T: 85 °C, $t_{\text{προϋδρόλυσης}}$: 30 min , αμυλολυτικό ενζυμικό σκεύασμα-ενζυμικό φορτίο: **Spirizyme-80 Units/g_{αμύλου}**, T: 65 °C, $t_{\text{προϋδρόλυσης}}$: 30 min , κυτταρινολυτικό ενζυμικό σκεύασμα-ενζυμικό φορτίο : **Cellic[®] CTec 2 – 60 FPU/g_{κυτταρίνης}** , T: 50 °C, $t_{\text{προϋδρόλυσης}}$: 6 h, μικροοργανισμός ζύμωσης: *S. cerevisiae*

Από τα άνωθεν διαγράμματα (Γ25-Γ29) είναι φανερό ότι η παραγωγή αιθανόλης ολοκληρώνεται εντός 8-12 ωρών. Η γλυκόζη αφομοιώνεται ταχύτατα από τη ζύμη και εξαντλείται εντός 12 ωρών καλλιέργειας.

Με βάση τον πίνακα Γ30 συμπεραίνεται ότι η επιπλέον προσθήκη α-αμυλάσης (πέραν αυτής που περιέχεται στο Cellic[®] CTec 2) δεν επηρεάζει την ποσότητα της παραγόμενης αιθανόλης.

Πίνακας Γ30. Αποτελέσματα παραγωγής βιοαιθανόλης από διατροφικά απορρίμματα με τη μέθοδο της μη ισοθερμοκρασιακής ταυτόχρονης σακχαροποίησης και ζύμωσης (NSSF)

Ενζυμικό Φορτίο (Units /g _{αμύλου})*	Παραγωγή αιθανόλης (g/L)	Παραγωγικότητα αιθανόλης (g/L·h)	Ποσοστό της μέγιστης θεωρητικής απόδοσης ^a	Απόδοση (g/ 100 g ξηρού υλικού)
11,43	41,44 ± 0,61	3,31 ± 0,12	69,13 ± 1,02	14,41 ± 0,21
14,08	41,60 ± 2,01	5,03 ± 0,18	69,73 ± 3,37	14,53 ± 0,70
16,73	41,62 ± 1,97	4,67 ± 0,13	69,76 ± 3,31	14,54 ± 0,69
19,38	41,58 ± 0,59	4,86 ± 0,11	69,78 ± 1,00	14,54 ± 0,21
22,03	38,23 ± 0,57	4,73 ± 0,07	64,00 ± 0,96	13,33 ± 0,20
24,68	37,98 ± 0,70	4,75 ± 0,07	63,67 ± 1,17	13,27 ± 0,24

* συνολικό φορτίο α-αμυλάσης (προστιθέμενη + υπάρχουσα στο Cellic[®]CTec)

^a επί της θεωρητικής απόδοσης με βάση τα άμεσα διαθέσιμα σάκχαρα (μη δομικά) και τα σάκχαρα από κυτταρίνη και άμυλο (δομικά)

Βάσει των πινάκων (Γ30, Γ32, Γ34, Γ36, Γ38) , στους οποίους παρουσιάζεται η ανάλυση του στερεού υπολείμματος, είναι φανερό ότι η ανάκτηση του στερεού παραμένει σχεδόν σταθερή δεδομένου ότι η προσθήκη αυξανόμενης ποσότητας α-αμυλάσης δεν επηρέασε την υδρόλυση του υποστρώματος. Επιπλέον, κυτταρίνη και άμυλο παραμένουν επίσης σχεδόν σταθερά στο στερεό υπόλειμμα, ενισχύοντας την άποψη του ότι η προσθήκη της επιπλέον ποσότητας α-αμυλάσης τελικά δεν ήταν απαραίτητη.

Πίνακας Γ30. Σύσταση στερεού υπολείμματος βιομετατροπής διατροφικών απορριμμάτων. *Συνθήκες: συγκέντρωση διατροφικών απορριμμάτων 30% β/ο, ενζυμικό φορτίο 60 FPU/g κυτταρίνης Cellic[®]CTec2, Spirizyme-80 Units/g_{αμύλου}, 2,65 Units /g_{αμύλου} Ligozyme . Ανάκτηση στερεού: 29,96 ± 0,96 %*

Συστατικό	(%, β/β, ξηρή βάση)*
Κυτταρίνη	11,5 ± 0,09
Άμυλο	1,62 ± 0,05

* g/100 g στερεού υπολείμματος

Πίνακας Γ31. Γλυκόζη, ολικά αναγωγικά σάκχαρα και διαλυτό άμυλο μετά το πέρας της βιομετατροπής των διατροφικών απορριμμάτων. Συνθήκες: συγκέντρωση διατροφικών απορριμμάτων 30% β/ο, ενζυμικό φορτίο 60 FPU/g κυτταρίνης Cellic[®] CTec2 , Spirizyme-80 Units/g_{αμύλου} , 2,65 Units /g_{αμύλου} Liquozyme

Συστατικό	(g/L)
Γλυκόζη	0
Ολικά αναγωγικά σάκχαρα	15.29 ± 0,32
Διαλυτό άμυλο	< 0,05

Πίνακας Γ32. Σύσταση στερεού υπολείμματος βιομετατροπής διατροφικών απορριμμάτων. Συνθήκες: συγκέντρωση διατροφικών απορριμμάτων 30% β/ο, ενζυμικό φορτίο 60 FPU/g κυτταρίνης Cellic[®] CTec2 , Spirizyme-80 Units/g_{αμύλου} , 5,3 Units /g_{αμύλου} Liquozyme . Ανάκτηση στερεού: 29,77 ± 1,16 %

Συστατικό	(%, β/β, ξηρή βάση)*
Κυτταρίνη	10,88 ± 0,44
Άμυλο	1,64 ± 0,15

* g/100 g στερεού υπολείμματος

Πίνακας Γ33. Γλυκόζη, ολικά αναγωγικά σάκχαρα και διαλυτό άμυλο μετά το πέρας της βιομετατροπής των διατροφικών απορριμμάτων. Συνθήκες: συγκέντρωση διατροφικών απορριμμάτων 30% β/ο, ενζυμικό φορτίο 60 FPU/g κυτταρίνης Cellic[®] CTec2 , Spirizyme-80 Units/g_{αμύλου} , 5,3 Units /g_{αμύλου} Liquozyme

Συστατικό	(g/L)
Γλυκόζη	0
Ολικά αναγωγικά σάκχαρα	15.80 ± 1,92
Διαλυτό άμυλο	< 0,05

Πίνακας Γ34. Σύσταση στερεού υπολείμματος βιομετατροπής διατροφικών απορριμμάτων. Συνθήκες: συγκέντρωση διατροφικών απορριμμάτων 30% β/ο, ενζυμικό φορτίο 60 FPU/g κυτταρίνης Cellic[®] CTec2 , Spirizyme-80 Units/g_{αμύλου} , 7,95 Units /g_{αμύλου} Liquozyme . Ανάκτηση στερεού: 29,76 ± 0,04 %

Συστατικό	(%, β/β, ξηρή βάση)*
Κυτταρίνη	10,78 ± 0,65
Άμυλο	1,37 ± 0,19

* g/100 g στερεού υπολείμματος

Πίνακας Γ35. Γλυκόζη, ολικά αναγωγικά σάκχαρα και διαλυτό άμυλο μετά το πέρας της βιομετατροπής των διατροφικών απορριμμάτων. Συνθήκες: συγκέντρωση διατροφικών απορριμμάτων 30% β/ο, ενζυμικό φορτίο 60 FPU/g κυτταρίνης Cellic[®] CTec2 , Spirizyme-80 Units/g_{αμύλου} , 7,95 Units /g_{αμύλου} Liquozyme

Συστατικό	(g/L)
Γλυκόζη	0
Ολικά αναγωγικά σάκχαρα	16,17 ± 0,95
Διαλυτό άμυλο	< 0,05

Πίνακας Γ36. Σύσταση στερεού υπολείμματος βιομετατροπής διατροφικών απορριμμάτων. Συνθήκες: συγκέντρωση διατροφικών απορριμμάτων 30% β/ο, ενζυμικό φορτίο 60 FPU/g κυτταρίνης Cellic[®] CTec2 , Spirizyme-80 Units/g_{αμύλου} , 10,6 Units /g_{αμύλου} Liquozyme . Ανάκτηση στερεού: 29,96 ± 0,45 %

Συστατικό	(%, β/β, ξηρή βάση)*
Κυτταρίνη	11,71 ± 0,48
Άμυλο	1,46 ± 0,03

* g/100 g στερεού υπολείμματος

Πίνακας Γ37. Γλυκόζη, ολικά αναγωγικά σάκχαρα και διαλυτό άμυλο μετά το πέρας της βιομετατροπής των διατροφικών απορριμμάτων. Συνθήκες: συγκέντρωση διατροφικών απορριμμάτων 30% β/ο, ενζυμικό φορτίο 60 FPU/g κυτταρίνης Cellic[®] CTec2 , Spirizyme-80 Units/g_{αμύλου} , 10,6 Units /g_{αμύλου} Liquozyme

Συστατικό	(g/L)
Γλυκόζη	0
Ολικά αναγωγικά σάκχαρα	14,77 ± 0,52
Διαλυτό άμυλο	< 0,05

Πίνακας Γ38. Σύσταση στερεού υπολείμματος βιομετατροπής διατροφικών απορριμμάτων. Συνθήκες: συγκέντρωση διατροφικών απορριμμάτων 30% β/ο, ενζυμικό φορτίο 60 FPU/g κυτταρίνης Cellic[®] CTec2 , Spirizyme-80 Units/g_{αμύλου} , 13,25 Units /g_{αμύλου} Liquozyme . Ανάκτηση στερεού: 28,94 ± 0,61 %

Συστατικό	(%, β/β, ξηρή βάση)*
Κυτταρίνη	11,25 ± 0,84
Άμυλο	1,56 ± 0,01

* g/100 g στερεού υπολείμματος

Πίνακας Γ39. Γλυκόζη, ολικά αναγωγικά σάκχαρα και διαλυτό άμυλο μετά το πέρας της βιομετατροπής των διατροφικών απορριμμάτων. Συνθήκες: συγκέντρωση διατροφικών απορριμμάτων 30% β/ο, ενζυμικό φορτίο 60 FPU/g κυτταρίνης Cellic[®] CTec2 , Spirizyme-80 Units/g_{αμύλου} , 13,25 Units /g_{αμύλου} Liquozyme

Συστατικό	(g/L)
Γλυκόζη	0
Ολικά αναγωγικά σάκχαρα	14,47 ± 0,79
Διαλυτό άμυλο	< 0,05

Ανάλυση της υγρής φάσης μετά το πέρας της ζύμωσης (Πίνακες Γ31, Γ33, Γ35, Γ37, Γ39) έδειξε ότι δεν υπάρχει γλυκόζη καθώς και υδατοδιαλυτό άμυλο ενώ η ποσότητα των ολικών αναγωγικών σακχάρων παραμένει σταθερή (περίπου 16-17 g/L).

Δ. Συμπεράσματα

Σκοπός της παρούσας διπλωματικής εργασίας ήταν η μελέτη της επίδρασης του ενζυμικού φορτίου κυτταρινολυτικών ενζύμων, αμυλολυτικών ενζύμων ή και συνδυασμού αυτών στην παραγωγή βιαιθανόλης από διατροφικά απορρίμματα. Στόχος ήταν η παραγωγή αιθανόλης να ξεπεράσει το 4% (β/ο) (*Hahn-Hägerbal et al, 2006*), το οποίο είναι αναγκαίο προκειμένου να μειωθούν οι ενεργειακές απαιτήσεις του σταδίου απόσταξης και να καταστεί οικονομικότερη η διεργασία.

Σύμφωνα με τα αποτελέσματα, κατά την υδρόλυση των διατροφικών απορριμμάτων, αυξανόμενου του ενζυμικού φορτίου του κυτταρινολυτικού σκευάσματος παρατηρήθηκε ότι αυξάνονταν και η παραγωγή γλυκόζης. Η μέγιστη τιμή της βρέθηκε στα 100 FPU/g_{κυτταρίνης} ίση με 84,03 g/L. Γενικότερα όμως, επιδιώκεται η χρήση χαμηλών ενζυμικών φορτίων ούτως ώστε να διατηρείται σε χαμηλά επίπεδα το κόστος παραγωγής του βιοκαυσίμου και συνεπώς για το λόγο αυτό ενζυμικό φορτίο ίσο με 60 FPU/g_{κυτταρίνης} επιλέχθηκε για τα πειράματα βιομετατροπής που ακολούθησαν (*Balat, 2011*).

Σύμφωνα με τους **Ballesteros et al. (2010)**, η απόδοση της υδρόλυσης προκατεργασμένων δειγμάτων οργανικού κλάσματος αστικών στερεών αποβλήτων (ΑΣΑ) συγκέντρωσης υποστρώματος 10% και 20% (w/v) κυμάνθηκε από 37% έως 44% με χρήση ενζυμικού φορτίου 20-60 FPU/g κυτταρίνης, ποσοστό. Οι **Li et al. (2012)** ανέφεραν παραγωγή 21 g/L συνολικών αναγωγικών σακχάρων από λιγνινοκυτταρινούχο συμπύκνωμα ΑΣΑ συγκέντρωσης υποστρώματος 6% (w/v). Πρέπει να σημειωθεί ότι η εν λόγω συγκέντρωση επετεύχθη με χρήση ενζυμικού φορτίου ίσο με 90 Units κυτταρινάσης/g υποστρώματος.

Τα πειράματα βιομετατροπής των διατροφικών απορριμμάτων προσεγγίστηκαν με τη μέθοδο της μη ισοθερμοκρασιακής ταυτόχρονης σακχαροποίησης και ζύμωσης (Non Isothermal Simultaneous Saccharification and Fermentation, NSSF). Για την παραγωγή υψηλής συγκέντρωσης αιθανόλης >4% (β/ο) όπως ορίζεται βάσει ενεργειακών στόχων, θα πρέπει η συγκέντρωση του υποστρώματος να είναι αυξημένη (*Hahn-Hagerdal et al., 2006; Korppam et al, 2012*). Μια τέτοια συνθήκη όμως δημιουργεί προβλήματα ρεολογίας και ανάμιξης στην περίπτωση της ταυτόχρονης σακχαροποίησης και ζύμωσης, λόγω αύξησης του ιξώδους (*Jørgensen, et al., 2007; Hoyer et al., 2013*). Για να

ξεπερασθεί το πρόβλημα αυτό επιλέγεται η βιομετατροπή με χρήση της μη ισοθερμοκρασιακής ταυτόχρονης σακχαροποίησης και ζύμωσης (*Wu and Lee 1998*).

Στην παρούσα μελέτη, για την υδρόλυση των διατροφικών απορριμμάτων χρησιμοποιήθηκε συνδυασμός κυτταρινολυτικών και αμυλολυτικών ενζύμων ούτως ώστε να αξιοποιηθούν τα σάκχαρα τόσο της κυτταρίνης όσο και του αμύλου. Τα αποτελέσματα κατέδειξαν ότι το βέλτιστο ενζυμικό φορτίο του κυτταρινολυτικού σκευάσματος Cellic® CTec 2 ήταν τα 60 FPU/g_{κυτταρίνης} ενώ για τη γλυκοαμυλάση τα 80 Units/g_{αμύλου} εξαιτίας της αυξημένης παραγωγικότητας. Διαπιστώθηκε επίσης ότι η αυξανόμενη προσθήκη ενζύμου βελτιώνει την παραγωγή αιθανόλης μόνο στην περίπτωση του Cellic® CTec 2 και όχι της γλυκοαμυλάσης. Οι μέγιστες επιτευχθείσες τιμές αιθανόλης, παραγωγικότητας και διαθέσιμης γλυκόζης μετά το πέρας της υδρόλυσης για την εκάστοτε συνθήκη παρουσιάζονται στον *Πίνακα Δ1*. Είναι φανερό ότι η προσθήκη της γλυκοαμυλάσης βελτιώνει και σχεδόν διπλασιάζει τόσο την παραγωγικότητα όσο και την συγκέντρωση της παραγόμενης αιθανόλης σε σχέση με την προσθήκη αποκλειστικά κυτταρινολυτικού σκευάσματος. Όπως αναλύθηκε και παραπάνω, η προσθήκη της γλυκοαμυλάσης δίνει την δυνατότητα αξιοποίησης του αμύλου προς παραγωγή ζυμώσιμων σακχάρων. Από την άλλη πλευρά, η προσθήκη της α-αμυλάσης δεν μεταβάλλει τη συγκέντρωση της παραγόμενης αιθανόλης σε σύγκριση με τη δοκιμή βιομετατροπής στην οποία προστέθηκε η γλυκοαμυλάση. Αυτό συμβαίνει καθότι το Cellic® CTec 2 είναι μείγμα αμυλολυτικών ενζύμων με αποτέλεσμα η οποιαδήποτε επιπλέον προσθήκη α-αμυλάσης, η δράση της οποίας απελευθερώνει κατά κύριο λόγο δεξτρίνες και όχι γλυκόζη, να μην συνεισφέρει στην αύξηση της παραγόμενης βιοαιθανόλης. Παρά ταύτα παρατηρείται αύξηση της παραγωγικότητας της διεργασίας στην περίπτωση αυτή, μιας και η συγκέντρωση των διαθέσιμων ζυμώσιμων σακχάρων είναι ελαφρώς πιο μεγάλη σε σχέση με την προσθήκη μόνο Cellic® CTec 2 και Spiritzyme. Η μέγιστη τιμή αιθανόλης καθώς και παραγωγικότητας λαμβάνεται επομένως κατά την περίπτωση όπου έγινε προσθήκη και των τριών ενζυμικών σκευασμάτων όμως ως βέλτιστη συνθήκη μπορεί να χαρακτηριστεί η περίπτωση στην οποία η πρώτη ύλη υδρολύθηκε με κυτταρινολυτικό σκεύασμα και γλυκοαμυλάση.

Σύμφωνα με τους *Man et al. (2010)*, *Tang et al. (2008)* και *Cekmecelioglu και Uncu (2013)*, η παραγωγή αιθανόλης έφτασε τα 24.17 g/L, 29.9 g/L και 23.3 g/L αντίστοιχα, συγκεντρώσεις χαμηλότερες από αυτές της παρούσας εργασίας. Σε παρόμοια αποτελέσματα κατέληξαν και οι *Moon et al. (2009)*, οι οποίοι ρευστοποίησαν διατροφικά απορρίμματα με χρήση carbohydrases και αμυλογλυκοζιδασών και παρήγαγαν αιθανόλη συγκέντρωσης 29.1 g/L. Οι *Walker et al. (2012)* χρησιμοποίησαν διατροφικά απορρίμματα, υψηλής περιεκτικότητας σε άμυλο (καλαμπόκι, πατάτες και

ζυμαρικά). Παρ' όλα αυτά, παρήγαγαν πολύ χαμηλής συγκέντρωσης αιθανόλη (8 g/L). Οι **Kim et al. (2011)**, εφαρμόζοντας διεργασία SHF διαλείποντος έργου σε διατροφικά απορρίμματα, παρήγαγαν 0.43 g αιθανόλης/g συνολικών στερεών. Η αντίστοιχη απόδοση για διεργασία συνεχούς έργου ήταν 0.3 g αιθανόλης/g συνολικών στερεών και η παραγωγικότητα της διεργασίας έφτασε τα 1.18 g/(L·h), τιμή συγκρίσιμη με αυτήν της παρούσας μελέτης. Οι **Kim et al. (2008)**, εφάρμοσαν διεργασία SHF σε διατροφικά απορρίμματα, τα οποία αρχικά αναμείχθηκαν με νερό σε αναλογία 1:1 (v/v) και υπέστησαν μηχανική θραύση. Ακολούθως, αραιώθηκαν εκ νέου με νερό (1:1, v/v) και υδρολύθηκαν με χρήση εμπορικού σκευάσματος αμυλογλυκοζιδάσης (η διάρκεια της υδρόλυσης ήταν 4 h). Ελήφθη η υγρή φάση, στην οποία βρίσκονταν τα αναγωγικά σάκχαρα και χρησιμοποιήθηκε για την παραγωγή αιθανόλης με τη ζύμη *Sacchromyces cerevisiae* KA4. Η παραγωγή αιθανόλης ανήλθε σε 57.5 g/L από 120.1 g/L συνολικά αναγωγικά σάκχαρα, τα οποία προέκυψαν από την υδρόλυση. Υψηλότερη παραγωγή αιθανόλης (81.50 g/L) επετεύχθη από τους **Yan et al. (2011)**, οι οποίοι, χρησιμοποιώντας ελεύθερα κύτταρα ζύμης, υπέβαλαν σε ζύμωση, μέσω διεργασίας SHF διαλείποντος έργου, το προϊόν της υδρόλυσης διατροφικών απορριμμάτων, το οποίο περιείχε αναγωγικά σάκχαρα σε συγκέντρωση 163.22 g/L. Σύμφωνα με τους **Yan et al. (2010)** και **Yan et al. (2012)** κύτταρα ζύμης ακινητοποιημένα σε πηκτή αλγινικού ασβεστίου ή τροποποιημένο κοτσάνι καλαμποκιού (modified corn stalk) παρήγαγαν αιθανόλη συγκέντρωσης 87.91 g/L και 89.28 g/L αντίστοιχα, από ένα συμπυκνωμένο υδρόλυμα διατροφικών απορριμμάτων (περίπου 200 g/L αναγωγικά σάκχαρα). Διεργασίες SSF, τόσο διαλείποντος όσο και ημιδιαλείποντος έργου, έχουν εφαρμοστεί από πολλούς ερευνητές. Σύμφωνα με τους **Lissens et al. (2004)**, ταυτόχρονη σακχαροποίηση και ζύμωση προκατεργασμένων με υγρή οξείδωση οργανικών ΑΣΑ εμπλουτισμένων με άχυρο σίτου (8% ξηρού στερεού) με τη βοήθεια του ζυμομύκητα *Sacchromyces cerevisiae* απέδωσε συγκεντρώσεις αιθανόλης που κυμάνθηκαν από 16.5 έως 22 g/L για ενζυμικά φορτία από 5 έως 25 FPU / g ξηρού στερεού αντίστοιχα. Οι **Ballesteros et al. (2010)**, εφάρμοσαν διεργασία SSF ημιδιαλείποντος έργου σε πρώτη ύλη συγκέντρωσης υποστρώματος 25% (w/w). Χρησιμοποιώντας το οργανικό κλάσμα των ΑΣΑ, το οποίο είχε προηγουμένως υποστεί θερμική κατεργασία στους 160°C για 30 min, παρέλαβαν αιθανόλη συγκέντρωσης 30 g/L (60% της θεωρητικής απόδοσης). Οι **Wang et al. (2008)** εφάρμοσαν διεργασία SSF σε οικιακά απορρίμματα (kitchen waste), των οποίων η αρχική περιεκτικότητα σε ολικά σάκχαρα ήταν 62.68% (w/w). Για την υδρόλυση της πρώτης ύλης χρησιμοποίησαν αμυλογλυκοζιδάση ολικής ενεργότητας 120 Units/g και με τη βοήθεια του ζυμομύκητα *Sacchromyces cerevisiae*, παρήγαγαν αιθανόλη συγκέντρωσης 33.05 g/L. Η απόδοση της διεργασίας έφτασε τα 0.23 g αιθανόλης/g οικιακών απορριμμάτων (77% της θεωρητικής). Σύμφωνα με τους **Hong και Yoon (2011)**, υπολείμματα τροφών μετατράπηκαν σε αιθανόλη, μέσω διεργασίας

SSF, με χρήση μείγματος αμυλογλυκοζιδάσης, α-αμυλάσης και πρωτεάσης (ολικής ενεργότητας 1.2 AGU/g ξηρού υλικού) για την ενζυμική υδρόλυση του υλικού και ζύμης *Sacchromyces cerevisiae* για τη βιομετατροπή του. Τελικά, με την προσθήκη αζώτου, ελήφθη αιθανόλη συγκέντρωσης 36 g/L από υπολείμματα τροφών συγκέντρωσης υποστρώματος 10% (w/v). Η αντίστοιχη τιμή για παραγωγή αιθανόλης απουσία αζώτου ήταν 25 g/L . Οι **Koike et al. (2009)** ανέφεραν συγκέντρωση και απόδοση παραγόμενης αιθανόλης 44 g/L και 81.3% αντίστοιχα από απορρίμματα κυλικείων, εφαρμόζοντας επαναλαμβανόμενη (5 φορές) διεργασία SSF διαλείποντος έργου, με απομάκρυνση, κάθε φορά, του 80% του πολτοποιημένου υλικού, που είχε υποστεί ζύμωση. Η παραγωγικότητα της διεργασίας έφτασε τα 17.7 g/(L·h) . Οι **Kim et al. (2011)**, εφαρμόζοντας διεργασία SSF διαλείποντος έργου σε διατροφικά απορρίμματα, παρήγαγαν 0.31 g αιθανόλης/g συνολικών στερεών. Η αντίστοιχη απόδοση για διεργασία συνεχούς έργου ήταν 0.2 g αιθανόλης/g συνολικών στερεών και η παραγωγικότητα της διεργασίας έφτασε τα 0.8 g/(L·h) . Η βιβλιογραφία, για διεργασίες SSF διατροφικών απορριμάτων διαφορετικής προέλευσης, αναφέρει παραγωγικότητες, οι οποίες κυμαίνονται από 0.09 έως 0.8 g/(L·h) ,ενώ εφαρμόζοντας διεργασίες διαλείποντος έργου SHF, οι παραγωγικότητες κυμάνθηκαν από 0.49 έως 1.94 g/(L·h) . Υψηλές τιμές παραγωγικότητας (24-49.88 g/(L·h)) σημειώθηκαν κατά τη ζύμωση υδρολυμάτων διατροφικών απορριμάτων από ελεύθερα ή ακινητοποιημένα κύτταρα ζύμης σε διεργασίες συνεχούς έργου.

Πίνακας Δ1. Μέγιστες επιτευχθείσες τιμές αιθανόλης, παραγωγικότητας και διαθέσιμης γλυκόζης μετά το πέρας της υδρόλυσης σε συνάρτηση με το ενζυμικό φορτίο.

Cellic [®] CTec2 (FPU/g _{κυτταρίνης})	Γλυκοαμυλάση* (Units/g _{αμύλου})	A-αμυλάση** (Units/g _{αμύλου})	Αιθανόλη (g/L)	Παραγωγικότητα(g/L/h)	Διαθέσιμα ζυμώσιμα σάκχαρα (g/100 g)
60	19.56	11.43	28,76	1,39	26,20
60	99.56	11.43	41,44	3,31	76,95
60	99.56	14.08	41,60	5,03	79,99

* συνολική ενεργότητα γλυκοαμυλάσης (19.56 Units/g αμύλου περιεχόμενη στο Cellic[®] CTec 2, προστιθέμενη 80 Units/g αμύλου Spirizyme)

** συνολική ενεργότητα α-αμυλάσης (11.43 Units/g αμύλου περιεχόμενη στο Cellic[®] CTec 2, προστιθέμενη 2.65 Units/g αμύλου Liquozyme)

Πίνακας Δ2. Συγκριτικός πίνακας των αποτελεσμάτων της παρούσας μελέτης με τα αποτελέσματα της διεθνούς βιβλιογραφίας.

Πρώτη ύλη	Συγκέντρωση υποστρώματος	Υδρόλυση	Είδος διεργασίας/ Μικροοργανισμός	Συγκέντρωση αιθανόλης (Απόδοση)	Παραγωγικότητα	Αναφορά
Διατροφικά απορρίμματα	30 % (w/w) (υδροθερμικά προκατεργασμένα στους 120°C για 60 min παρουσία H ₂ SO ₄)	Cellic [®] CTec2 60 FPU/g _{κυτταρίνης} 99,65 γλυκοαμυλάση (Units/g _{αμύλου}) 11,43 α-αμυλάση (Units/g _{αμύλου})	Διαλείποντος έργου NSSF/ Saccharomyces cerevisiae	41,44 g/L	3,31 g/(L·h)	Παρούσα Εργασία
Οργανικό κλάσμα ΑΣΑ	25 % (w/w) (θερμικά προκατεργασμένα στους 160 °C για 30 min)	Κυτταρινάση (20 FPU/g κυτταρίνης)	Ημιδιαλείποντος έργου SSF / Saccharomyces cerevisiae	30 g/L (12 g/100 g στερεού)	0.42 g/(L·h)	Ballesteros et al. (2010)
Υπολείμματα τροφών (food residues)	10 % (w/v)	Αμυλογλυκοζιδάση, α-αμυλάση και πρωτεάση (1.2 AGU/g ξηρού υλικού)	SSF / Saccharomyces Cerevisiae	36 g/L (36 g/100 g στερεού) (παρουσία N ₂) 25 g/L (25 g/100 g στερεού) (απουσία N ₂)	0.75 g/(L·h) (παρουσία N ₂) 0.52 g/(L·h) (απουσία N ₂)	Hong and Youn (2011)
Διατροφικά Απορρίμματα	55.5 % (w/w)	Carbohydrase (1.6 FBG/g ξηρού στερεού)	Διαλείποντος έργου SHF και SSF/ Saccharomyces cerevisiae	43 g/100 g στερεού και (31 g/100 g στερεού)	-	Kim et al. (2011)

Διατροφικά Απορρίμματα	55.5 % (w/w)	Carbohydrase (1.6 FBG/g ξηρού στερεού)	Συνεχούς έργου SHF και SSF / Saccharomyces Cerevisiae	(30 g/100 g στερεού) και (20 g/100 g)	1.18 g/(L·h) και 0.8 g/(L·h)	Kim et al. (2011)
Οργανικό κλάσμα ΑΣΑ εμπλουτισμένο με άχυρο σίτου (8% του ξηρού στερεού)	10 % (w/v) (προκατεργασμένα με υγρή οξείδωση)	Κυτταρινάση και β-γλυκοζιδάση (5 – 25 FPU/g ξηρού στερεού) (Προϋδρόλυση με 5 FPU/g ξηρού στερεού)	SSF / Saccharomyces Cerevisiae	16.5 – 22 g/L (16.5 – 22 g/100 g στερεού)	0.09 – 0.11 g/(L·h)	Lissens et al. (2010)

E. Βιβλιογραφία

Alvira, P., Tomas-Pejo, E., Ballesteros, M., Negro, M.J., (2010) Pretreatment technologies for an efficient bioethanol production process based on enzymatic hydrolysis: A review. *Bioresource Technology* 101 4851–4861

Balat M., Balat H., Oz C., (2008) Progress in bioethanol processing. *Progress in Energy and Combustion Science*, 551–573

Balat, M.: Production of bioethanol from lignocellulosic materials via the biochemical pathway: A review. *Energ. Convers. Manage.* 52, 858-875 (2011)

Ballesteros, M., Sáez, F., Ballesteros, I., Manzanares, P., Negro, M.J., Martínez, J.M., Castañeda, R., Dominguez, J.M.O.: Ethanol production from the organic fraction obtained after thermal pretreatment of municipal solid waste. *Appl. Biochem. Biotechnol.* 161, 423-431 (2010)

Cekmecelioglu, D., Uncu, O.N., (2013), Kinetic modeling of enzymatic hydrolysis of pretreated kitchen wastes for enhancing bioethanol production. *Waste Manage.* 33, 735-739

Chang Rupp P.L., Schwartz S.J. Characterization of the Action of *Bacillus-Subtilis* Alpha-Amylase on Sweet-Potato Starch, Amylose and Amylopectin. *J. Food Biochem.*, 1988, Voi 12, 191-203.

Dordick J.S. Biocatalysis for industry. Plenum Press, NY, 1991 .

European Commission, (2015), Report From The Commission To The European Parliament, The Council, The European Economic And Social Committee And The Committee Of The Regions, Διαθέσιμο: http://smartcities-infosystem.eu/sites/default/files/concerto_files/concerto_presentations/Renewable_energy_progress_report%20.pdf

Franco J.M., Murado M.A., Siso M., Miron J., Gonzalez M.P. A HPLC Method for specific Determination of α -amylase and glucoamylase in complex Enzymatic preparations. Chromatogr., Voi 27, 328-332, 1989

Galbe, M., Zacchi, G., (2007) Pretreatment of Lignocellulosic Materials for Efficient Bioethanol Production. Adv Biochem Engin/Biotechnol 108: 41–65

Hahn-Hägerdal B, Galbe M, Gorwa-Grauslund MF, Lidén G, Zacchi G., 2006, Bioethanol--the fuel of tomorrow from the residues of today, Trends Biotechnol. Dec;24(12):549-56. Epub 2006 Oct 16.

Hamad E.Z., Ijaz W., Ali S.A., Hastaoglu M.A. Influence of polymer structure on protein partitioning in two-phase aqueous systems. Biotechnol. Prog., 1996, Voi 12, 173-177.

Helbert W., Schulein M., Henrissat B. Electron-Microscopic Investigation of the Diffusion of *Bacillus-Licheniformis* Alpha-Amylase into Com Starch Granules. *Int. J. Biol. Macromol.*, 1996, Vol 19, 165-169.

Hong Y.S., Yoon H.H., 2011, Ethanol production from food residues. *biomass and bioenergy* 35, 3271-3275

Hoseney R.C. , 1992 *Principles of Cereal science and technology*. 3d Ed., AACC Inc., Minnesota.

Hoyer K, Galbe M, Zacchi G, 2013, Influence of fiber degradation and concentration of fermentable sugars on simultaneous saccharification and fermentation of high-solids spruce slurry to ethanol. *Biotechnol Biofuels* 6(1):145

Jennifer L. Trumbo, Bruce E. Tonn, (2015), *Biofuels: A sustainable choice for the United States' energy future?* , *Technological Forecasting and Social Change*

Kim J.H., Lee J.C., Pak D. Feasibility of producing ethanol from food waste. *Waste Management* 2121-2125 (2011)

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

Koppram R., Albers E., Olsson L., 2012, Evolutionary engineering strategies to enhance tolerance of xylose utilizing recombinant yeast to inhibitors derived from spruce biomass, *Biotechnol Biofuels*

Kumar P., Barrett D.M., Delwiche M.J., and Stroeve P., (2009) Methods for Pretreatment of Lignocellulosic Biomass for Efficient Hydrolysis and Biofuel Production. *Ind. Eng. Chem. Res.*

Lissens, G., Klinken, H., Verstraete, W., Ahring, B., Thomsen, A.B.: Wet oxidation treatment of organic household waste enriched with wheat straw for simultaneous saccharification and fermentation into ethanol. *Environ. Technol.* 25, 647-655 (2004)

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

Matsumura M., Kobayashi J., Ishii S., Hirata J. Kinetics of Saccharification of Raw Starch by Glucoamylase. *J. Chem. Technol. Biotechnol.*, 1988, Voi 42, 51-67.

Meagher M.M., Reilly P.J. Kinetics of the hydrolysis of Di- and trisaccharides with *Aspergillus niger* glucoamylases I and II. *Biotechnol Bioeng.*, 1989. Voi 34, 689-693

Miranda M., Murado M.A., Sanroman A., Lema J.M. Mass transfer control of enzymatic hydrolysis of polysaccharides by glucoamylase. *Enzyme Microb. Technol.*, 1991, Voi 13, 142-147

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

Natarajan S., Sierks M.R. Identification of Enzyme-Substrate and Enzyme-Product Complexes in the Catalytic Mechanism of Glucoamylase from *Aspergillus awamori*. *Biochemistry*, 1996, Voi 35

Sanjib Kumar Karmee, Liquid biofuels from food waste: Current trends, prospect and limitation, *Renewable and Sustainable Energy Reviews* 53 (2016) 945–953

Sanjib Kumar Karmee , (2016), Liquid biofuels from food waste: Current trends, prospect and limitation, *RENEWABLE AND SUSTAINABLE ENERGY REVIEWS* 53: 945-953

Sanroman A., Murado M.A., Lema J.M. The Influence of Substrate Structure on the Kinetics of the Hydrolysis of Starch by Glucoamylase. *Appi. Biochem. Biotechnol.*, 1996, Voi 59, 329-336.

Schomburg D. and Salzmann M. (Eds). *Enzyme Handbook*. Springer-Verlag, Berlin, Heidelberg, 1991.

Shevelkova A.N., Sinitsyn A.P. A Study of the Synergistic Action Alpha-Amylase and Glucoamylase on Soluble and Insoluble Amylose. *Biochem. Moscow*, 1993, Voi 58, 1134- 1138

Shoubao Yan, Jun Li, Xiangsong Chen, Jingyong Wu, Pingchao Wang, Jianfeng Ye, Jianming Yao , 2010, Enzymatical hydrolysis of food waste and ethanol production from the hydrolysate , *Renewable Energy* , 1259

Stichnothe H., Azapagic A. , (2009) Bioethanol from waste: Life cycle estimation of the greenhouse gas saving potential. *Resources, Conservation and Recycling* 624–630

Sun Z.T., Henson C.A. A Quantitative Assessment of the Importance of Barley Seed Alpha-Amylase, Beta-Amylase, Debranching Enzyme, and Alpha-Glucosidase in Starch Degradation. *Arch. Biochem. Biophys.*, 1991, Voi 284, 298-305.

Taherzadeh, M.J., Karimi, K., (2008). Pretreatment of Lignocellulosic Wastes to Improve Ethanol and Biogas Production: A Review. *Int. J. Mol. Sci.*, 9, 1621-1651

Taherzadeh, M.J., Karimi, K., (2007) Enzyme-based Hydrolysis Processes for Ethanol from Lignocellulosic materials: A Review. *BioResources* 2(4), 707-738

Textor S.D., Hill G.A., Macdonald D.G., Stdenis E. Cold Enzyme Hydrolysis of WheatStarch Granules. *Can. J. Chem. Eng.*, 1998, Voi 76, 87-93 .

Tong, Z., Cheng, N., Pullammanappallil, P., (2013) Pretreatment of Ligno-cellulosic Biomass for Biofuels and Bioproducts.

Van Dyk J.S., R. Gama, D. Morrison, S. Swart, B.I. Pletschke, (2013). Renewable and Sustainable Energy Reviews. Renewable and Sustainable Energy Reviews 26; 521–531

Vavouraki Aikaterini Ioannis, Evangelos Michael Angelis, Michael Kornaros, (2013). Optimization of thermo-chemical hydrolysis of kitchen wastes. Waste Management, 740–745

Viikari L., J. Vehmaanperä, A. Koivula , Lignocellulosic ethanol: From science to industry, Biomass and Bioenergy Volume 46, November 2012, Pages 13–24

Vohra M., Manwar J., Manmode R., Padgilwar S., Patil S. , (2014), Bioethanol production: Feedstock and current technologies. Journal of Environmental Chemical Engineering, 573–584

Voumvoulakis, E. , Asimakopoulou, G. , Danchev, S. , Maniatis, Tsakanikas, A.,(2012) , Energy Policy, 50:161- 173

Yan, S., Chen, X., Wu, J., Wang, P., Ye, J., Yao, J.: Enzymatical hydrolysis of food waste and ethanol production from the hydrolysate. Renew. Energ. 36, 1259-1265 (2011)

Yan, S., Wang, P., Zhai, Z., Yao, J.: Fuel ethanol production from concentrated food waste hydrolysates in immobilized cell reactors by *Saccharomyces cerevisiae* H058. *J. Chem. Technol. Biotechnol.* 86, 731-738 (2010)

Yan, S., Chen, X., Wu, J., Wang, P.: Ethanol production from concentrated food waste hydrolysates with yeast cells immobilized on corn stalk. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 94, 829-838 (2012)

Yue-Qin Tang, Yoji Koike, Kai Liu, Ming-Zhe An, Shigeru Morimura, Xiao-Lei Wu, Kenji Kida, (2008). Ethanol production from kitchen waste using the flocculating yeast *Saccharomyces cerevisiae* strain KF-7. *BIOMASS AND BIOENERGY* 32; 1037–1045

Walker, K., Vadlani, P., Madl, R., Ugorowski, P., Hohn, K.L., Ethanol fermentation from food processing waste. *Environ. Prog. Sus. Energ.* doi: 10.1002/ep.11700 (2012)

Wu X., Wang D., Bean S.R., Wilson J.P., 2006a. Ethanol production from pearl millet using *Saccharomyces cerevisiae*. *Cereal Chemistry* 83, 127-131.

Wu X., R. Zhao, D. Wand, S.R. Bean, P.A. Seib, M.R. Tuinstra, M. Cambell and A. O'Brien. 2006. Effects of amylase, Corn Protein and Corn Fiber contents on production of ethanol from starch rich media. *Cereal Chemistry*, 83(5):569-575.

Zanin G.M., Demoraes F.F. Modeling Cassava Starch Saccharification with Amyloglucosidase. *Appl. Biochem. Biotechnol.*, 1996, Voi 57-8, 617-625.

Zhao R., S.R.Bean, D.Wang, S.H. Park, T.J. Schober, J.D. Wilson. 2008. Small-scale mashing procedure for predicting ethanol yield of sorgum grain. *Journal of Cereal Science* 49, 230-238.

Δόγαρης Ι. Σχεδιασμός ολοκληρωμένης διεργασίας παραγωγής βιοαιθανόλης από λιγνινοκυτταρινούχα υλικά. Διδακτορική Διατριβή. Αθήνα (2009)

Παπανικολάου Β., (2006): Μέθοδοι και υλικά ακινητοποίησης βιοκαταλυτών για την παραγωγή καύσιμης και βιομηχανικής αλκοόλης σε βιοαντιδραστήρα διαλείποντος έργου. Ερευνητική Εργασία Μεταπτυχιακού Διπλώματος Ειδίκευσης. Πάτρα (2006)

Χριστακόπουλος Χ., Τόπακας Ε., 2014, Βιοτεχνολογία Παραγωγής Βιοκαυσίμων