



ΕΘΝΙΚΟ ΜΕΤΣΟΒΙΟ ΠΟΛΥΤΕΧΝΕΙΟ
ΤΜΗΜΑ ΧΗΜΙΚΩΝ ΜΗΧΑΝΙΚΩΝ
ΤΟΜΕΑΣ ΣΥΝΘΕΣΗΣ & ΑΝΑΠΤΥΞΗΣ ΒΙΟΜΗΧΑΝΙΚΩΝ ΔΙΑΔΙΚΑΣΙΩΝ
ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΟ ΒΙΟΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑΣ



**Παραγωγή βιοαιθανόλης από διατροφικά
απορρίμματα με τη χρήση μικτής καλλιέργειας
του μύκητα *Fusarium oxysporum* και της ζύμης
*Saccharomyces cerevisiae***

Άγγελος Θεόδωρος Γεντίκης
Επιβλέπων καθηγητής: Δημήτρης Κέκος
Καθηγητής Ε.Μ.Π.

Αθήνα, Σεπτέμβριος 2017

Θα ήθελα να ευχαριστήσω θερμά τον επιβλέποντα καθηγητή μου, Δημήτρη Κέκκο και τη Δρ. Διομή Μαμμά για τη βοήθεια και την καθοδήγηση που μου προσέφεραν, κατά την εκπόνηση της παρούσας διπλωματικής εργασίας. Ακόμα, οφείλω ένα μεγάλο ευχαριστώ σε όλα τα μέλη του Εργαστηρίου Βιοτεχνολογίας για το άψογο κλίμα και συνεργασία που είχαμε σε όλο το διάστημα της παρουσίας μου στο εργαστήριο. Τέλος, θα ήθελα να ευχαριστήσω τα φιλικά και συγγενικά μου πρόσωπα, για την στήριξή τους τους τελευταίους μήνες.

Περιεχόμενα

| | |
|---|----|
| Περίληψη | 1 |
| Abstract | 3 |
| A. ΘΕΩΡΗΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ | 4 |
| 1. ΕΙΣΑΓΩΓΗ | 5 |
| 2. ΒΙΟΚΑΥΣΙΜΑ | 5 |
| 3. ΒΙΟΑΙΘΑΝΟΛΗ | 6 |
| 3.1. Γενικά | 6 |
| 3.2. Χρήση της βιοαιθανόλης ως καύσιμο κίνησης | 7 |
| 3.3. Πλεονεκτήματα και μειονεκτήματα της χρήσης βιοαιθανόλης | 7 |
| 3.4. Πρώτες ύλες παραγωγής βιοαιθανόλης | 8 |
| 3.4.1. Σακχαρούχες και αμυλούχες πρώτες ύλες | 8 |
| 3.4.2. Λιγνινοκυτταρινούχες πρώτες ύλες | 10 |
| 4. ΒΙΟΑΠΟΒΛΗΤΑ | 11 |
| 4.1. Γενικά | 11 |
| 4.2. Διατροφικά απορρίμματα | 12 |
| 4.3. Περιεχόμενα συστατικά των απορριμμάτων | 15 |
| 4.3.1. Άμυλο | 15 |
| 4.3.2. Κυτταρίνη-Ημικυτταρίνη-Λιγνίνη | 16 |
| 5. Παραγωγή βιοαιθανόλης | 18 |
| 5.1. Προκατεργασία διατροφικών απορριμμάτων | 18 |
| 6. Ενζυμική Υδρόλυση | 24 |
| 6.1. Παραγωγή υδρολυτικών ενζύμων-Μικροοργανισμοί | 27 |
| 6.2. Ζύμωση στερεάς κατάστασης (ΖΣΚ) για την παραγωγή ενζύμων | 28 |
| 6.2.1. Πλεονεκτήματα-μειονεκτήματα | 28 |
| 6.2.2. Επίδραση περιβαλλοντικών παραγόντων | 29 |
| 6.2.3. Επιλογή των μικροοργανισμών | 29 |
| 6.2.4. Εφαρμογές | 30 |
| 7. Αλκοολική ζύμωση | 31 |
| 7.1. Γενικά | 31 |
| 7.2. Τεχνολογίες παραγωγής βιοαιθανόλης | 31 |
| 7.2.1. Διακριτή υδρόλυση και ζύμωση (SHF) | 32 |
| 7.2.2. Ταυτόχρονη Σακχαροποίηση και Ζύμωση (SSF) | 32 |
| 7.2.3. Ενοποιημένη βιοδιεργασία (CBP) | 32 |
| 7.2.4. Μικροοργανισμοί στην αλκοολική ζύμωση | 33 |
| 8. Παραπροϊόντα αλκοολικής ζύμωσης | 35 |
| B. ΜΕΘΟΔΟΙ ΚΑΙ ΥΛΙΚΑ | 38 |
| 1. Όργανα | 39 |

| | | |
|-----|--|----|
| 2. | ΠΡΩΤΗ ΥΛΗ- ΧΗΜΙΚΑ ΑΝΤΙΔΡΑΣΤΗΡΙΑ | 39 |
| 3. | ΠΡΟΚΑΤΕΡΓΑΣΙΑ | 39 |
| 4. | ΜΙΚΡΟΟΡΓΑΝΙΣΜΟΙ..... | 39 |
| 5. | Αερόβια ανάπτυξη του μύκητα <i>F. oxysporum</i> F3 | 39 |
| 5.1 | Προκαλλιέργεια..... | 39 |
| 5.2 | Παραγωγή υδρολυτικών ενζύμων από το μύκητα <i>F. oxysporum</i> F3 με ζύμωση στερεάς κατάστασης..... | 40 |
| 6. | Αλκοολική ζύμωση με μικτή μικροβιακή καλλιέργεια | 40 |
| 7. | ΕΚΧΥΛΙΣΗ ΕΝΖΥΜΩΝ..... | 41 |
| 8. | ΕΝΖΥΜΙΚΗ ΥΔΡΟΛΥΣΗ | 41 |
| 9. | ΑΝΑΛΥΣΗ ΣΥΣΤΑΣΗΣ ΤΗΣ ΠΡΩΤΗΣ ΥΛΗΣ | 41 |
| 9.1 | Προσδιορισμός υγρασίας (NREL/TP-510-42618)..... | 41 |
| 9.2 | Προσδιορισμός υδατοδιαλυτών συστατικών (NREL/TP-510-42619)..... | 41 |
| 9.3 | Προσδιορισμός αναγωγικών σακχάρων..... | 42 |
| 9.4 | Προσδιορισμός συγκέντρωσης γλυκόζης με τη χρήση ειδικού εμπορικού διαγνωστικού σκευάσματος (kit) | 42 |
| 10. | ΜΕΤΡΗΣΗ ΕΝΕΡΓΟΤΗΤΑΣ ΕΝΖΥΜΩΝ | 43 |
| 11. | ΜΕΤΡΗΣΗ ΑΙΘΑΝΟΛΗΣ | 44 |
| 12. | ΚΟΚΚΟΜΕΤΡΙΚΗ ΔΙΑΒΑΘΜΙΣΗ ΜΕ ΚΟΣΚΙΝΑ | 44 |
| C. | ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ..... | 45 |
| 1. | Κοκκομετρική ανάλυση ξηρών Διατροφικών Απορριμμάτων (FW)..... | 46 |
| 2. | ΠΑΡΑΓΩΓΗ ΗΜΙΚΥΤΤΑΡΙΝΟΛΥΤΙΚΩΝ ΚΑΙ ΑΜΥΛΟΛΥΤΙΚΩΝ ΕΝΖΥΜΩΝ ΑΠΟ ΤΟ ΜΥΚΗΤΑ <i>F. oxysporum</i> F3 ΜΕ ΖΥΜΩΣΗ ΣΤΕΡΕΑΣ ΚΑΤΑΣΤΑΣΗΣ..... | 47 |
| 3. | Επίδραση της προκατεργασίας στην παραγωγή βιοαιθανόλης | 52 |
| 4. | Επίδραση του εξωγενώς προστιθέμενου ενζυμικού σκευάσματος Cellic® Cteq 2 | 59 |
| 3.1 | Ενζυμική υδρόλυση | 60 |
| 3.2 | Αλκοολική ζύμωση | 65 |
| D. | ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ | 71 |
| E. | ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ | 76 |

Περίληψη

Τα διατροφικά απορρίμματα ανήκουν στην ευρύτερη κατηγορία των βιοαποβλήτων και εξαιτίας της μεγάλης περιεκτικότητάς τους σε ζυμώσιμα σάκχαρα, αλλά και της αφθονίας τους, θεωρούνται κατάλληλα για να αντικαταστήσουν τις, μέχρι πρότινος, χρησιμοποιούμενες πρώτες ύλες στην παραγωγή βιοαιθανόλης. Σκοπός της παρούσας διπλωματικής εργασίας ήταν η μελέτη των παραμέτρων εκείνων που επηρεάζουν την υδρόλυση και τη ζύμωσή τους, προς παραγωγή αιθανόλης. Τα διατροφικά απορρίμματα, τα οποία χρησιμοποιήθηκαν για τη διεξαγωγή πειραμάτων της παρούσας εργασίας, περιείχαν σακχαρόζη (0.57%, β/β), άμυλο (10.68%, β/β) κυτταρίνη (10.31%, β/β), ημικυτταρίνη (11.32%, β/β), πρωτεΐνη (13.70%, β/β) και λιπαρά (12.26%, β/β).

Στα πλαίσια της παρούσας εργασίας, χρησιμοποιήθηκε ο μύκητας *Fusarium oxysporum* F3, ο οποίος έχει την ικανότητα να μεταβολίζει και τις πεντόζες πέραν των εξοζών προς αιθανόλη και επιπλέον να παράγει ένα ευρύ φάσμα ενζύμων για την υδρόλυση της πρώτης ύλης. Η αερόβια ανάπτυξη του μύκητα για την παραγωγή των ενζύμων πραγματοποιήθηκε σε Ζύμωση Στερεάς Κατάστασης (ΖΣΚ) χρησιμοποιώντας ως πηγές άνθρακα λιγνινοκυτταρινούχα υλικά, άχυρο σίτου, πίτουρο σίτου, άξονα σπάδικα αραβοσίτου και τα διατροφικά απορρίμματα. Το πίτουρο σίτου αποδείχθηκε το καταλληλότερο υπόστρωμα για την παραγωγή τόσο των ημικυτταρινολυτικών (ξυλανάση, 221.53U/g υποστρώματος, β-ξυλοζιδάση 0.70 U/g υποστρώματος), όσο και των αμυλολυτικών (α-αμυλάση 17.81 U/g υποστρώματος, γλυκοαμυλάση 0.11 U/g υποστρώματος) ενζύμων.

Η βιομετατροπή των διατροφικών απορριμμάτων σε αιθανόλη πραγματοποιήθηκε με μικτή μικροβιακή καλλιέργεια του μύκητα *F. oxysporum* F3 με τη ζύμη *S. cerevisiae* εφαρμόζοντας τη διεργασία Ταυτόχρονης Σακχαροποίησης και Ζύμωσης. Η χρήση μικτής μικροβιακής καλλιέργειας παρουρουσιάζει το πλεονέκτημα της άρσης της παρεμπόδισης της υδρολυτικής δράσης των ενζύμων από τα τελικά προϊόντα υδρόλυσης (σάκχαρα) γεγονός που οφείλεται στην ικανότητα της ζύμης να μεταβολίζει ταχύτατα τις εξόζες σε αιθανόλη.

Αρχικά, εξετάστηκε η επίδραση της προκατεργασίας θερμού νερού, διαφορετικής θερμοκρασίας (90, 100°C), παρουσία θεικού οξέος διαφορετικής περιεκτικότητας (1, 2, 3 % β/β) για χρονικό διάστημα των 3 ωρών. Αποδείχθηκε ότι η θερμοκρασία είναι ο παράγοντας που επηρεάζει σε μεγαλύτερο βαθμό τα επίπεδα της παραγόμενης αιθανόλης, ενώ η παρουσία του οξέος δε φαίνεται να προκαλεί σημαντικές μεταβολές στις τιμές της αιθανόλης. Πιο συγκεκριμένα, αύξηση της συγκέντρωσης του οξέος από 1% σε 3% (β/β, g H₂SO₄/100 g ξηρών ΔΑ) διατηρώντας τη θερμοκρασία προκατεργασίας στους 90°C δεν βελτιώνει την παραγόμενη αιθανόλη η οποία κυμάνθηκε στα 14 g/L. Αύξηση της θερμοκρασίας στους 100°C οδηγεί σε αύξηση της παραγόμενης αιθανόλης στα 16.33 g/L (5.96 g /100 g ξηρών ΔΑ, ή 31.78% της μέγιστης θεωρητικής απόδοσης) για συγκέντρωση οξέος 2% (β/β). Θα πρέπει να σημειωθεί ότι όπως και στην περίπτωση των 90°C οι διακυμάνσεις στην παραγόμενη αιθανόλη με αύξηση της συγκέντρωσης του οξέος ήταν μικρές.

Προκειμένου να αυξηθεί παραγόμενη αιθανόλη στη βέλτιστη προκατεργασία (100°C, 2% (β/β) θεικό οξύ για 3 h) μελετήθηκε η επίδραση εξωγενώς προστιθέμενου κυτταρινολυτικού σκευάσματος στο στάδιο τόσο της υδρόλυσης όσο και της βιομετα-

τροπής με δεδομένο ότι ολική ενεργότητα κυτταρινασών από το αερόβιο στάδιο ανάπτυξης του μύκητα είναι χαμηλή. Η προσθήκη Celllic® CTec 2 (εμπορικού σκευάσματος της εταιρείας Novozymes) σε φορτία 4-10 FPU/ g κυτταρίνης ΔΑ (συνολικό φορτίο 5.43-11.43 FPU/ g κυτταρίνης ΔΑ) επηρέασε το στάδιο της υδρόλυσης και μάλιστα αύξηση του προστιθέμενου ενζυμικού σκευάσματος οδήγησε σε αύξηση της απελευθερούμενης γλυκόζης. Το μέγιστο ποσοστό υδρόλυσης της κυτταρίνης, 32.58%, επιτεύχθηκε στη μεγαλύτερη προστιθέμενη ποσότητα Celllic® CTec 2 (10 FPU/g κυτταρίνης ΔΑ). Στο στάδιο της βιομετατροπής η προσθήκη του ενζυμικού σκευάσματος οδηγεί σε βελτίωση της παραγόμενης αιθανόλης. Η προσθήκη 8 FPU/g κυτταρίνης ΔΑ αυξάνει τη συγκέντρωση της αιθανόλης στα 22.38 g/L, τιμή που αντιστοιχεί στο 43.56% της μέγιστης θεωρητικής απόδοσης.

Abstract

Food waste (FW) is a kind of biowaste which, due to its high fermentable sugar content and its abundance, is considered suitable to replace the, previously used, raw materials for bioethanol production. The purpose of this thesis was to study the parameters, which affect the food waste enzymatic hydrolysis and fermentation for bioethanol production. Food waste, containing, among others, sucrose (0.57%, w/w), starch (10.68%, w/w), cellulose (10.31% w/w), hemicellulose (11.32% w/w), protein (13.70%, w/w) and lipids (12.26%, w/w) was used in hydrolysis and fermentation experiments.

In the present study, the fungus *F. oxysporum* F3 was used, which was the ability to metabolize hexose and pentose sugars as well as to produce a wide range of enzymes for the hydrolysis of the feedstock. The fungus was grown aerobically in Solid State Fermentation using wheat straw, wheat bran, corn cobs and Food Waste as carbon sources. Wheat bran was found to be the most suitable substrate for production of both hemicellulolytic (xylanase 221.53 U/g substrate, β -xylosidase 0.70 U/g substrate) and amylolytic (α -amylase 17.81 U/g substrate, glucoamylase 0.11 U/g substrate) enzymes.

Bioethanol production from food wastes was conducted by a mixed microbial culture of the fungus *F. oxysporum* F3 and the yeast *S. cerevisiae* applying Simultaneous Saccharification and Fermentation process.

Initially, the effect of hot-water pretreatment using different temperature (90, 100°C) in the presence of different concentrations of sulfuric acid (1, 2, 3% w/w), for a 3 hour period, was examined. It has been shown that temperature is the factor that affects the most the levels of the produced ethanol, whereas the presence of the acid does not appear to cause significant changes in ethanol values. Highest ethanol production, 16.33 g/L (corresponding to 31.78% of the maximum theoretical yield) was achieved when food wastes were pretreated at 100°C in the presence of 2% (w/w) sulfuric acid.

In order to increase bioethanol production, the effect of exogenous addition of cellulolytic formulation (Cellic® Cteq 2) was investigated both in hydrolysis and fermentation steps. Food waste was pretreated at optimal temperature and acid conditions found. Cellic® Cteq 2 was added at 4-10 FPU/g cellulose FW (total enzyme loading 5.43-11.43 FPU/g cellulose FW). Maximum cellulose hydrolysis, 32.58%, was achieved at 10 FPU/g cellulose FW.

The addition of Cellic® Cteq 2, significantly affected the biotransformation step by increasing both the produced ethanol and the yield of the process. Indeed, with the addition of 8 FPU / g cellulose of Cellic® Cteq 2, ethanol was produced at 22.38 g / L. This value corresponds to 43.56% of the maximum theoretical yield.

A. ΘΕΩΡΗΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ

1. ΕΙΣΑΓΩΓΗ

Ο άνθρωπος, ανέκαθεν, ήταν και θα είναι δραστήριο ον με τάση να εξελίσσεται για την επιβίωσή του αλλά και τη βελτίωση της ποιότητας της ζωής του. Στην προσπάθειά του να καλύψει την ανάγκη για εξέλιξη στο πέρασμα των αιώνων, εκμεταλλεύτηκε τα αγαθά που του παρέχει η φύση, προβαίνοντας σε μεγάλες ανακαλύψεις για την ανθρωπότητα. Ωστόσο, η εκμετάλλευση όλων των πόρων γινόταν υπέρμετρα και αλόγιστα, με αποτέλεσμα πολλοί από αυτούς να μη βρίσκονται πλέον σε αφθονία.

Εκτός όμως της ελάττωσης των φυσικών πόρων, η χρήση και η καύση πόρων, όπως το πετρέλαιο και άλλων ουσιών με βάση τον άνθρακα, συνετέλεσε στην εκπομπή επιβλαβών, για το περιβάλλον και τον άνθρωπο ουσιών, με χαρακτηριστικότερο και πιο γνωστό παράδειγμα το διοξείδιο του άνθρακα. Η βιομηχανική επανάσταση αποτέλεσε το πρώτο τρανταχτό παράδειγμα υπέρμετρης χρήσης γαιανθράκων, με αντίστοιχη επίπτωση στο περιβάλλον. Μάλιστα, η συμπεριφορά αυτή των βιομηχανιών, αλλά και ιδιωτών, συνεχιζόταν μέχρι και πολύ πρόσφατα, οπότε και οι πρώτες περιβαλλοντικές μελέτες ήρθαν στη δημοσιότητα. Όταν έγινε αντιληπτό το μέγεθος της ζημιάς που μπορεί να προκαλέσει στο περιβάλλον η, σχεδόν αποκλειστική, χρήση του πετρελαίου ως πηγή ενέργειας, για το σύνολο των ανθρωπίνων δραστηριοτήτων σε καθημερινή βάση, κατέστησε επιτακτική την ανάγκη για τις κυβερνήσεις, αλλά και την επιστημονική κοινότητα, να μελετήσουν και να εφαρμόσουν νέες μεθόδους για την παραγωγή ενέργειας.

Το ενδιαφέρον αμέσως επικεντρώθηκε στα μέσα μεταφοράς τα οποία χρησιμοποιούσαν αποκλειστικά ορυκτά καύσιμα τα οποία, με τη σειρά τους, αποτελούν τη νούμερο ένα πηγή εκπομπής διοξειδίου του άνθρακα στην ατμόσφαιρα, με τις γνωστές επιπτώσεις στο περιβάλλον. Η Ευρωπαϊκή Ένωση από την πλευρά της, στοχεύει έως το 2021, σε μείωση των εκπεμπόμενων, επιβλαβών για το φαινόμενο του θερμοκηπίου, αερίων στα επίπεδα των 95g/km, ενώ οι αριθμοί αυτοί σχεδιάζεται να μειωθούν περαιτέρω, στα επίπεδα των 68 με 78g/km έως το 2025. Με αύξηση των τιμών στο πετρέλαιο και στη βενζίνη, αλλά και με πρόστιμα σε ιδιώτες που χρησιμοποιούν αυτοκίνητα που δεν πληρούν τις επιθυμητές προδιαγραφές, η Ευρωπαϊκή Ένωση, στοχεύει στη μείωση της εκπεμπόμενης ποσότητας του CO₂, της τάξης του 22%, έως το 2030. (European Commission, Climate Action)

Έτσι, οι επιστήμονες στράφηκαν στη χρήση βιοκαυσίμων για καύση από τα μέσα μεταφοράς. Το βιοντήζελ και η βιοαιθανόλη έγιναν αμέσως αποδεκτά από τις κυβερνήσεις και τις βιομηχανίες στην προσπάθειά τους να ικανοποιήσουν την ανάγκη για ασφαλέστερο περιβάλλον και καλύτερη ποιότητα ζωής των πολιτών τους.

2. ΒΙΟΚΑΥΣΙΜΑ

Τα βιοκαύσιμα είναι υγρά ή αέρια καύσιμα κίνησης τα οποία παρασκευάζονται από βιομάζα, και τα οποία, τα τελευταία χρόνια, στοχεύεται να αντικαταστήσουν τα συμβατικά καύσιμα όπως η βενζίνη και το πετρέλαιο κίνησης. Στην κατηγορία των βιοκαυσίμων, σύμφωνα με το Υπουργείο Περιβάλλοντος και Ενέργειας, ανήκουν τα ακόλουθα:

✓ *Βιοντήζελ*: αποτελεί πετρέλαιο βιολογικής προέλευσης και στην ουσία περιλαμβάνει τους μεθυλεστέρες λιπαρών οξέων που παράγονται από φυτικά ή ζωικά έλαια και λίπη. Η ποιότητά του είναι ισάξια με του πετρελαίου ντήζελ.

- ✓ *Βιοαιθανόλη*: πρόκειται για την αιθανόλη που παράγεται από βιομάζα ή από βιοαποικοδομήσιμο κλάσμα αποβλήτων και μπορεί να χρησιμοποιείται σε μείγματα με βενζίνη ή και αουτούσια.
- ✓ *Βιοαέριο*: αποτελεί το καύσιμο αέριο που παράγεται από Βιομάζα ή βιοαποικοδομήσιμο κλάσμα βιομηχανικών και αστικών αποβλήτων, το οποίο μπορεί να καθαριστεί και να αναβαθμιστεί σε ποιότητα φυσικού αερίου.
- ✓ *Βιομεθανόλη*: πρόκειται για τη μεθανόλη που παράγεται από Βιομάζα
- ✓ *Βιο-ETBE*: είναι ο αιθυλο-τριτοταγής-βουτυλαιθέρας (ETBE) που παράγεται από βιοαιθανόλη για χρήση ως Βιοκαύσιμο. Το κατ' όγκο ποσοστό Βιο-ETBE που υπολογίζεται ως Βιοκαύσιμο είναι 47% επί του συνόλου του.
- ✓ *Βιο-MTBE*: είναι ο μεθυλο-τριτοταγής-βουτυλαιθέρας (MTBE) που παράγεται από μεθανόλη για χρήση ως Βιοκαύσιμο. Το κατ' όγκο ποσοστό Βιο-MTBE που υπολογίζεται ως Βιοκαύσιμο είναι 36% επί του συνόλου του.

3. ΒΙΟΑΙΘΑΝΟΛΗ

3.1. Γενικά

Η βιοαιθανόλη είναι, ίσως, το πιο ευρέως χρησιμοποιούμενο εναλλακτικό καύσιμο κίνησης στον κόσμο, Οι μεγαλύτεροι παραγωγοί αιθανόλης στον κόσμο είναι η Βραζιλία και οι ΗΠΑ, οι οποίες μαζί παράγουν περισσότερο από το 65% της παγκόσμιας παραγωγής αιθανόλης. Στη Βραζιλία συγκεκριμένα, το 60% της παραγόμενης αιθανόλης πωλείται σε ενυδατωμένη μορφή (93% αιθανόλη και 7% νερό) που αντικαθιστά εξ' ολοκλήρου το πετρέλαιο στους κινητήρες των αυτοκινήτων. Το υπόλοιπο 40% ,που είναι απαλλαγμένο από νερό, αναμειγνύεται με πετρέλαιο έως και 24%.

Η Ευρώπη συνεισφέρει στην παγκόσμια παραγωγή αιθανόλης σε ποσοστό της τάξης του 13% με ετήσια παραγωγή 5050 εκατομμύρια λίτρα για το 2016. Ένας αναλυτικός Πίνακας των χωρών της Ευρωπαϊκής Ένωσης με τις αντίστοιχες ποσότητες παραγόμενης αιθανόλης από το 2010 έως το 2016 παρουσιάζεται παρακάτω (Global Agricultural Information Network, 2016):

Πίνακας 1: Αναλυτικός πίνακας χωρών Ευρωπαϊκής Ένωσης και της ετήσιας παραγωγής αιθανόλης σε εκατομμύρια λίτρα. (European Commission, Eurostat, Global Trade Atlas, ePure και EU FAS Posts)

| <i>Έτος/Χώρα</i> | <i>2010</i> | <i>2011</i> | <i>2012</i> | <i>2013</i> | <i>2014</i> | <i>2015</i> | <i>2016</i> |
|-------------------------|-------------|-------------|-------------|-------------|-------------|-------------|-------------|
| <i>Γαλλία</i> | 942 | 846 | 829 | 995 | 975 | 968 | 970 |
| <i>Γερμανία</i> | 765 | 730 | 776 | 851 | 920 | 937 | 950 |
| <i>Ουγγαρία</i> | 190 | 190 | 291 | 392 | 456 | 637 | 640 |
| <i>Βέλγιο</i> | 315 | 400 | 410 | 451 | 557 | 560 | 560 |
| <i>Ολλανδία</i> | 100 | 275 | 421 | 524 | 520 | 520 | 450 |
| <i>Ισπανία</i> | 471 | 462 | 381 | 442 | 453 | 494 | 400 |
| <i>Ηνωμένο Βασίλειο</i> | 352 | 89 | 215 | 278 | 329 | 253 | 250 |
| <i>Πολωνία</i> | 194 | 167 | 213 | 235 | 181 | 214 | 241 |
| <i>Αυστρία</i> | 199 | 216 | 216 | 223 | 230 | 235 | 235 |
| <i>Σύνολο</i> | 4268 | 4392 | 4658 | 5000 | 5250 | 5190 | 5050 |

Από σκοπιάς χρήσης της βιοαιθανόλης, η Σουηδία κρατάει τα σκήπτρα, παρά το γεγονός ότι η περισσότερη αιθανόλη εισάγεται από το εξωτερικό. Μάλιστα, η Σουηδική νομοθεσία επιβάλλει στα πρατήρια καυσίμων, να διαθέτουν τουλάχιστον μία αντλία εναλλακτικού καυσίμου, στην προκειμένη, βιοαιθανόλης. Ένα στα πέντε οχήματα στη Στοκχόλμη κινούνται καίγοντας βιοαιθανόλη, ενώ οι αρχές σκοπεύουν να το εφαρμόσουν αυτό σε ολόκληρη τη δημόσια συγκοινωνία της πόλης.

Το 1908, η αυτοκινητοβιομηχανία της Ford, σχεδίασε το μοντέλο T, το οποίο έκαιγε ένα μείγμα βενζίνης και αλκοόλης. Ο ίδιος ο Henry Ford αποκάλυψε το καύσιμο αυτό, ως το καύσιμο του μέλλοντος. Ωστόσο, το 1919, όταν ξεκίνησε η περίοδος της ποτοαπαγόρευσης στην Αμερική, προκειμένου να μην καταναλώνεται ως ποτό, η αιθανόλη κρίθηκε παράνομη ως εμπόρευμα, και για αυτό το λόγο μπορούσε να πωληθεί μόνο ως μείγμα με πετρέλαιο. Με το τέλος της ποτοαπαγόρευσης, το 1933, η αιθανόλη μπορούσε να διατεθεί ξανά στους καταναλωτές. (U.S. Energy Information Administration).

3.2. Χρήση της βιοαιθανόλης ως καύσιμο κίνησης

Η αιθανόλη χρησιμοποιείται κυρίως ως καύσιμο σε μείγματα με τη βενζίνη. Η αναλογία του μείγματος διαφέρει από μέρος σε μέρος. Γενικά, όμως, η περιεχόμενη ποσότητα αιθανόλης στο μείγμα με τη βενζίνη, δεν ξεπερνάει το 10% κατ' όγκο. Το καύσιμο που απαρτίζεται από βενζίνη και 10% αιθανόλη καλείται E10, ενώ το μείγμα με 15% αιθανόλη, καλείται E15. Όλα τα οχήματα που καίνε βενζίνη, μπορούν να κάψουν και E10. Αντίθετα, μόνο ελαφρά οχήματα, που χρονολογούνται από το 2001 και μετά, μπορούν να κάψουν το E15.

Υπάρχει όμως και το E85 καύσιμο, το οποίο είναι και αυτό ένα μείγμα βενζίνης-αιθανόλης, όπου η περιεχόμενη αιθανόλη ανέρχεται σε ποσοστό 51-83%. Το καύσιμο αυτό μπορούν να το χρησιμοποιήσουν μόνο οχήματα που είναι ευέλικτα όσον αφορά το καύσιμο που καίνε. Τέτοια οχήματα μπορούν να χρησιμοποιήσουν οποιοδήποτε μείγμα αιθανόλης και βενζίνης μέχρι και το E85. Περίπου 20 εκατομμύρια τέτοια οχήματα χρησιμοποιούνται στις ΗΠΑ (U.S. Energy Information Administration).

3.3. Πλεονεκτήματα και μειονεκτήματα της χρήσης βιοαιθανόλης

Εν αντιθέσει με τη βενζίνη, η καθαρή αιθανόλη είναι βιοδιασπώμενη και μη τοξική. Το διοξείδιο του άνθρακα που εκπέμπεται από ένα όχημα, όταν καίει αιθανόλη, αντισταθμίζεται από αυτό που δεσμεύουν οι πρώτες ύλες για να μεγαλώσουν και κατ' επέκταση να χρησιμοποιηθούν για την παραγωγή της αιθανόλης. Κάτι τέτοιο δεν μπορούν να το πετύχουν η βενζίνη και το πετρέλαιο, καθώς εξάγονται από τη γη. Τα επικίνδυνα για το φαινόμενο του θερμοκηπίου αέρια που εκπέμπονται συνολικά, μειώνονται κατά περίπου 40% όταν η αιθανόλη προέρχεται από πρώτες ύλες με βάση το καλαμπόκι, ενώ τα ποσοστά αυτά φτάνουν το 108%, όταν η αιθανόλη προέρχεται από λιγνινοκυτταρινούχα υλικά. Η μείωση αυτή στους ρύπους είναι πάντα σε σχέση με τη βενζίνη και το πετρέλαιο.

Έχει υψηλότερο αριθμό οκτανίων από τη βενζίνη, παρέχοντας υψηλές καλύτερες ιδιότητες κατά την ανάμειξή τους. Κατά την ανάμειξη, εμπλουτίζεται το καύσιμο με οξυγόνο, γεγονός που συντελεί σε καλύτερη και πιο ολοκληρωμένη καύση, με αποτέλεσμα, να μην εκπέμπονται μεγάλες ποσότητες τοξικών καυσαερίων όπως το

μονοξειδίου του άνθρακα. Στη βιομηχανία αυτοκινήτων προτιμώνται καύσιμα με υψηλό αριθμό οκτανίων, καθώς είναι πιο εύκολο να αποτρέπεται το φαινόμενο «knocking» στους κινητήρες, τη συνεχή, δηλαδή, εμφάνιση κάποιου κρότου. Η αιθανόλη είναι ένα τέτοιο καύσιμο που παρέχει ικανοποιητική αντικροτική ικανότητα. Έτσι, συνήθως, γίνεται ανάμειξη βενζίνης χαμηλών οκτανίων με 10% αιθανόλη, για να επιτευχθεί το επιθυμητό καύσιμο με αριθμό οκτανίων 87.

Ωστόσο, η αιθανόλη παρέχει λιγότερη ενέργεια ανά λίτρο σε σχέση με τη βενζίνη, σε διάφορους βαθμούς, αναλόγως του ποσοστού αιθανόλης στο μίγμα. Η μετουσιωμένη αιθανόλη παρέχει περίπου 30% λιγότερη ενέργεια ανά λίτρο, σε σχέση με τη βενζίνη. Ακόμα, οχήματα που κινούνται με αιθανόλη ως καύσιμη ύλη, έχουν αρκετά προβλήματα κατά την εκκίνηση, τους χειμερινούς μήνες, ειδικά όταν η τάση ατμών είναι υπό των 45kPa. Επίσης, η αιθανόλη απορροφά νερό, κάτι που μπορεί να προκαλέσει μόλυνση στο καύσιμο και να καταστήσει δύσκολη τη μεταφορά της, μέσω σωλήνων (U.S. Department of Energy).

3.4. Πρώτες ύλες παραγωγής βιοαιθανόλης

Σχεδόν όλα τα υλικά που προέρχονται από τα φυτά μπορούν να χρησιμοποιηθούν ως πρώτη ύλη για την παραγωγή αιθανόλης. Ανάμεσα σε αυτά συγκαταλέγονται σπόροι και σπαρτά με μεγάλη περιεκτικότητα σε άμυλο και σάκχαρα, όπως το καλαμπόκι, το σόργο, τα ζαχαρότευτλα και τα ζαχαροκάλαμα. Η αιθανόλη παρασκευάζεται επίσης από γρασίδι, δέντρα και υπολείμματα γεωργικών και δασικών εκτάσεων όπως οι κόκκοι καλαμποκιού και τα αποθέματά τους, άχυρο από ρύζι αλλά και πριονίδια και φλοιούς ξύλων.

Καθόσον όλα τα φυτά περιέχουν σάκχαρα, αυτά τα σάκχαρα μπορούν να ζυμωθούν για να παράξουν αιθανόλη, σε μια διεργασία που ονομάζεται βιοχημική μετατροπή. Κάποια φυτά είναι πιο εύκολο να επεξεργαστούν προς παραγωγή αιθανόλης σε σχέση με κάποια άλλα. Μερικά δεν απαιτούν πολλούς πόρους για να αναπτυχθούν, ενώ μερικά χρειάζονται τόσο πόρους όσο και συνεχή φροντίδα. Πολλές φορές τα φυτά που καλλιεργούνται χρησιμοποιούνται αποκλειστικά για παραγωγή καυσίμων και όχι για κατανάλωση. Ακόμα και υπολείμματα από σπαρτά μπορούν να χρησιμοποιηθούν στην παραγωγή αιθανόλης.

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

3.4.1. Σακχαρούχες και αμυλούχες πρώτες ύλες

Στις μέρες μας, σχεδόν όλη η αιθανόλη που παράγεται στον κόσμο προέρχεται από αμυλούχες και σακχαρούχες πρώτες ύλες. Σε αυτά συγκαταλέγονται τα ζαχαρότευτλα και το γλυκό σόργο ως πηγές σακχάρων, αλλά και το καλαμπόκι, το σιτάρι και το κριθάρι ως πηγές αμύλου. Τα σάκχαρα, από αυτά τα υλικά, είναι εύκολο να εξαχθούν και να ζυμωθούν, καθιστώντας την παραγωγή αιθανόλης, σε μεγάλη κλίμακα, οικονομικά συμφέρουσα, καθώς δεν απαιτούνται προηγούμενες προεργασίες. Όλα τα παραπάνω ανήκουν στις πρώτες ύλες πρώτης γενιάς (Christakopoulos & Torakas, 2016). Μάλιστα, τμήματα των πρώτων υλών χρησιμοποιούνται για την παραγωγή άλλου τύπου ενέργειας, όπως η ηλεκτρική, καθιστώντας τα, ακόμα πιο προσιτά από οικονομικής απόψεως. Ως δεύτερης γενιάς πρώτες ύλες θεωρούνται τα λιγνινοκυτταρινούχα υλικά, ενώ τα τελευταία χρόνια, ιδιαίτερο ενδιαφέρον έχουν

παρουσιάζει τα βιοαπόβλητα, για την παραγωγή αιθανόλης. Τα βιοαπόβλητα περιγράφονται εκτενώς στην παράγραφο 4.

Σακχαροκάλαμο

Σήμερα, σχεδόν το 85% των αυτοκινήτων που πωλούνται στη Βραζιλία χρησιμοποιούν αιθανόλη. Το κλειδί για τη ραγδαία αύξηση της ζήτησης αιθανόλης στη Βραζιλία είναι το σακχαροκάλαμο, από το οποίο παράγεται η ζάχαρη, την οποία εξάγει η χώρα από το 16^ο αιώνα. Σε αντίθεση με άλλα αγροτικά προϊόντα, όπως το καλαμπόκι, το 20% του καλαμιού στο σακχαροκάλαμο είναι ζυμώσιμο σάκχαρο, με αποτέλεσμα, η ζύμωση να ξεκινά σχεδόν αμέσως μετά τη συγκομιδή. Ένα στρέμμα σακχαροκάλαμου αποδίδει 600-900 λίτρα αιθανόλης, τιμή υπερδιπλάσια από αυτή του καλαμποκιού. Ακόμα, ο συντελεστής ορυκτής ενέργειας, για την παραγωγή ενέργειας, έχει την τιμή 8, πράγμα που σημαίνει ότι με κατανάλωση μίας μονάδας ορυκτών καυσίμων, παράγονται 8 μονάδες αιθανόλης. Τέλος, οι εκπομπές του CO₂ που προκύπτουν από την καύση αιθανόλης, η οποία προέρχεται από σακχαροκάλαμο, είναι 55-90% λιγότερες σε σχέση με τις αντίστοιχες τιμές της βενζίνης.

Σακχαρότευτλο

Η υψηλή περιεκτικότητα των ριζών του σακχαρότευτλου σε σάκχαρα, το καθιστά ιδανικό για καλλιέργεια σε όλη την Ελλάδα. Οι ετήσιες αποδόσεις των καλλιεργειών ανέρχονται στους 6.3 τόνους ανά στρέμμα, από όπου το κάθε στρέμμα δίνει 600 λίτρα βιοαιθανόλης. Ο συντελεστής ορυκτής ενέργειας είναι χαμηλότερος από τον αντίστοιχο του σακχαροκάλαμου και έχει την τιμή 2.

Γλυκό σόργο

Το γλυκό σόργο είναι ένα μονοετές φυτό με μεγάλη φωτοσυνθετική ικανότητα και υψηλές αποδόσεις σε βιομάζα. Οι ετήσιες αποδόσεις του, με βάση την παραγωγή, φτάνουν τους 10 τόνους ανά στρέμμα, ενώ ο συντελεστής ορυκτής ενέργειας έχει την τιμή 2,2.



Εικόνα 1: Σακχαροκάλαμο



Εικόνα 2: Γλυκό σόργο



Εικόνα 3: Σακχαρότευτλα

Αραβόσιτος

Το μεγαλύτερο ποσό της αιθανόλης που παράγεται στις ΗΠΑ προέρχεται από αραβόσιτο, ενώ η ετήσια παραγωγή στην Ελλάδα ξεπερνά τα 2 εκατομμύρια τόνους. Οι ελληνικές μέσες αποδόσεις αραβοσίτου κυμαίνονται από 600 έως 1800 κιλά ανά στρέμμα, κάθε ένα από τα οποία δίνει, κατά μέσο όρο, 300 λίτρα αιθανόλης. Η ενέργεια από ορυκτά καύσιμα για την παραγωγή του καυσίμου, συγκριτικά με αυτή που αποδίδει, είναι 1 προς 1,3. Οι εκπομπές, επικίνδυνων για το φαινόμενο του θερμοκηπίου, αερίων που παράγονται κατά την καύση αιθανόλης από αραβόσιτο, είναι κατά 21% μικρότερες σε σχέση με τις αντίστοιχες που παράγονται κατά την κατανάλωση βενζίνης. Ωστόσο, η συνεχώς αυξανόμενη ζήτηση του αραβοσίτου για παραγωγή αιθανόλης, διπλασίασε την τιμή του.

Σίτος και κριθή

Τόσο το σιτάρι όσο και το κριθάρι αποτελούν ετήσια φυτά, τα οποία ανήκουν στα δημητριακά. Η συνολική, παγκόσμια παραγωγή φτάνει τους 150 εκατομμύρια τόνους και αποτελούν πρώτη ύλη για την παραγωγή βιοαιθανόλης. Από ένα στρέμμα παράγονται περί τα 150-800 κιλά σπόρων, με αντίστοιχη παραγωγή 45-240 λίτρα βιοαιθανόλης.



Εικόνα 4: Αραβόσιτος



Εικόνα 5: Σίτος και κριθή

3.4.2. Λιγνινοκυτταρινούχες πρώτες ύλες

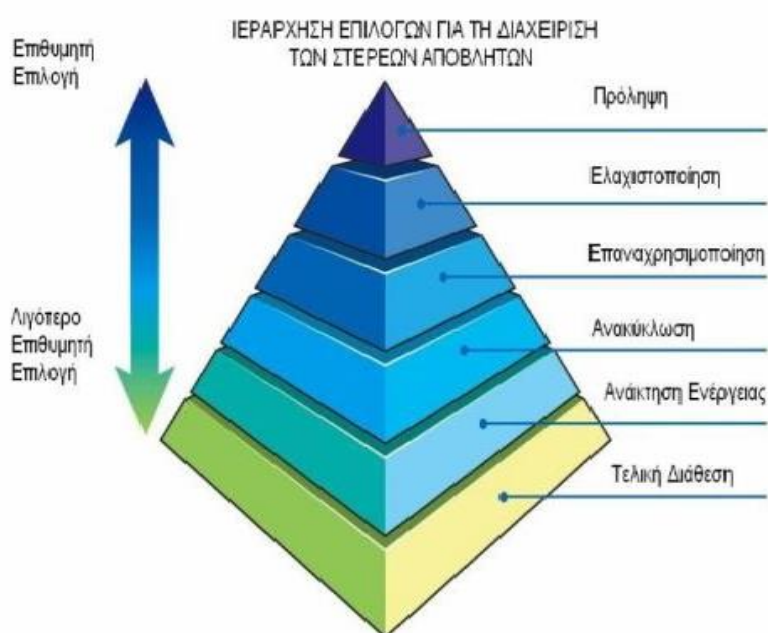
Το γεγονός ότι μεγάλες εκτάσεις Γης χρησιμοποιούνται για την καλλιέργεια πρώτων υλών καυσίμων, προκάλεσε μεγάλες, και όχι άδικες, αντιδράσεις. Έτσι, οι ειδικοί έπρεπε να στραφούν σε άλλες πηγές σακχάρων. Τέτοιες πηγές αποτελούν τα λιγνινοκυτταρινούχα υλικά. Πρόκειται για υπολείμματα σπαρτών, ξύλων, πριονιδίων και άλλων μη καταλισκόμενων, για τροφή, πρώτων υλών. Από το όνομά τους, γίνεται αντιληπτό, ότι αποτελούνται από κυτταρίνη, ημικυτταρίνη και λιγνίνη από τα οποία και εξάγονται τα επιθυμητά σάκχαρα. Η διαδικασία απομάκρυνσης των σακχάρων, στην προκειμένη περίπτωση δεν είναι μια εύκολη διαδικασία.

Οι λιγνινοκυτταρινούχες πρώτες ύλες παρουσιάζουν πολλά πλεονεκτήματα σε σχέση με τις αντίστοιχες σακχαρούχες και αμυλούχες. Υπάρχουν σε αφθονία και είναι είτε προϊόντα απόρριψης είτε έχουν συλλεχθεί από καλλιέργειες και δεν μπορούν να προοριστούν για κατανάλωση από τον άνθρωπο. Απαιτείται, τέλος, λιγότερη ενέργεια από ορυκτά καύσιμα, για την ανάπτυξη, συλλογή και μετατροπή τους σε αιθανόλη.

4. ΒΙΟΑΠΟΒΛΗΤΑ

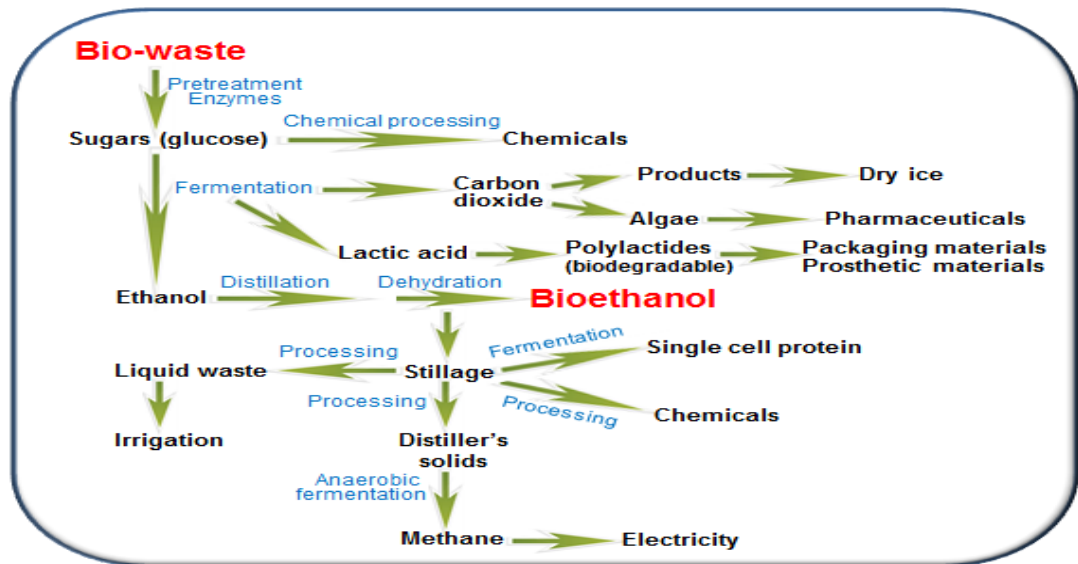
4.1. Γενικά

Σύμφωνα με την Οδηγία 98/2008 του Ευρωπαϊκού Κοινοβουλίου και την Πράσινη Βίβλο (3.12.2008 COM-2008 811), τα βιοαπόβλητα ή βιολογικά απόβλητα (ΒΑ) αποτελούν υποσύνολο των βιοαποδομήσιμων αποβλήτων (ΒΑΑ) και ορίζονται ως *“τα βιοαποδομήσιμα απόβλητα κήπων και πάρκων, τα απόβλητα τροφών μαγειρείων, 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*).



Εικόνα 6: Ιεράρχηση επιλογών για τη διαχείριση των στερεών αποβλήτων βασισμένη στην Οδηγία 2008/98/ΕΚ.

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



Εικόνα 7: Παραγωγή πολλών προϊόντων προστιθέμενης αξίας από τα βιολογικά απόβλητα (van Wyk JPH, 2001)

4.2. Διατροφικά απορρίμματα

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 διαχείρισή 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 διαχείρισής 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 λιπάσματα. 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 αναπτύσσει 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).

Η φύση των διατροφικών απορριμμάτων ποικίλει και συνήθως είναι τμήματα ή και ολόκληρες ποσότητες από φρούτα και λαχανικά, κόκαλα από κρέατα, γαλακτοκομικά προϊόντα όπως τυρί και γιαούρτι, υπολείμματα από μονάδες επεξεργασίας τροφίμων, όπως αποστακτήρια καθώς και πολλά άλλα τρόφιμα που πάνε χαμένα. Στον πίνακα 2 παρουσιάζονται τα τρόφιμα που απορρίπτονται ετησίως σε διάφορες χώρες ανά τον κόσμο.

Τα απορρίμματα αυτά αποτελούν τμήμα της ευρύτερης αλυσίδας προμήθειας τροφίμων, ένας σημαντικός αριθμός των οποίων, χάνεται κατά τη μεταφορά την επεξεργασία ακόμα και την κατανάλωση στα σπίτια και τα εστιατόρια. Όσο μεγαλύτερες οι ανάγκες σε τρόφιμα τόσο μεγαλύτερος και ο αριθμός εκείνων που χάνονται μέσα στην αλυσίδα προμήθειας τροφίμων. Έτσι, χώρες με μεγάλο πληθυσμό, βιομηχανία και όπως οι ΗΠΑ, η Ιαπωνία, η Μεγάλη Βρετανία και κυρίως ασιατικές

χώρες, εμφανίζουν αντίστοιχα μεγάλες ποσότητες ανεκμετάλλευτων τροφίμων τα οποία οδηγούνται στα σκουπίδια. Όλες αυτές οι χαμένες ποσότητες τροφίμων που φτάνουν προς το παρόν περίπου 1,3 δισεκατομμύρια τόνους ανά έτος, το οποίο αντιστοιχεί στο 1/3 της συνολικής παραγωγής τροφίμων, δημιουργούν τεράστιες ποσότητες σκουπιδιών που παρέχουν ένα πολύ άσχημο οπτικό αποτέλεσμα. Δεν είναι όμως μόνο θέμα αισθητικής. Τα περισσότερα από τα απορρίμματα τροφίμων (food waste) περιέχουν διαλυμένα συστατικά τα οποία παρέχουν έντονη δυσοσμία ρυπαίνοντας το περιβάλλον στο σύνολό του. Οι μεγάλες συγκεντρώσεις απορριπτόμενων τροφίμων είναι δυνατόν να εκπέμπουν επικίνδυνα αέρια, όπως μεθάνιο και διοξείδιο του άνθρακα επιβαρύνοντας το φαινόμενο του θερμοκηπίου (Thi Phuong Thuy Pham, et al. 2012).



Εικόνα 8: συγκεντρωμένα απορρίμματα τροφίμων σε χωματερή

Στις αρχές του προηγούμενου αιώνα οι πρώτες έρευνες επικεντρώθηκαν στα οφέλη που μπορεί να υπάρξουν από τα απορρίμματα τροφών και τα παραγόμενα προϊόντα τους, όπως είναι μονοκυττάρια πρωτεΐνες, ζύμες από φούρνους, οργανικά οξέα και αμινοξέα, ένζυμα (λιπάσες, αμυλάσες, κυτταρινάσες) χρωστικές ουσίες και αρώματα καθώς και πολυσακχαρίτες. Οι δυνατότητες που παρέχονται από τα παραπάνω προϊόντα, έχουν κάνει τα απορρίμματα των τροφών να προσελκύσουν το ενδιαφέρον των επιστημόνων για περαιτέρω εκμετάλλευσή τους προς παραγωγή ενέργειας. Οι συνεχώς εξαντλούμενοι φυσικοί πόροι για παραγωγή ενέργειας και καυσίμων καθώς και η νέα αυτή ιδέα, αποτέλεσαν εφελτήριο για μια νέα πηγή παραγωγής ενέργειας και καυσίμων. Σκοπό αποτελεί η εξισορρόπηση του οικοσυστήματος και η προστασία της υγείας των ανθρώπων αξιοποιώντας τα απορρίμματα που ο ίδιος ο άνθρωπος παράγει από τις τροφές του (Pfaltzgraff, et al, 2013).

Πίνακας 2: Απορρίμματα τροφίμων σε ασιατικές χώρες και χώρες του Ατλαντικού.
 Όπου ‘*’ δεν υπάρχουν δεδομένα (Kiran et al. 2014)

| Απορρίμματα (ΚΤ) | ΝοτιοΑνατολική | | | | | | | | | | | | | |
|---|----------------|-------|-------|-----------|-------|-----------|---------|----------|--------------|---------------|------------|-------------|----------|---------|
| | Κόσμος | Ασία | Ασία | Αυστραλία | Κίνα | Ινδονησία | Ιαπωνία | Μαλαισία | Νέα Ζηλανδία | Βόρειος Κορέα | Φιλιππίνες | Νότια Κορέα | Ταϊλάνδη | Βιετνάμ |
| Δημητριακά | 95245 | 52374 | 12599 | 1380 | 18990 | 4.6 | 413.4 | 183.4 | 28.6 | 253 | 215.7 | 628.4 | 1999 | 2706 |
| Ρύζι | 26738 | 22668 | 10792 | 0.4 | 6046 | 3.3 | 139.4 | 50.2 | * | * | 162.7 | 458.2 | 1997 | 2478 |
| Ζάχαρη | 459.9 | 151.7 | 93.6 | * | 0.4 | * | 20.8 | * | * | * | * | * | 151.7 | * |
| Όσπρια | 2735 | 1134 | 241.6 | 36 | 142.3 | 38 | 7.1 | * | 1.2 | 10.3 | * | 2 | 7 | 8.6 |
| Έλαια λαχανικών | 616.1 | 269.3 | 116.9 | * | 133.4 | * | 13 | 116.9 | * | * | * | * | * | * |
| Λαχανικά | 81441 | 59949 | 2710 | 54.1 | 39286 | 755 | 1224 | 64.8 | 73.2 | 414.2 | 242.5 | 1555 | 339.5 | 777.2 |
| Φασόλια | 1049 | 447.3 | 218.1 | 1.1 | 49.1 | 37.2 | 6.5 | * | 0.2 | 10.3 | 2.2 | 1.6 | 3.7 | 5.2 |
| Κρεμμύδια | 5891 | 3877 | 186 | 14.6 | 2107 | 99.9 | 68.1 | * | * | 3.5 | 6.9 | 139.5 | 5.5 | 22.7 |
| Αρακάς | 412.7 | 145.1 | 2.1 | 7.2 | 39.9 | * | 0.4 | * | 1.1 | * | 0.3 | 0.1 | 0.1 | * |
| Τομάτες | 12874 | 7415 | 104.2 | * | 3181 | 85.3 | 100.7 | 1.6 | 9.5 | 8.3 | 9.9 | 57.6 | 7.3 | * |
| Πατάτες | 62229 | 12912 | 466.1 | 23.6 | 7501 | 250 | 177 | * | 10.9 | 156 | 34.4 | 95.3 | 9 | 83.3 |
| Φρούτα | 53796 | 28328 | 4529 | 30.9 | 8323 | 2706 | 749 | 89.1 | 43.4 | 153.5 | 1183 | 276.6 | 786.4 | 531 |
| Μήλα | 5742 | 4116 | 13.2 | 5.9 | 3192 | 3.1 | 84.6 | * | 22.4 | 72.8 | 3.8 | 49 | 1.2 | 5.1 |
| Μπιανάνες | 13532 | 8544 | 1896 | 5.4 | 949.3 | 637.4 | 213 | 56.1 | 7.6 | * | 901.3 | * | 153.7 | 137 |
| Καρύδα | 3038 | 2488 | 2159 | * | 0.03 | 20.9 | * | 0.6 | * | * | 6.4 | * | * | * |
| Ανανάς | 1829 | 579 | 431.9 | * | 97.7 | * | 15.4 | * | 0.3 | * | 109.9 | 2.8 | 189.5 | 50 |
| Καφές | 105 | 33.3 | 28.3 | * | 0.03 | 20.9 | * | 0.6 | * | * | 6.4 | * | * | * |
| Γάλα | 16560 | 10887 | 183.3 | * | 1447 | 45 | * | 3.8 | 164.8 | 4.9 | * | 42.4 | 25.2 | 9.5 |
| Κρέμα | 33.9 | 0.1 | * | * | 0.1 | * | * | * | * | * | * | * | * | * |
| Βούτυρο | 84 | 1.7 | * | * | * | * | * | * | * | * | * | * | 23.1 | * |
| Ζωικά Λίπη | 174.1 | 1.8 | * | * | 0.1 | * | * | * | * | * | * | * | * | * |
| Κρέας | 1184 | 183.2 | * | * | * | * | 107.2 | * | * | * | * | 107.2 | 23.1 | * |
| Εντόσθια | 63 | 19.6 | * | 8.7 | * | * | * | * | * | * | * | * | * | * |
| Κρέας Πουλερικών | 97.5 | 61.2 | * | * | * | * | 34.5 | * | * | * | * | * | 23.1 | * |
| Κατά Κεφαλήν Ετήσια παραγωγή απορριμμάτων (Τ) | 0.184 | | 0.13 | 0.277 | 0.061 | 0.13 | 0.129 | 0.113 | 0.28 | 0.211 | 0.13 | 0.098 | 0.13 | 0.13 |
| Πληθυσμός (εκατομμύρια) | 7067 | 4175 | 610 | 22.9 | 1354 | 237.6 | 127.5 | 29.6 | 4.5 | 24.6 | 92.3 | 50 | 65.9 | 88.8 |
| Συνολικά απορρίμματα (ΜΤ) | 1300 | 278 | 79.3 | 6.34 | 82.8 | 30.9 | 16.4 | 3.36 | 1.25 | 5.19 | 12 | 4.91 | 8.6 | 11.55 |

4.3. Περιεχόμενα συστατικά των απορριμμάτων

Τα διατροφικά απορρίμματα περιλαμβάνουν κατά κύριο λόγο από πολυμερή υδρογονανθράκων όπως είναι η κυτταρίνη, η ημικυτταρίνη και το άμυλο, από τη λιγνίνη, πρωτεΐνες, λιπίδια, οργανικά οξέα καθώς και από μια μικρή ποσότητα ανόργανων συστατικών (Dang P. Ho, et al, 2014). Τα απορρίμματα αυτά χαρακτηρίζονται από μεγάλες διακυμάνσεις στην χημική τους σύνθεση και στο pH, παράγοντες που εξαρτώνται από τις εποχικές εναλλαγές και τις αλλαγές στις μεθόδους επεξεργασίας των τροφίμων. Σε συνδυασμό με τις μεγάλες περιεκτικότητες σε νερό και τους μεγάλους ρυθμούς συσσώρευσης, δημιουργούνται σημαντικά προβλήματα διάθεσης των τροφίμων και, ως επακόλουθο, υψηλά κόστη διάθεσής τους. Η σύσταση αναμεμιγμένων απορριμμάτων τροφών παρουσιάζεται αναλυτικά στον **Πίνακα 3**.

Πίνακας 3: Σύσταση αναμεμιγμένων απορριμμάτων τροφίμων
Όπου ‘*’ δεν υπάρχουν δεδομένα (Kiran, et al, 2014).

| Υγρασία | Ολικά Στερεά | Πτητικά Στερεά | Ολικά Σάκχαρα | Άμυλο | Κυτταρίνη | Λιπίδια | Πρωτεΐνη | Τέφρα |
|---------|--------------|----------------|---------------|-------|-----------|---------|----------|-------|
| 79.5 | 20.5 | 95 | * | * | * | * | 21.9 | * |
| 84.1 | 15.9 | 95.6 | * | * | * | * | * | * |
| 80 | 20 | 93.6 | * | * | * | * | * | 1.3 |
| 85 | 15 | 88.5 | * | * | 15.5 | 8.5 | 6.9 | 11.5 |
| 79.1 | 20.9 | 93.2 | * | * | * | * | * | * |
| 75.9 | 24.1 | * | 42.3 | 29.3 | * | * | 3.9 | 1.3 |
| 87.1 | 12.9 | 89.5 | * | * | * | * | * | * |
| 80.8 | 19.2 | 92.7 | * | 15.6 | * | * | * | * |
| 80.3 | 19.7 | 95.4 | 59.8 | * | 1.6 | 15.7 | 21.8 | 1.9 |
| 82.8 | 17.2 | 89.1 | 62.7 | 46.1 | 2.3 | 18.1 | 15.6 | * |
| 75.2 | 24.8 | * | 50.2 | 46.1 | * | 18.1 | 15.6 | 2.3 |
| 85.7 | 14.3 | 98.2 | 42.3 | 28.3 | * | * | 17.8 | * |
| 82.8 | 17.2 | 85 | 62.7 | 46.1 | 2.3 | 18.1 | 15.6 | * |
| 61.3 | 38.7 | * | 69 | * | * | 6.4 | 4.4 | 1.2 |
| 64.4 | 35.6 | * | * | * | * | 8.8 | 4.5 | 1.8 |
| 81.7 | 18.3 | 87.5 | 35.5 | * | * | 24.1 | 14.4 | * |
| 81.5 | 18.5 | 94.1 | 55 | 24 | 16.9 | 14 | 16.9 | 5.9 |
| 81.9 | 14.3 | 98.2 | 48.3 | 42.3 | * | * | 17.8 | * |

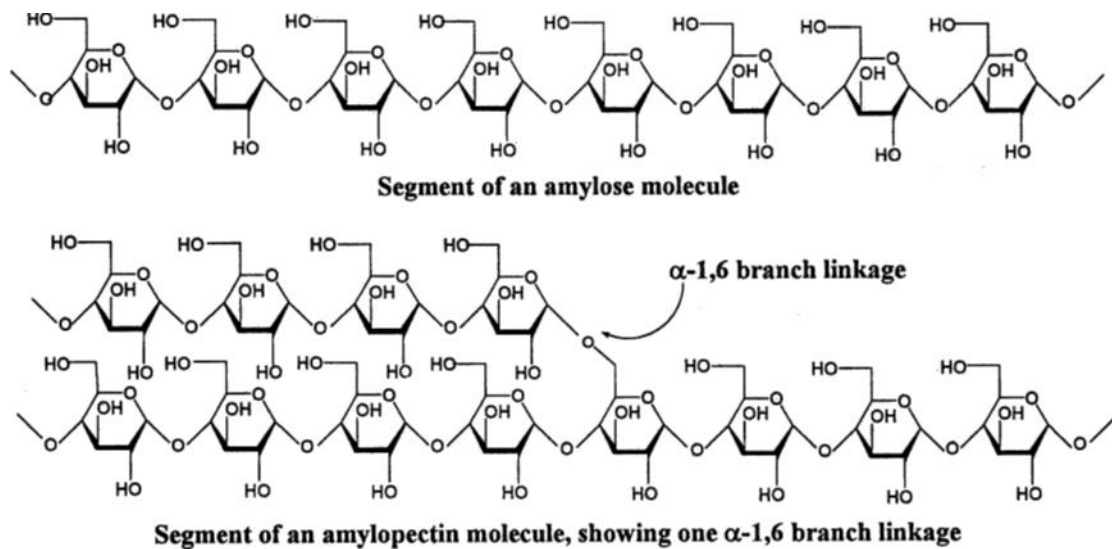
4.3.1. Άμυλο

Το άμυλο είναι ένας πολυσακχαρίτης. Αποτελείται από δεκάδες χιλιάδες μόρια γλυκόζης, που ενώνονται με τον αποκαλούμενο "γλυκοζιτικό δεσμό" και σχηματίζουν σπειροειδή και διακλαδισμένη αλυσίδα. Συναντάται σε μορφή αμυλόκοκκων οι οποίοι περιλαμβάνουν την αμυλόζη (πολλά μόρια γλυκόζης σε ευθεία διάταξη) και την αμυλοπηκτίνη (πολλά μόρια γλυκόζης σε διακλαδισμένη διάταξη) (Robyt JF, 1967).

Η αμυλόζη από χημικής άποψης είναι ένα γραμμικό πολυμερές εκατοντάδων έως και χιλιάδων μονάδων γλυκόζης, ενωμένων μεταξύ τους με γλυκοζιτικούς δεσμούς τύπου α(1→4). Σε καθαρή κατάσταση η αλυσίδα της αμυλόζης έχει άτακτη δομή, ενώ στο άμυλο απαντάται με την μορφή έλικας, συνήθως με έξι έως οκτώ μονάδες γλυκόζης σε κάθε σπείρα. Η ελικοειδής δομή σταθεροποιείται με τον σχηματισμό δεσμών υδρογόνου. Σε αντίθεση με την αμυλοπηκτίνη, η αμυλόζη είναι πρακτικά αδιάλυτη στο νερό. Αυτό έχει ως συνέπεια η περιεκτικότητα του αμύλου σε αμυλόζη να καθορίζει την ολική διαλυτότητά του στο νερό, και κατ' επέκταση την ευκολία με την οποία αυτό ζελατινοποιείται.

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

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

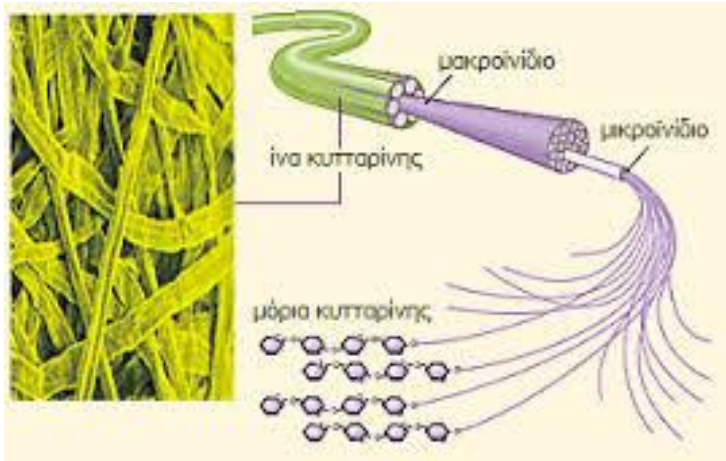


Εικόνα 9: Οι δομές των τμημάτων της αμυλόζης και της αμυλοπηκτίνης (Robyt JF, 1967)

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

4.3.2. Κυτταρίνη-Ημικυτταρίνη-Λιγνίνη

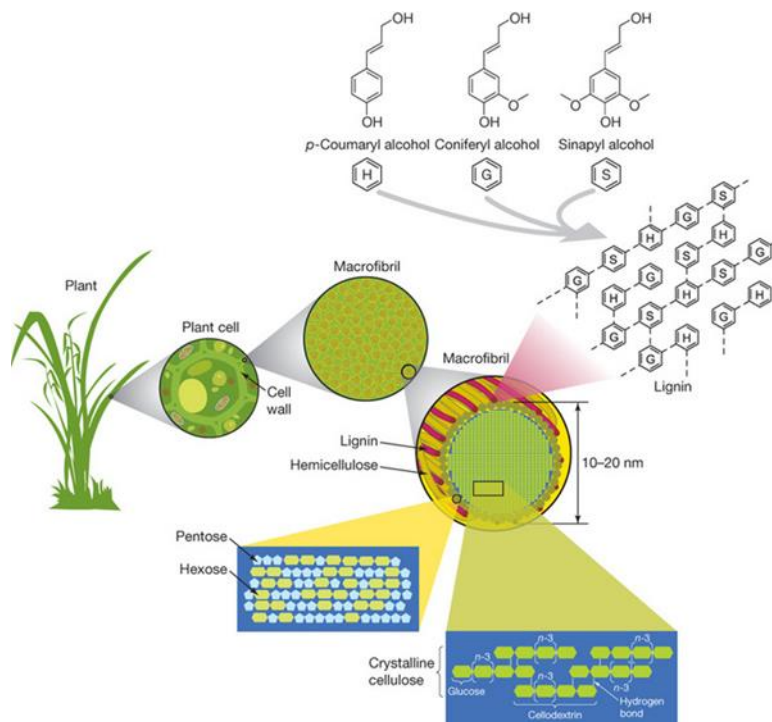
Η **κυτταρίνη** συνιστά την πλέον διαδεδομένη οργανική ένωση στη φύση. Είναι ένα γραμμικό πολυμερές της ανυδρογλυκόζης με μεγάλο βαθμό πολυμερισμού και έχει εμπειρικό τύπο $(C_6H_{10}O_5)_m$. Παρουσιάζει μεγάλη χημική και μηχανική αντοχή και στην καθαρή της μορφή έχει χρώμα λευκό και ειδικό βάρος ίσο με 1,5. Τα μακρομόρια της κυτταρίνης διατάσσονται παράλληλα μεταξύ τους και αναπτύσσουν δεσμούς υδρογόνου, σχηματίζοντας έτσι τα στοιχειώδη ινίδια (ή κρυσταλλίτες), τα οποία θεωρούνται σήμερα ως η ελάχιστη ορατή δομική μονάδα της ίνας. Τα στοιχειώδη ινίδια ενώνονται μεταξύ τους με τη βοήθεια άμορφων ημικυτταρινών και λιγνίνης, με αποτέλεσμα να σχηματίζονται δέσμες αυτών. Αυτές ενώνονται μεταξύ τους (με τη βοήθεια άμορφων ημικυτταρινών και λιγνίνης) και σχηματίζουν τις ίνες.



Εικόνα 10: Η κυτταρίνη στο φυτό

Η **ημικυτταρίνη** είναι γραμμικά διακλαδούμενο πολυμερές που προκύπτει από ανυδρίτες διαφόρων σακχάρων, καθώς και από ανυδρίτες ουρανικών οξέων. Παρουσιάζει μικρό βαθμό πολυμερισμού και μικρή μηχανική και χημική αντοχή. Συμμετέχει σαν πληρωτικό υλικό στο σχηματισμό τόσο των ινιδίων όσο και των ινών. Η ημικυτταρίνη (όπως και η λιγνίνη) δεν συναντάται ελεύθερη στη φύση, αλλά συνοδεύεται πάντα από την κυτταρίνη και την λιγνίνη.

Η **λιγνίνη** είναι το αφθονότερο και σπουδαιότερο, μετά την κυτταρίνη, συστατικό της φυτικής βιομάζας. Εν αντιθέσει με την κυτταρίνη και την ημικυτταρίνη, δεν αποτελείται από υδατάνθρακες, αλλά προκύπτει από την συνένωση μονάδων φαινυλοπροπανίου. Η συνένωση αυτή οδηγεί στο σχηματισμό ενός άμορφου τρισδιάστατου πολυμερούς. Στο φυτό, η λιγνίνη δρα σαν συγκολλητική ύλη τόσο των ινιδίων όσο και των ινών. (Christakopoulos and Topakas, 2016).



Εικόνα 11: Αναλυτική παρουσίαση της δομής της κυτταρίνης, ημικυτταρίνης και λιγνίνης, σε ίνα του κυτταρικού τοιχώματος ενός φυτού.

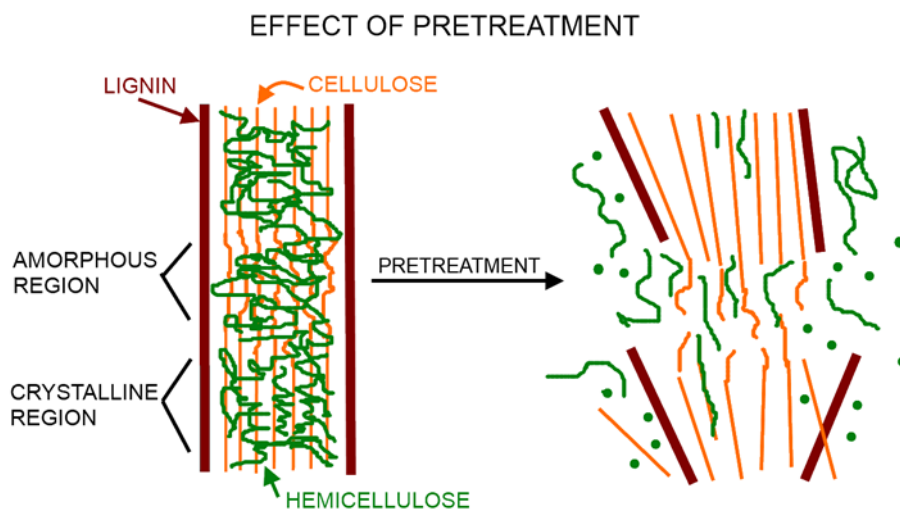
5. Παραγωγή βιοαιθανόλης

Η βιομετατροπή των διατροφικών απορριμμάτων προς βιοαιθανόλη περιλαμβάνει τα εξής στάδια: (α) προκατεργασία, (β) ενζυμική υδρόλυση των υδατανθράκων για την παραγωγή άμεσα μεταβολίσιμων σακχάρων (εξόζες και πεντόζες), (γ) βιομετατροπή (ζύμωση) των παραγόμενων σακχάρων σε αιθανόλη και (δ) διαχωρισμός, καθαρισμός και απόσταξη της αιθανόλης (Kumar et al., 2016).

5.1. Προκατεργασία διατροφικών απορριμμάτων

Όσον αφορά τα λιγνινοκυτταρινούχα υλικά, τα οποία διαθέτουν σάκχαρα ως ενδιάμεσα, είναι απαραίτητο να σπάσει η δομή των πρώτων υλών και μετά να εξαχθούν τα σάκχαρα από την κυτταρίνη και την ημικυτταρίνη. Για αυτό το λόγο, είναι αναγκαίο να υπάρχει ένα σύστημα προκατεργασίας πριν το βήμα της μετατροπής. Στόχος την προκατεργασίας είναι να ετοιμαστεί η πρώτη ύλη με σκοπό να βελτιωθεί η μετατροπή των σακχάρων (**Εικόνα 12**).

Τις τελευταίες δεκαετίες έχει αναφερθεί ένα ευρύ φάσμα μεθόδων προκατεργασίας οι οποίες διακρίνονται σε τέσσερις κατηγορίες : (1) φυσικές (άλεση, κονιοροποίηση, ακτινοβολήση), (2) χημικές (άλκαλι, αραιό οξύ, οξειδωτικές ενώσεις και οργανικοί διαλύτες), (3) φυσικοχημικές (προκατεργασία με ατμό, υδροθερμόλυση και υγρή οξείδωση) και (4) βιολογικές, ή ακόμα και συνδυασμός των παραπάνω (Mosier *et al.* 2005, Galbe & Zacchi 2007, Sánchez & Cardona 2008, Lee *et al.* 2008, Olofsson *et al.* 2008, Tomás-Pejó *et al.* 2008, Taherzadeh & Karimi 2008, Hayes 2009, Gable & Zacchi, 2012).



Εικόνα 12: Με προκατεργασία της βιομάζας επιτυγχάνεται το σπάσιμο της δομής της στα επιμέρους συστατικά: την κυτταρίνη (κίτρινο χρώμα), την ημικυτταρίνη (πράσινο χρώμα) και τη λιγνίνη (κόκκινο χρώμα).

Φυσικές

Μηχανική προκατεργασία

Η μηχανική προκατεργασία των λιγνινοκυτταρινούχων υλικών είναι ένα σημαντικό στάδιο για τη βελτίωση της αποτελεσματικότητας της βιομετατροπής, για την ενζυμική πρόσβαση και, γενικότερα, την μετατροπή της βιομάζας σε βιοαιθανόλη, χωρίς την παρουσία παράπλευρων, τοξικών ρευμάτων (Barakat et al, 2014). Η μέθοδος αυτή δημιουργεί μια νέα επιφάνεια, βελτιώνει τις ιδιότητες ροής και αυξάνει το πορώδες και την πυκνότητα της βιομάζας. Εξαιτίας της δομής τους, τα λιγνινοκυτταρινούχα υλικά σπάνε με τη βοήθεια ειδικών μύλων, πετυχαίνοντας ταυτόχρονα μείωση της κρυσταλλικότητάς τους.

Η διεργασία μείωσης του μεγέθους απαιτεί μεγάλα ποσά ενέργειας. Για τη βελτιστοποίηση και το σχεδιασμό του εξοπλισμού μείωσης μεγέθους της βιομάζας, είναι απαραίτητο να είναι γνωστές οι μηχανικές ιδιότητες. Ο ρυθμός τροφοδοσίας του υλικού, το αρχικό μέγεθος των μορίων, οι μηχανικές μεταβλητές και η περιεχόμενη υγρασία επηρεάζουν άμεσα τις ενεργειακές απαιτήσεις για μείωση του μεγέθους του λιγνινοκυτταρινούχου υλικού. Οι υψηλές απαιτήσεις ενέργειας καθιστούν επιτακτική την ανάγκη, για διατήρηση ισορροπίας μεταξύ κόστους και αποτελεσματικής διάσπασης της δομής (Ye Sun και Jiayang Cheng, 2002).

Φυσικοχημικές

Καυτό νερό και έκρηξη ατμού

Στην έκρηξη ατμού (steam explosion, SE) η βιομάζα επεξεργάζεται με κορεσμένο ατμό σε υψηλή πίεση, ενώ αμέσως μετά, η πίεση πέφτει απότομα. Γενικά, η έκρηξη ατμού είναι μια διεργασία κατά την οποία, η βιομάζα επεξεργάζεται με καυτό ατμό (180-240°C) υπό πίεση (1-3,5MPa), ενώ μετά, πραγματοποιείται μια εκρηκτική αποσυμπίεση της βιομάζας με αποτέλεσμα να γίνει ρήξη των ινών της σκληρής δομής της βιομάζας (Kumar et al, 2009, Agbor et al, 2011). Η ξαφνική απελευθέρωση πίεσης σπάει τους δεσμούς της κυτταρίνης, με αποτέλεσμα να είναι πιο εύκολη η πρόσβαση στην κυτταρίνη για ενζυμική υδρόλυση και ζύμωση. Ανάλογα με το χρόνο παραμονής και τη θερμοκρασία, η έκρηξη ατμού μπορεί να προκαλέσει από μερικές ρωγμές στη δομή της βιομάζας, μέχρι και ολοκληρωτικό κατακερματισμό των ινών.

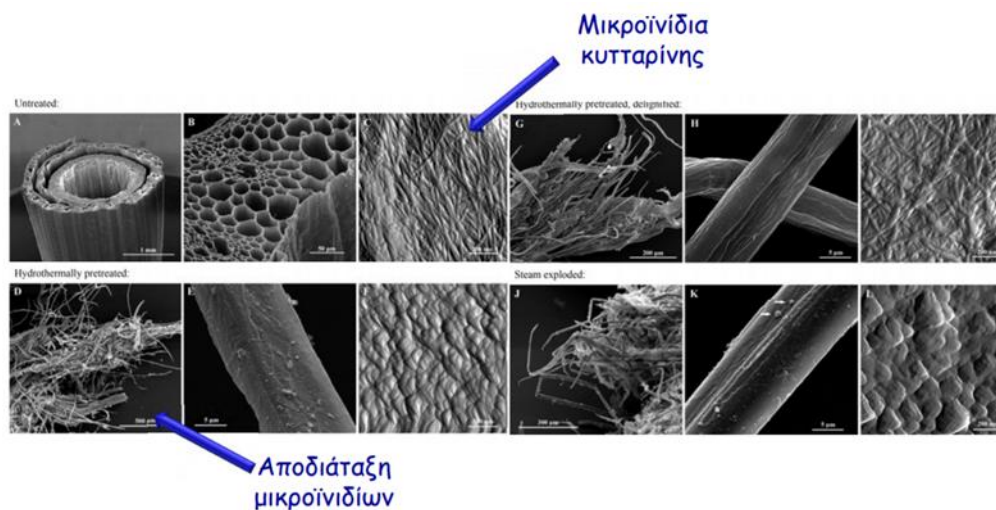


Εικόνα 13: Προκατεργασία βιομάζας σε βιομηχανική κλίμακα

Ακτινοβολία μικροκυμάτων (Microwave Radiation, MWR)

Η μέθοδος αυτή, επιταχύνει βιολογικές, χημικές και φυσικές διεργασίες εξαιτίας της θερμότητας και των έντονων συγκρούσεων που εμφανίζονται από τη δόνηση των πολικών μορίων και την κίνηση των ιόντων (Stridar, 1988). Η απόδοση της MWR επηρεάζεται από τις διηλεκτρικές ιδιότητες του λιγνινοκυτταρινούχου υλικού. Η θέρμανση με μικροκύματα επιταχύνει την διάλυση της κυτταρίνης στα ιονικά υγρά. Η υδρόλυση και η προκατεργασία με MWR βιομάζας φυτικού τύπου, προς σάκχαρα, πραγματοποιήθηκε σε ένα βήμα, εξαλείφοντας το στάδιο της υδρόλυσης, με αποτέλεσμα, να είναι πιο οικονομικά προσιτή η μέθοδος

Τα τελευταία χρόνια, έχει μελετηθεί η συνδυαστική χρήση MWR με κάποια άλλη μέθοδο προκατεργασίας, συμπεριλαμβανομένου των MWR-νερό, MWR-άλκαλι, MWR-οξύ, MWR-ιονικά υγρά, MWR-άλατα, αλλά και άλλες μεθόδους (Xu, 2015). Η συνδυαστική χρήση MWR με άλκαλι απομακρύνει περισσότερη ημικυτταρίνη και λιγνίνη από το άχυρο σίτου, σε μικρότερο χρόνο, σχετικά με την παραδοσιακή μέθοδο αλκάλειος.



Εικόνα 14: Αποδιάταξη ινιδίων κυτταρίνης, μετά από θερμική επεξεργασία της βιομάζας

Χημικές

Προκατεργασία με οξέα

Ο κύριος σκοπός της προκατεργασίας με οξύ είναι να αυξηθεί η προσβασιμότητα των ενζύμων στα κλάσματα κυτταρίνης με της διαλυτοποίηση του ημικυτταρικού κλάσματος της βιομάζας. Τόσο τα συμπυκνώματα όσο και τα διαλύματα οξέων έχουν χρησιμοποιηθεί, κατά καιρούς, για την επεξεργασία λιγνινοκυτταρινούχων υλικών πολύπλοκης δομής. Ωστόσο, η χρήση πυκνών οξέων αποφεύγεται καθώς είναι τοξικά, διαβρωτικά και επικίνδυνα (P.Lenihan, 2009). Έτσι, προτιμώνται αραιά διαλύματα οξέων, καθώς έχει αποδειχθεί ότι είναι πιο αποτελεσματικά. Ακόμα, η προκατεργασία με αραιά διαλύματα οξέων είναι κατάλληλη για ένα μεγάλο εύρος πρώτων υλών, συμπεριλαμβανομένου μαλακού και σκληρού ξύλου, ποώδων φυτών, γεωργικών καταλοίπων, απορριμμάτων χαρτιού και αστικών στερεών αποβλήτων.

Το πιο ευρέως χρησιμοποιούμενο οξύ είναι το αραιό θειικό οξύ, εξαιτίας του χαμηλού κόστους, της υψηλής ενεργότητάς του καθώς και του γεγονότος ότι είναι ένα άμεσα διαθέσιμο χημικό για βιομηχανικές εφαρμογές, με χαμηλές ανησυχίες για την ασφάλεια και το

περιβάλλον (Li et al, 2010). Αυτό που φαίνεται ιδιαίτερα ενδιαφέρον είναι το γεγονός, ότι η ικανότητα βιομετατροπής μειώνεται σε υψηλές θερμοκρασίες παρουσία αραιών οξέων, με την αποικοδόμηση της ξυλόζης σε παραπροϊόντα, όπως οι φουρφουράλες, οι οποίες αποτελούν παρεμποδιστές κατά το στάδιο της ζύμωσης. Έτσι, είναι απαραίτητο να βελτιστοποιηθούν οι συνθήκες θερμοκρασίας, χρόνου και συγκέντρωσης οξέος της προκατεργασίας με αραιά οξέα, για την απόκτηση μέγιστων τιμών αναγωγικών σακχάρων.

Αλκαλική προκατεργασία

Η προκατεργασία με άλκαλι, σπάει τους δεσμούς μεταξύ της λιγνίνης και των υδατανθράκων και διασπάει τη δομή της λιγνίνης. Αυτό εξαρτάται από το περιεχόμενο λιγνίνης στα υλικά. Όταν χρησιμοποιούνται χαμηλές θερμοκρασίες (50-65°C), οι χρόνοι παραμονής κυμαίνονται μεταξύ κάποιων ημερών ή ακόμα και εβδομάδων, ενώ με υψηλές θερμοκρασίες (85-135°C), οι χρόνοι παραμονής, μειώνονται στο επίπεδο ωρών. Έρευνες έδειξαν ότι με χρήση διαλυμάτων υδροξειδίου του νατρίου και υδροξειδίου του ασβεστίου ως μέσα προκατεργασίας, αυξάνονται σημαντικά οι αποδόσεις στα επόμενα βήματα (Farrukh Raza Amin, 2017).

Οξονόλυση

Το όζον μπορεί να χρησιμοποιηθεί για την αποικοδόμηση της λιγνίνης και της ημικυτταρίνης σε πολλά λιγνινοκυτταρινούχα υλικά, όπως το άχυρο σίτου, το πράσινο χόρτο, το φιστίκι, το άχυρο βαμβακιού και πριονίδια από λεύκες. Η αποικοδόμηση, στην ουσία, περιορίστηκε στη λιγνίνη, με μικρή επίδραση και στην ημικυτταρίνη. Η κυτταρίνη, όμως, επηρεάστηκε ελάχιστα. Η προκατεργασία με οξονόλυση παρουσιάζει κάποια σημαντικά πλεονεκτήματα, με βασικότερο, το γεγονός ότι απομακρύνει αποτελεσματικά τη λιγνίνη. Δεν παράγει τοξικά κατάλοιπα για τις επόμενες διεργασίες, ενώ οι αντιδράσεις διεξάγονται σε θερμοκρασίες και πιέσεις δωματίου (Rodolfo Travaini, et al, 2015). Από την άλλη, όμως, απαιτείται μεγάλη ποσότητα όζοντος, αυξάνοντας κατά πολύ το κόστος της διεργασίας.

Έκρηξη ινών αμμωνίας (Ammonia fiber explosion, AFEX)

Κατά τη μέθοδο αυτή, υγρή αμμωνία προστίθεται στη βιομάζα υπό φυσιολογική πίεση (100-400 psi) και θερμοκρασία (70-200°C) προτού, αυξηθεί απότομα η πίεση. Οι κυριότεροι παράγοντες της διεργασίας είναι η θερμοκρασία της αντίδρασης, ο χρόνος παραμονής και οι ποσότητες νερού και αμμωνίας. Η μέθοδος αυτή σπάει τους κρυστάλλους της κυτταρίνης, υδρολύει την ημικυτταρίνη, απομακρύνει και αποπολυμερίζει τη λιγνίνη και αυξάνει το μέγεθος και τον αριθμό των μικροπόρων στο κυτταρικό τοίχωμα, με αποτέλεσμα να αυξάνεται σημαντικά ο ρυθμός της ενζυμικής υδρόλυσης (Bals, et al, 2010).

Έκρηξη CO₂

Το CO₂ μεγιστοποιεί την πίεση, ενώ, σε υψηλές θερμοκρασίες, αντιδρά με το συμπύκνωμα ατμού προς παραγωγή καρβονικού οξέος (H₂CO₃), το οποίο ενισχύει την αυτοϋδρόλυση. Σε σχέση με την έκρηξη αμμωνίας, η έκρηξη CO₂ είναι πιο αποδοτική, από οικονομικής σκοπιάς, ενώ δεν ευνοεί το σχηματισμό παρεμποδιστικών ενώσεων (Conde-Mejia, et al, 2011).

Οργανικοί διαλύτες

Στην προκατεργασία με οργανικό διαλύτη, οι εσωτερικοί δεσμοί λιγνίνης και ημικυτταρίνης σπάνε, διαχωρίζοντας τη λιγνινοκυτταρινούχο βιομάζα στην κυτταρίνη, την ημικυτταρίνη και τη λιγνίνη. Το μεγαλύτερο μέρος της λιγνίνης και της ημικυτταρίνης σπάει σε, μικρότερου μοριακού βάρους, κομμάτια. Αρχικά, η λιγνινοκυτταρινούχος βιομάζα επεξεργάζεται με οργανικό διαλύτη σε υψηλές θερμοκρασίες και πιέσεις για συγκεκριμένο χρόνο. Στη συνέχεια, ο διαχωρισμός επιτυγχάνεται με διάλυση, ξήρανση και καταβύθιση υγρών, πλούσιων σε λιγνίνη, προς ανάκτηση και, εν συνεχεία, ανακύκλωση του διαλύτη στην αρχή της προκατεργασίας. Κατά το δεύτερο διαχωρισμό ανακτώνται ξυλόζη και, υψηλής καθαρότητας, λιγνίνη, με προοπτικές για αρκετές βιομηχανικές εφαρμογές. Κατά την προκατεργασία με οργανικό διαλύτη, προστίθενται όξινοι καταλύτες, με σκοπό να αυξηθεί ο ρυθμός απομάκρυνσης της λιγνίνης και να μειωθεί η θερμοκρασία της διαδικασίας, καθώς οι όξινοι καταλύτες διασπών τους ασταθείς, σε οξύ, δεσμούς, προς αποσταθεροποίηση των τεμαχίων της λιγνίνης (Zhang, et al, 2015).

Βιολογική προκατεργασία

Στη βιολογική προκατεργασία χρησιμοποιούνται μικροοργανισμοί, κυρίως μύκητες, για την αποικοδόμηση της λιγνίνης και της ημικυτταρίνης από τη λιγνινοκυτταρινούχο βιομάζα. Τα παραπροϊόντα που παράγονται κατά τη διάρκεια της βιολογικής προκατεργασίας, συνήθως δεν παρεμποδίζουν την επακόλουθη υδρόλυση, ενόσω η προκατεργασία διεξάγεται υπό ήπιες συνθήκες. Κατά τη διάρκεια της προκατεργασίας, η αποτελεσματική αποικοδόμηση της λιγνίνης εξαρτάται από τα λιγνολυτικά ένζυμα που παράγονται από βασιδιομύκητες, όπως η περοξειδάση της λιγνίνης, περοξειδάση μαγγανίου και λακάση.

Στη βιολογική προκατεργασία, ο λευκός μύκητας σήψης βοηθάει στην απολιγνοποίηση, η οποία, με τη σειρά, της βελτιώνει το ρυθμό ενζυμικής σακχαροποίησης. Αποτελεσματική βιοαποικοδόμηση της λιγνινοκυτταρινούχου βιομάζας επιτυγχάνεται με αποικοδόμηση, με συνεργιστική δράση, μικροβιακής κοινοπραξίας, συμπεριλαμβανομένων διαφόρων βακτηρίων και μυκήτων (Conde-Mejía et al, 2011). Η χρήση πολλών μυκήτων έχει πολλά πλεονεκτήματα, όπως το γεγονός ότι αυξάνεται η ικανότητα προσαρμογής, βελτιώνεται η παραγωγικότητα, και η αποτελεσματικότητα ενζυμικής σακχαροποίησης, ελέγχεται το pH κατά τη διάρκεια της χρήσης σακχάρων και, τέλος, αυξάνεται η χρήση του υποστρώματος.

Σύγκριση μεθόδων προκατεργασίας

Οι βιολογικές και φυσικές μέθοδοι προκατεργασίας που βασίζονται στην ακτινοβολία και σε ηλεκτρικά μέσα δεν μπορούν να εφαρμοστούν ακόμα σε βιομηχανική κλίμακα βραχυπρόθεσμα. Οι μέθοδοι τεμαχισμού είναι αδύνατο να εφαρμοστούν σε μεγάλη κλίμακα, εξαιτίας των υψηλών απαιτήσεων σε ενέργεια. Η επιλογή για χημική οξείδωση είναι αρκετά ακριβή και δίνει χαμηλές αποδόσεις. Η έκρηξη διοξειδίου του άνθρακα χρησιμοποιείται ταυτόχρονα με την προκατεργασία με οργανικούς διαλύτες ή ως δεύτερο βήμα μετά την προκατεργασία με την διάλυση οξέος. Μετά από αυτήν την πρώτη ανάλυση, οι μέθοδοι που επιλέγονται για περαιτέρω εξέταση, είναι η φυσικές μέθοδοι προκατεργασίας όπως το καυτό νερό, ή η έκρηξη ατμού καθώς και οι χημικές μέθοδοι όπως η όξινη υδρόλυση, η βασική απόσπαση, η έκρηξη ινών αμμωνίας και οι οργανικοί διαλύτες. Αυτές οι μέθοδοι φαίνεται να έχουν τις καλύτερες προοπτικές για εφαρμογή σε μια διεργασία παραγωγής βιοαιθανόλης.

Μια συγκεντρωμένη παρουσίαση των πλεονεκτημάτων και των μειονεκτημάτων που μπορεί να έχει κάθε μέθοδος προκατεργασίας, ξεχωριστά, φαίνεται στον **Πίνακα 4**.

Πίνακας 4: Μέθοδοι προκατεργασίας διατροφικών απορριμμάτων (Conde-Mejía et al, 2011)

| <i>Προκατεργασία</i> | <i>Πηγή ενέργειας</i> | <i>Σκοπός</i> | <i>Πλεονεκτήματα -μειονεκτήματα</i> |
|----------------------|--|--|--|
| <i>Βιολογική</i> | Μικροβιακή (μύκητες-ακτινομύκητες) | Απομάκρυνση λιγνίνης | Χαμηλή κατανάλωση ενέργειας, πολύ αργός ρυθμός κατανάλωσης, απορριπτόμενα υλικά από αποδόμηση |
| <i>Φυσική</i> | Τεμαχισμός (σφαίρες, κολλοειδή, συμπίεση) | Μείωση μοριακού μεγέθους και κρυσταλλικότητας της κυτταρίνης | Υψηλή κατανάλωση ενέργειας, συνήθως υψηλότερη από την έμφυτη ενέργεια της βιομάζας. |
| <i>Φυσικοχημική</i> | Ακτινοβολία (δέσμη ηλεκτρονίων, ακτίνες γάμμα, μικροκύματα) | Αύξηση ειδικής επιφάνειας και μεγέθους πόρων. Μερικός αποπολυμερισμός λιγνίνης | Ελάχιστη έρευνα σε αυτόν τον τομέα |
| | Ηλεκτρική (παλλόμενο ηλεκτρικό πεδίο) | Διασπάει τα κύτταρα του φυτού | Περιβάλλουσες συνθήκες, απλός εξοπλισμός. Η διεργασία απαιτεί περισσότερη έρευνα. |
| | Υδροθερμόλυση (καυτό νερό) | Μερική υδρόλυση των ημικυτταρινών | Χαμηλότερη πίεση και μικρότερη διάρρηξη της ξυλάνης από την έκρηξη με ατμό |
| | Έκρηξη ατμού (ατμός υψηλής πίεσης) | | Απλή διεργασία, καταστροφή τμήματος της ξυλάνης, ατελής διάσπαση της λιγνίνης. |
| <i>Χημική</i> | Όξινη υδρόλυση (ανθρακικό, υδροχλωρικό, υδροφθορικό, νιτρικό, φωσφορικό, θειικό) | Μείωση κρυσταλλικότητας κυτταρίνης, μερική ή ολόκληρη υδρόλυση της ημικυτταρίνης, απολίπωση. | Μικροί χρόνοι παραμονής, υψηλή μετατροπή ημικυτταρίνης. Διάβρωση εξοπλισμού |
| | Αλκαλική απόσπαση (ασβέστιο, νάτριο, υδροξείδιο αμμωνίας) | | Σε χαμηλές θερμοκρασίες και πιέσεις, απαιτούνται μεγάλοι χρόνοι παραμονής. Σχηματίζονται άλατα |
| | Έκρηξη διοξειδίου του άνθρακα | Δεν παράγονται ανασταλτικοί παράγοντες. Δεν τροποποιείται η λιγνίνη ή η ημικυτταρίνη. | |
| | Έκρηξη ιών αμμωνίας (AFEX) | Δεν παράγονται ανασταλτικοί παράγοντες. Δεν είναι αποτελεσματική μέθοδος με υψηλό ποσοστό λιγνίνης στη βιομάζα. Υψηλές πιέσεις | |
| | Οξειδωτικά (όζον, υγρή οξείδωση) Οργανικοί διαλύτες (αιθανόλη-νερό, βενζίνη-νερό, γλυκόλη αιθυλενίου, βουτανόλη-νερό) | Υψηλή απολίπωση, ανακύκλωση διαλυτών. Κάποιοι διαλύτες είναι εύφλεκτα. | |

6. Ενζυμική Υδρόλυση

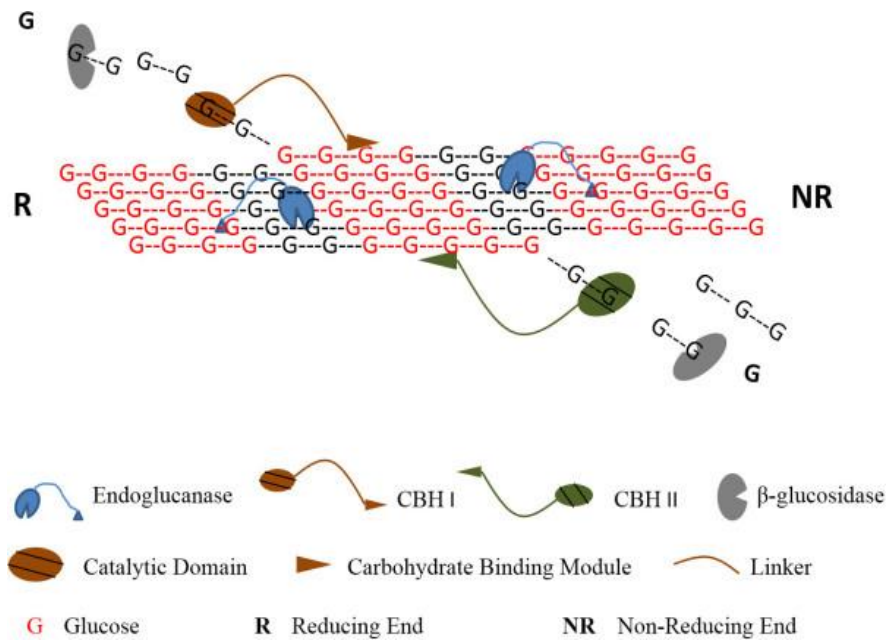
Η δομή των λιγνινοκυτταρινούχων υλικών μπορεί να σπάσει, υδρολυτικά, σε απλά σάκχαρα, είτε ενζυμικά με (ημι)κυτταρινικά ένζυμα, είτε χημικά με θειικό ή κάποιο άλλο οξύ. Ωστόσο, φαίνεται να προτιμάται η ενζυμική υδρόλυση, καθώς απαιτεί λιγότερη ενέργεια και ήπιες συνθήκες περιβάλλοντος (pH-4.8 και θερμοκρασία 45-50°C), δεν δημιουργούνται προβλήματα διάβρωσης, ενώ παράγονται και πολύ λιγότεροι παρεμποδιστές, για το στάδιο της ζύμωσης. Η ενζυμική αποδόμηση των λιγνινοκυτταρινούχων υλικών είναι περίπλοκη, επειδή αποτελείται από πολλά δομικά χαρακτηριστικά (Maitan-Alfenas G.P, et al, 2014).

Ενζυμική υδρόλυση κυτταρίνης

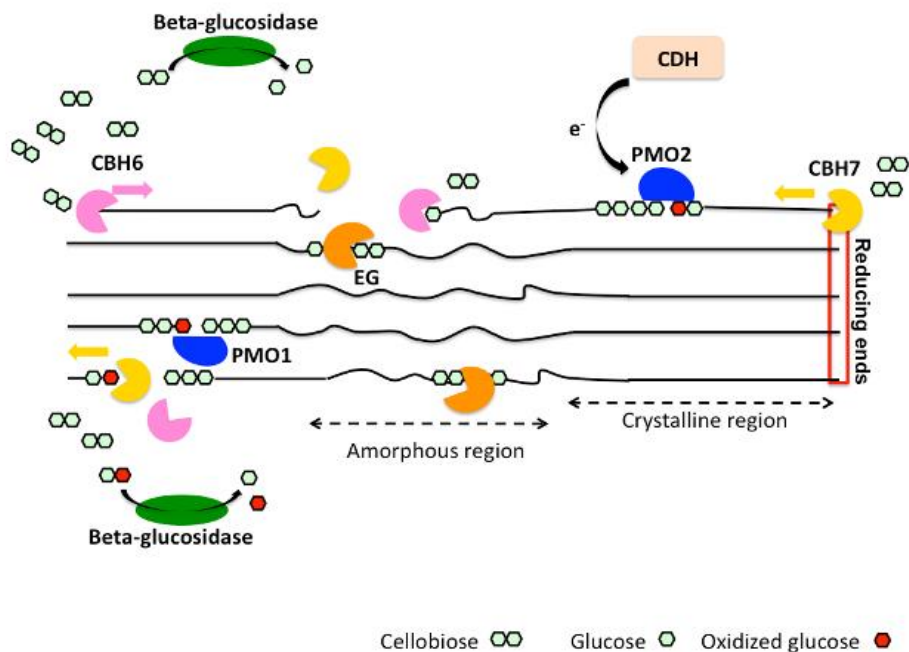
Η παραδοσιακή θεώρηση της υδρόλυσης της κυτταρίνης περιλαμβάνει τρεις τύπους υδρολυτικών ενζύμων: (α) ενδογλουκανάσες, (β) εξωγλουκανάσες στις οποίες περιλαμβάνονται οι κελλοδεξτρινάσες και οι κελλοβιοϋδρολάσες και (γ) β-γλυκοζιδάσες. Οι ένδο- υδρολάσες προσβάλλουν τις άμορφες περιοχές της κυτταρίνης, οι έξω-υδρολάσες απομακρύνουν σταδιακά κελλοολιγοσακχαρίτες από τα άκρα της αλυσίδας και οι β-γλυκοζιδάσες υδρολύουν τις διαλυτές κελλοδεξτρίνες και την κελλοβιόζη προς γλυκόζη (Εικόνα 15Α). Παρά την συνεργιστική δράση των προαναφερθέντων βιοκαταλυτών, η εντυπωσιακή αποτελεσματικότητα στην αποικοδόμηση της βιομάζας που επιδεικνύουν διάφοροι μικροοργανισμοί δεν μπορεί να αποδοθεί μόνο στον προαναφερθέντα ενδο-έξω υδρολυτικό μηχανισμό (Dimarogona et al., 2012).

Ερωτήματα δημιουργήθηκαν αναφορικά με την ύπαρξη και λειτουργική σημασία μιας νέας τάξης γλυκολυτικών οξειδωτικών ενζύμων (glycolytic oxidative enzymes) βακτηριακής και μυκητιακής προέλευσης. Μελέτες έδειξαν ότι τα εν λόγω ένζυμα καταλύουν τη διάσπαση των γλυκοζιτικών δεσμών των πολυμερών της γλυκόζης μέσω οξειδωτικού μηχανισμού, καθιστώντας το υπόστρωμα επιδεκτικότερο στην προσβολή από τα παραδοσιακά κυτταρινολυτικά ένζυμα. Τα εν λόγω ένζυμα ταξινομήθηκαν ως Lytic polysaccharide monooxygenases (LPMOs). Η δράση τους οδηγεί στη δημιουργία οξειδομένων άκρων της αλυσίδας της κυτταρίνης. Οι αντιδράσεις αυτού του τύπου απαιτούν μοριακό οξυγόνο και μία εξωκυτταρική πηγή ηλεκτρονίων, όπως η αφυδρογονάση της κελλοβιόζης (celllobiose dehydrogenase-CDH) (Εικόνα 15B). Ο μοναδικός αυτός μηχανισμός διάσπασης της κυτταρίνης θεωρείται ότι βοηθά στο δύσκολο από ενεργειακής άποψης στάδιο της απόσπασης μιας αλυσίδας γλυκάνης από τις κρυσταλλικές περιοχές της κυτταρίνης, δημιουργώντας έτσι νέα άκρα για τη δράση της εξωγλουκνάσης. Σήμερα οι LPMOs αποτελούν βασικά συστατικά των ενζυμικών μιγμάτων που χρησιμοποιούνται για την παραγωγή βιοαιθανόλης από λιγνινοκυτταρινούχα υλικά (Ezeilo et al., 2017).

(A)



(B)

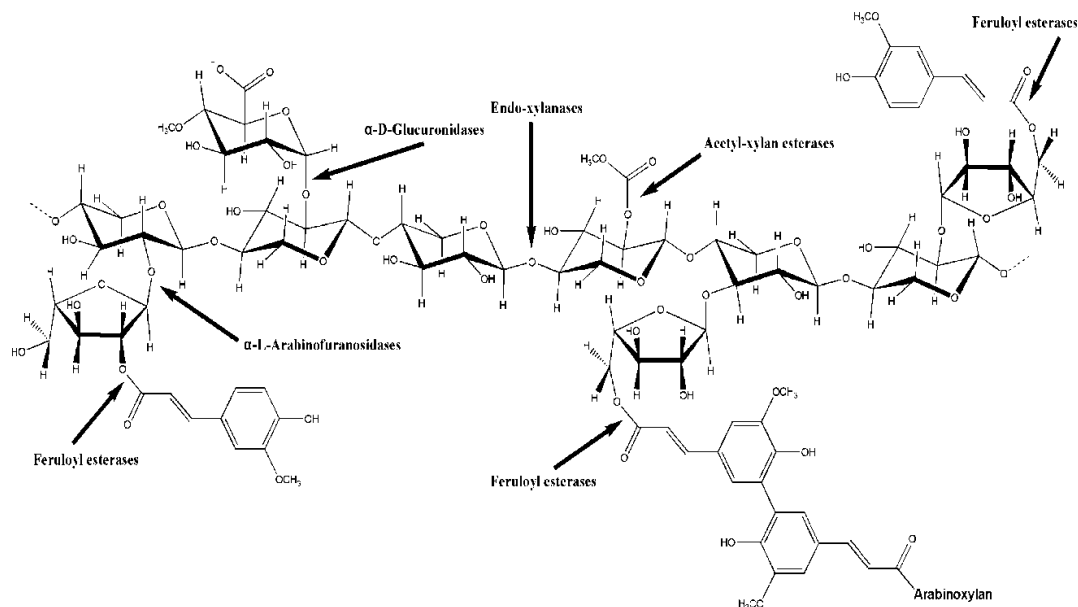


Εικόνα 15: (A) Παραδοσιακή θεώρηση ενζυμικής υδρόλυσης κυτταρίνης.

(B) Ενζυμική αποικοδόμηση της κυτταρίνης, όπου εμπλέκονται κελλοβιοϋδρολάζες (CBH) ενδογλουκανάσες (EG), και LPMOs (ή πρωτεΐνες AA9). Η αφυδρογονάση της κελλοβιοζής (CDH) είναι ένας πιθανός δότης ηλεκτρονίων για τα LPMOs. Οι EGs και LPMOs διασπούν εσωτερικά τις αλυσίδες κυτταρίνης, απελευθερώνοντας άκρα αλυσίδας στα οποία δρουν οι CBHs. Οι CBHs παράγουν κελλοβιοζή ή οξειδωμένη κελλοβιοζή, που υδρολύονται από τη β-γλυκοζιδάση.

Ενζυμική υδρόλυση ημικυτταρίνης

Η υδρόλυση του τμήματος της ημικυτταρίνης απαιτεί ένα πιο περίπλοκο σύνολο ενζύμων, τα οποία ονομάζονται ημικυτταρινάσες. Η πλήρης ενζυμική υδρόλυση της ξυλάνης, του κυριότερου πολυμερούς που εντοπίζεται στην ημικυτταρίνη, απαιτεί την ενδο-β-1,4-ξυλανάση, η οποία δρα τυχαία στους εσωτερικούς δεσμούς, για την απελευθέρωση ξυλο-ολιγοσακχαριτών και της β-ξυλοζιδάσης, η οποία υδρολύει τα μη αναγωγικά άκρα των αλυσίδων ξυλόζης προς απελευθέρωση ξυλόζης. Ακόμα απελευθερώνονται αρκετά βοηθητικά ένζυμα συμπεριλαμβανομένης της α-1-αραβινοφουρανοζιδάσης, της α-γαλακτοζιδάσης, της ακετυλ-ξυλανοεστεράσης καθώς και της εστεράσης φερουλικού οξέος (**Εικόνα 16**) (Maitan-Alfenas G.P).

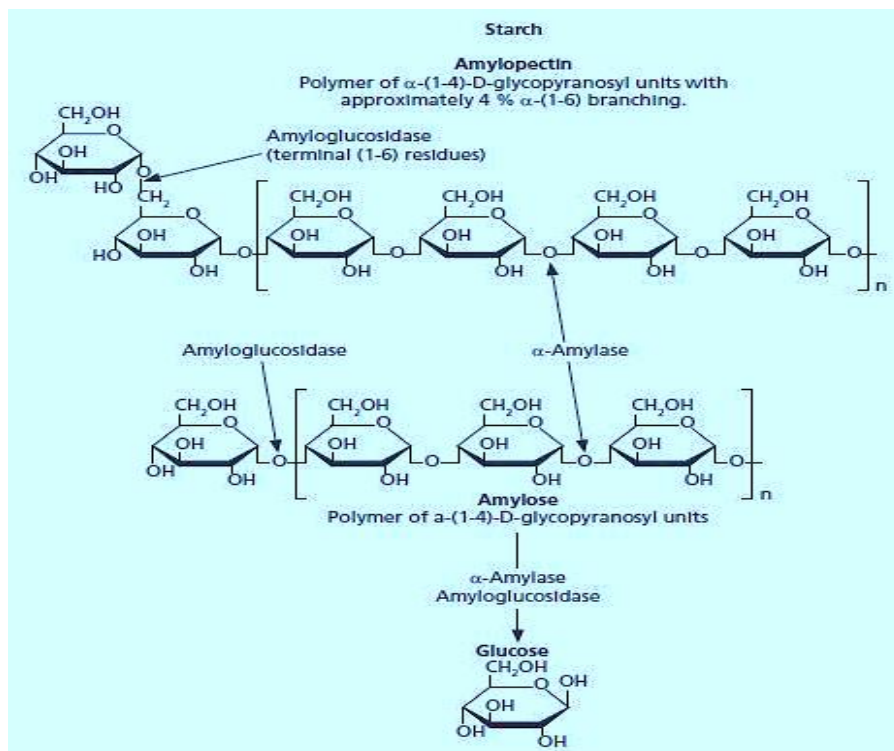


Εικόνα 16: Ενζυμική υδρόλυση ημικυτταρίνης

Ενζυμική υδρόλυση αμύλου

Η κύρια κατηγορία των ενζύμων που υδρολύουν τους α-(1 → 4) δεσμούς του αμύλου είναι οι α-αμυλάσες. Αυτά τα ένζυμα παράγονται από βακτήρια, μύκητες, φυτά και ζώα. Οι α-αμυλάσες είναι ενδο-ενεργά ένζυμα που προσβάλλουν τα εσωτερικά τμήματα των πολυμερικών αλυσίδων του αμύλου, προκαλώντας μια ταχεία μείωση του ιξώδους και μια ταχεία μεταβολή του χρώματος ιωδιούχου διαλύματος. Όταν η α-αμυλάση αντιμετωπίσει μια αλυσίδα αμύλου και υδρολύσει τον α-(1 → 4) δεσμό, παράγονται μαλτοδεξτρίνες χαμηλού μοριακού βάρους με μια διαδικασία που ονομάζεται ‘πολλαπλή επίθεση’ σε μία από τις δύο αλυσίδες που αρχικά είχαν διασπαστεί. (Robyt JF, 1967, Robyt JF, 1970).

Μια κοινή παρανόηση σχετικά με τη δράση των α-αμυλασών είναι ότι δρουν τυχαία, αλλά αυτό δεν είναι αλήθεια. Τα κύρια προϊόντα μαλτοδεξτρίνης που σχηματίζονται είναι συγκεκριμένου μεγέθους και εξαρτώνται από την ιδιαίτερη βιολογική πηγή της α-αμυλάσης. Μια ακόμη πιο κοινή παρανόηση, σχετικά με τη δράση των α-αμυλασών, είναι ότι η γλυκόζη είναι το κύριο προϊόν. Η γλυκόζη, στην πραγματικότητα, είναι ένα δευτερεύον προϊόν, που παράγεται από μια αργή δευτερεύουσα υδρόλυση της πρωτογενούς μαλτοδεξτρίνης μετά από δράση του ενζύμου αμυλογλυκοζιδάση (Robyt JF, 1967).



Εικόνα 17: Ενζυμική υδρόλυση αμόλου(Siegrist, 2013)

6.1. Παραγωγή υδρολυτικών ενζύμων-Μικροοργανισμοί

Τόσο τα βακτήρια, όσο και οι μύκητες μπορούν να παράγουν κυτταρινάσες για την υδρόλυση των λιγνινοκυτταρινούχων υλικών. Αυτοί οι οργανισμοί μπορεί να είναι αερόβιοι ή αναερόβιοι, μεσόφιλοι ή θερμόφιλοι.

Τα βακτήρια που ανήκουν στα Clostridium, Cellulomonas, Bacillus, Thermomonospora, Ruminococcus, Bacteriodes, Erwinia, Acetovibrio, Microbispora, και Streptomyces μπορούν να παράγουν κυτταρινάσες. Παρά το γεγονός ότι αρκετά κυτταρινολυτικά βακτήρια, κυρίως τα κυτταρινολυτικά αναερόβια, όπως το Clostridium thermocellum και το Bacterioides cellulosolvens, παράγουν κυτταρινάσες με υψηλή ειδικά δραστηριότητα, δεν παράγουν υψηλές ενζυμικές συγκεντρώσεις. Επειδή οι αναερόβιοι έχουν πολύ χαμηλό ρυθμό ανάπτυξης και απαιτούν αναερόβιες συνθήκες ανάπτυξης, η περισσότερη έρευνα επικεντρώνεται στους μύκητες, για εμπορική παραγωγή κυτταρινάσης

Σημαντικοί μύκητες στην παραγωγή κυτταρινασών είναι ο Trichoderma reesei, ο Aspergillus spp., ο Rhizopus spp και ο Fusarium oxysporum που αναλύεται εκτενώς σε επόμενη παράγραφο. Εκτός των προαναφερόμενων, και άλλοι μύκητες έχουν την ικανότητα να παράγουν φυσικά ένα μεγάλο δυναμικό κυτταρινασών. Ανάμεσα σε αυτούς οι αναερόβιοι και οι θερμόφιλοι αξίζουν ειδική προσοχή ,καθώς συμμετέχουν στην παραγωγή ενζύμων χρήσιμων στον μεταβολισμό υδατανθράκων, αλλά απαιτούν υψηλή γνώση τόσο του συνόλου των μεταβολικών μονοπατιών ,όσο και των απαραίτητων γενετικών τροποποιήσεων που πρέπει να υποστούν για αύξηση της παραγωγικότητάς τους (Antonella Amore, Vincenza Faraco, 2012).

6.2. Ζύμωση στερεάς κατάστασης (ΖΣΚ) για την παραγωγή ενζύμων

Η ζύμωση στερεάς κατάστασης (ΖΣΚ) ορίζεται ως 'η ανάπτυξη των μικροοργανισμών (κυρίως μυκήτων) σε στερεά υποστρώματα απουσία ελεύθερου νερού' (Cannel et al., 1980). Χρησιμοποιείται ευρέως για την παραγωγή προϊόντων υψηλής προστιθέμενης αξίας (αντιβιοτικά, αλκαλοειδή, κλπ.), βιοκαυσίμων, ένζυμων, οργανικών οξέων, αρωματικών ενώσεων. Ευρέως επίσης εφαρμόζεται στην βιοαποκατάσταση τοξικών ουσιών, στην αποικοδόμηση αποβλήτων της αγροτικής βιομηχανίας, στον εμπλουτισμό τροφίμων με θρεπτικές ουσίες και στην παραγωγή φαρμακευτικών προϊόντων. Η ζύμωση στερεάς κατάστασης χρησιμοποιείται, πλέον, εκτενώς, λόγω των αρκετών πλεονεκτημάτων της συγκριτικά με τις βυθισμένες καλλιέργειες. Με τη μέθοδο αυτή παράγονται σταθερότερα προϊόντα, με μικρότερες ενεργειακές απαιτήσεις, σε μικρότερου όγκου βιοαντιδραστήρες και τέλος μικρότερους όγκους αποβλήτων (Pérez- Guerra, et al., 2000).

6.2.1. Πλεονεκτήματα-μειονεκτήματα

Τα υποστρώματα για ζύμωση στερεάς κατάστασης προέρχονται κυρίως από υπολείμματα επεξεργασίας αγροτικών προϊόντων, όπως το ρύζι, τα σιτηρά, ο αραβόσιτος, το κριθάρι, η σόγια κλπ. Εναλλακτικά μπορούν να χρησιμοποιηθούν αγροτικά και δασικά παραπροϊόντα καθώς και απόβλητα βιομηχανιών παραγωγής τροφίμων (όπως πίτυρο σίτου, υπόλειμμα σόγιας μετά την εκχύλιση των ελαίων). (Pérez- Guerra, et al., 2000).

Συγκριτικές μελέτες ανάμεσα στη ζύμωση στερεάς κατάστασης και σε βυθισμένες ζυμώσεις εμφανίζουν σημαντικά πλεονεκτήματα της πρώτης:

- ✓ μεγαλύτερες ή και ίσες αποδόσεις έναντι αυτών της βυθισμένης ζύμωσης
- ✓ η χαμηλή συγκέντρωση ύδατος στην ζύμωση στερεάς κατάστασης οδηγεί στη διατήρηση των ασηπτικών συνθηκών
- ✓ οι συνθήκες υγρασίας, θερμοκρασίας και pH παρουσιάζουν έντονες ομοιότητες με τις φυσικές συνθήκες ανάπτυξης των περισσότερων μυκήτων (Raimbault, et al., 1998)
- ✓ υψηλότερα επίπεδα αερισμού, ειδικά στις διεργασίες που απαιτούν έντονο οξειδωτικό μεταβολισμό
- ✓ ο εμβολιασμός με σπόρια ευνοεί την διασπορά των κυττάρων στο μέσο ανάπτυξης
- ✓ το μέσο της καλλιέργειας είναι συνήθως πολύ απλό
- ✓ απλός σχεδιασμός αντιδραστήρων
- ✓ χαμηλές ενεργειακές απαιτήσεις
- ✓ μικρός όγκος απόβλητων
- ✓ η χαμηλή υγρασία του θρεπτικού μέσου ευνοεί την παραγωγή προϊόντων που δεν μπορούν να παραχθούν σε συνθήκες βυθισμένης καλλιέργειας
- ✓ σε ορισμένες περιπτώσεις τα λαμβανόμενα προϊόντα διαφέρουν στις ιδιότητες από αυτά της βυθισμένης καλλιέργειας
- ✓ μικρότεροι όγκοι αντιδραστήρων (Pérez- Guerra, et al., 2000).

Η ζύμωση στερεάς κατάστασης παρουσιάζει και κάποια μειονεκτήματα όπως:

- ✓ μπορούν να χρησιμοποιηθούν μόνο μικροοργανισμοί που αναπτύσσονται σε χαμηλό περιεχόμενο υγρασίας
- ✓ τις περισσότερες φορές τα υποστρώματα απαιτούν προκατεργασία
- ✓ ο προσδιορισμός της κυτταρικής ανάπτυξης είναι δύσκολος
- ✓ η στερεά φύση των υποστρωμάτων δημιουργεί προβλήματα στον έλεγχο παραμέτρων της διεργασίας (pH, περιεχόμενη υγρασία, συγκέντρωση οξυγόνου και βιομάζας)

- ✓ η ανάδευση είναι δύσκολη, συνεπώς προτιμώνται στατικές συνθήκες
- ✓ συχνά απαιτούνται μεγάλοι όγκοι εμβολίου
- ✓ οι πληροφορίες αναφορικά με το σχεδιασμό και τη λειτουργία αντιδραστήρων μεγάλης κλίμακας είναι λιγιστές
- ✓ πιθανότητα μόλυνσης από άλλους μύκητες
- ✓ η απομάκρυνση της θερμότητας κατά τη διάρκεια της ανάπτυξης είναι δύσκολη
- ✓ τα εκχυλίσματα που λαμβάνονται από τα ζυμωμένα στερεά έχουν συνήθως υψηλό ιξώδες
- ✓ η μεταφορά μάζας περιορίζεται από τη διάχυση
- ✓ σε ορισμένες ζύμωση στερεάς κατάστασης ο αερισμός είναι δύσκολος λόγω υψηλής συγκέντρωσης υποστρώματος
- ✓ τα σπόρια παρουσιάζουν μεγαλύτερη λανθάνουσα φάση λόγω της απαίτησης για βλάστηση
- ✓ οι χρόνοι καλλιέργειας είναι μεγαλύτεροι από αυτούς της βυθιζόμενης ζύμωσης (Kumar, *et al.*, 1989).

6.2.2. Επίδραση περιβαλλοντικών παραγόντων

Θερμοκρασία

Η αύξηση της θερμοκρασίας σε ΖΣΚ είναι συνέπεια της μεταβολικής δραστηριότητας, όταν η απομάκρυνση θερμότητας δεν είναι αρκετή. Αυτό έχει επιπτώσεις, άμεσα, στη ανάπτυξη των σπορίων, στην αύξηση και στο σχηματισμό των επιθυμητών προϊόντων. Το επίπεδο θερμοκρασίας, που επιτυγχάνεται, εξαρτάται από τον τύπο του μικροοργανισμού, το πορώδες του, τη διάμετρο μορίων και το βάθος του υποστρώματος (Raghavarao, *et al.*, 2003). Η μεταφορά θερμότητας σε ΖΣΚ είναι πολύ χαμηλή, λόγω της περιορισμένης ικανότητας μεταφοράς θερμότητας από τα στερεά υποστρώματα που χρησιμοποιούνται. Η γενική μεταφορά θερμότητας εξαρτάται από τα ποσοστά του δια- και ένδο- μεταφοράς θερμότητας από την επιφάνεια μορίων στη φάση αερίου (Raimbault *et al.*, 1998).

Ο έλεγχος της θερμοκρασίας είναι δυσκολότερος στην ΖΣΚ απ' ό τι στην βυθιζόμενη ζύμωση. Κατά συνέπεια, οι μέθοδοι ελέγχου που χρησιμοποιούνται σε SLF δεν είναι κατάλληλες για ΖΣΚ (Bellon-Maurel *et al.*, 2003). Ο αερισμός είναι η κύρια μέθοδος που χρησιμοποιείται συμβατικά για τον έλεγχο της θερμοκρασίας του υποστρώματος (Karanth, *et al.*, 2003). Επειδή τα υψηλά ποσοστά αερισμού μπορούν να μειώσουν την ενεργότητα του ύδατος από την εξάτμιση υποστρώματος, χρησιμοποιείται συνήθως εμπλουτισμένος αέρας με ύδωρ (Ranganathan, *et al.*, 2003).

pH

Η μέτρηση και ο έλεγχος αυτής του pH σε ΖΣΚ είναι πολύ δύσκολος. Εντούτοις, τα υποστρώματα που χρησιμοποιούνται σε ΖΣΚ έχουν συνήθως ρυθμιστικές ικανότητες και ο έλεγχος του pH δεν είναι απαραίτητος. Όταν αυτή η μεταβλητή πρέπει να ελεγχθεί, προστίθενται ρυθμιστικά διαλύματα, ως υγρή φάση. Άλλος τρόπος ελέγχου της μεταβολής του pH είναι η προσθήκη ενός μίγματος πηγών αζώτου με αντίθετη δράση στην μεταβολή του pH. Άλατα αμμωνίου έχουν χρησιμοποιηθεί σε ΖΣΚ σε συνδυασμό με άλατα της ουρίας ή νιτρικά άλατα (Torrado, *et al.*, 1998).

6.2.3. Επιλογή των μικροοργανισμών

Η δυνατότητα των μικροοργανισμών για την ανάπτυξη τους σε ένα στερεό υπόστρωμα εξαρτάται από τις απαιτήσεις τους ως προς την περιεχόμενη υγρασία, της ικανότητας παραμονής και της διεϊσδυσής τους στο υπόστρωμα και τη δυνατότητα να αφομοιωθούν

μίγματα διαφορετικών πολυσακχαριτών λόγω της σύνθετης φύσης τους (Mitchell, *et al.*, 1992).

Οι ινώδης μύκητες είναι οι καλύτερα χρησιμοποιούμενοι μικροοργανισμοί για ζύμωση στερεάς κατάστασης εξαιτίας των ενζυμικών και βιοχημικών ιδιοτήτων τους. Ο τρόπος μυκητιακής ανάπτυξης δίνει στους ινώδης μύκητες την ικανότητα να διασπείρονται και να διαπερνούν στα στερεά υποστρώματα, για την αποίκιση του υποστρώματος και τη χρησιμοποίηση του διαθέσιμων θρεπτικών ουσιών. Επιπλέον, η δυνατότητά τους να αναπτυχθούν σε χαμηλή ενεργότητα ύδατος (ένα aw) και σε συνθήκες υψηλής ωσμωτικής πίεσης καθιστά τους μύκητες αποδοτικούς και ανταγωνιστικούς στη βιομετατροπή των στερεών υποστρωμάτων (Ramesh, *et al.*, 1991).

Βακτηρία και οι ζύμες έχουν χρησιμοποιηθεί επίσης στην παραδοσιακή καλλιέργεια σε ΖΣΚ. Τα βακτηρία έχουν χρησιμοποιηθεί για ενζυμική παραγωγή, λίπανση και την αποθήκευση τροφίμων (π.χ. λουκάνικα, ιαπωνικό *natto*, κόλλα σόγιας, κινεζικό ξίδι) (Prabhu *et al.*, 1995) Οι ζύμες κυρίως χρησιμοποιούνται για την παραγωγή αιθανόλης και τον πρωτεϊνικό εμπλουτισμό των γεωργικών υπολειμμάτων (Hang *et al.*, 1986).

6.2.4. Εφαρμογές

Η ΖΣΚ παρουσιάζει κοινωνικοοικονομικές εφαρμογές που προσφέρουν σημαντικές δυνατότητες για τη βελτίωση του βιοτικού επιπέδου με χαμηλή απαίτηση τεχνολογικού κόστους. Ο Πίνακας 5 παρουσιάζει μερικά παραδείγματα των διαδικασιών ΖΣΚ στους οικονομικούς τομείς της αγροβιομηχανίας, της βιομηχανίας περιβαλλοντικού ελέγχου και βιομηχανικών καλλιεργειών (Pandey, *et al.*, 2000).

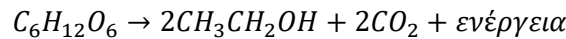
Πίνακας 5.:Εφαρμογές της ΖΣΚ (Perez-Guerra *et al.*, 2003)

| Τομέας | Εφαρμογή | Παράδειγμα |
|---|--|--|
| Αγροτική Βιομηχανία & Βιομηχανία Τροφίμων | Βιομετατροπή υπολειμμάτων | Παραδοσιακά ζυμωμένα τρόφιμα (Koji, sake, ragi, tempoh), μονοκυτταρική πρωτεΐνη, παραγωγή μανιταριών |
| | Πρόσθετα τροφίμων | Αρωματικές ενώσεις, χρωστικές οργανικά οξέα |
| Περιβαλλοντικός έλεγχος | Βιοαποκατάσταση και βιοαποικοδόμηση τοξικών ουσιών | Εντομοκτόνα και PCBs |
| | Βιολογική αποτοξίνωση αγροτοβιομηχανικών αποβλήτων | Πούλπα καφέ, υπολείμματα cassava |
| Βιομηχανικές ζυμώσεις | Παραγωγή ενζύμων | Αμυλάσες, αμυλογλυκοζιδάσες, κυτταρινάσες, πρωτεάσες, πηκτινάσες, ξυλανάσες, γλυκοαμυλάσες |
| | Βιοδραστικά προϊόντα | Μυκοτοξίνες, αντιβιοτικά, ορμόνες, αλκαλοειδή |
| | Παραγωγή οργανικών οξέων | Κιτρικό, φουμαρικό, γαλακτικό οξύ |
| | Βιοκαύσιμα | Παραγωγή αιθανόλης |

7. Αλκοολική ζύμωση

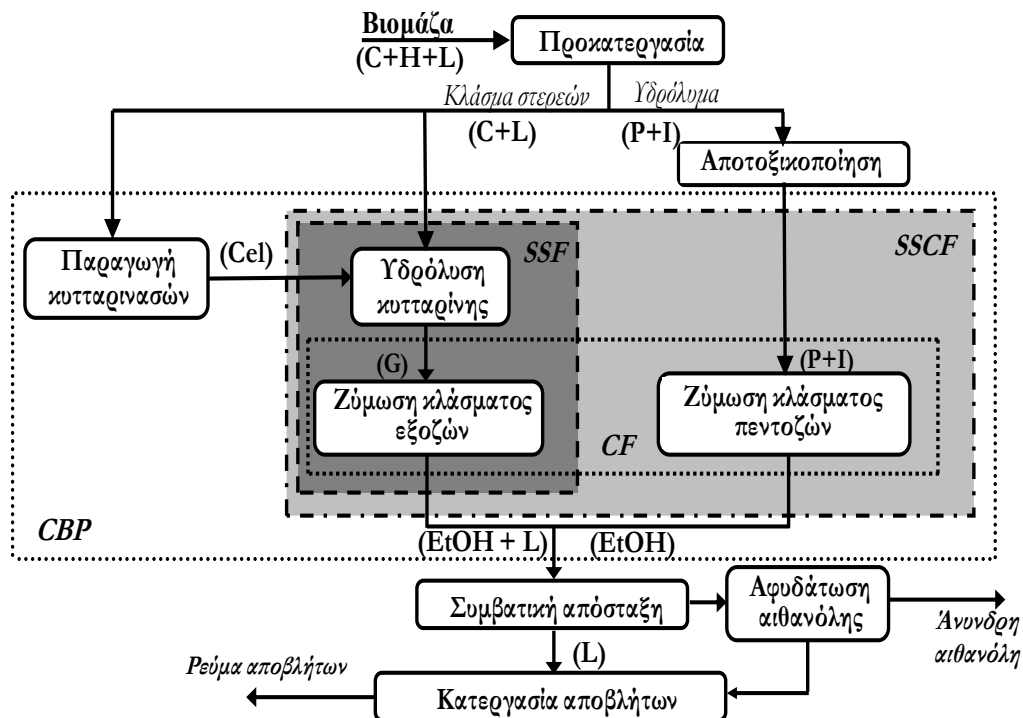
7.1. Γενικά

Η αλκοολική ζύμωση είναι το αναερόβιο μονοπάτι που διεξάγεται από ζυμομύκητες, στους οποίους απλά σάκχαρα (γλυκόζη, φρουκτόζη, γαλακτόζη) μετατρέπονται σε αιθανόλη και διοξείδιο του άνθρακα. Η βασική εξίσωση της αλκοολικής ζύμωσης δείχνει ότι η ζύμη ξεκινά με τη γλυκόζη και τερματίζει με διοξείδιο του άνθρακα και αιθανόλη.



7.2. Τεχνολογίες παραγωγής βιοαιθανόλης

Μετά την προκατεργασία της πρώτης ύλης, η βιομετατροπή μπορεί να πραγματοποιηθεί με διαχωρισμό ή συνδυασμό των σταδίων της ενζυμικής υδρόλυσης και της ζύμωσης (**Εικόνα 18**) (Cardona & Sánchez 2007).



Εικόνα 18: Γενικευμένο διάγραμμα παραγωγής βιοαιθανόλης από λιγνινοκυτταρινούχα βιομάζα. Δυνατότητες σύζευξης διεργασιών παρουσιάζονται στα σκιασμένα τμήματα. CF: Ταυτόχρονη ζύμωση κλάσματος εξοζών και πεντοζών (Co-Fermentation), SSF: Ταυτόχρονη σακχαροποίηση και ζύμωση (Simultaneous Saccharification and Fermentation), SSCF: Ταυτόχρονη σακχαροποίηση και ζύμωση κλάσματος εξοζών και πεντοζών (Simultaneous Saccharification and Co-Fermentation), CBP: Ενοποιημένη βιοδιεργασία (Consolidated BioProcessing). C: κυτταρίνη, H: ημικυτταρίνη, L: λιγνίνη, Cel: κυτταρινάσες, G: γλυκόζη, P: πεντόζες, I: παρεμποδιστές, EtOH: αιθανόλη (Cardona & Sánchez, 2007).

7.2.1. Διακριτή υδρόλυση και ζύμωση (SHF)

Όταν η ενζυμική υδρόλυση πραγματοποιείται ξεχωριστά από το στάδιο της ζύμωσης τότε η διεργασία καλείται «διακριτή υδρόλυση και ζύμωση» ή συντομογραφικά **SHF** (Separate Hydrolysis and Fermentation). Στη διάταξη αυτή η ενζυμική υδρόλυση της κυτταρίνης και της ημικυτταρίνης γίνεται σε ένα βιοαντιδραστήρα και το υγρό, με τα προϊόντα της υδρόλυσης (εξόζες και πεντόζες), μεταφέρεται σε έναν δεύτερο βιοαντιδραστήρα, όπου κατάλληλοι μικροοργανισμοί μεταβολίζουν τα σάκχαρα σε βιοαιθανόλη. Το κύριο πλεονέκτημα της SHF είναι, ότι το κάθε στάδιο επιτελείται στις βέλτιστες συνθήκες (θερμοκρασία, pH), που συνήθως διαφέρουν αρκετά μεταξύ τους (45-50°C για υδρόλυση, 28-37°C για ζύμωση). Το μειονέκτημα είναι, ότι τα υδρολυτικά ένζυμα (κυτταρινάσες & ημικυτταρινάσες) παρεμποδίζονται από τα προϊόντα υδρόλυσης, με αποτέλεσμα, η συσσώρευση εξοζών και πεντοζών να οδηγεί σε σταδιακή μείωση του ρυθμού υδρόλυσης. Συνήθως, η ζύμωση των πεντοζών γίνεται σε διαφορετικό βιοαντιδραστήρα, γιατί απαιτεί περισσότερο χρόνο και διαφορετικούς μικροοργανισμούς σε σχέση με τις εξόζες, αυξάνοντας έτσι το συνολικό κόστος (Hamelinck *et al.* 2005, Mosier *et al.* 2005, Hahn-Hagerdal *et al.* 2006, Chandel *et al.* 2007, Cardona & Sánchez 2007, Balat *et al.* 2008, Sánchez & Cardona 2008).

7.2.2. Ταυτόχρονη Σακχαροποίηση και Ζύμωση (SSF)

Την ιδέα για ταυτόχρονη εφαρμογή της ενζυμικής υδρόλυσης και ζύμωσης την προώθησε, το 1976 ο Gauss (Gauss *et al.*, 1976). Οι ερευνητές παρατήρησαν ότι οι αποδόσεις γλυκόζης, στην κλασική ενζυμική υδρόλυση ήταν χαμηλές, πιθανώς, λόγω της αναστολής της δράσης των υδρολυτικών ενζύμων από τα τελικά προϊόντα της υδρόλυσης (γλυκόζη και κελοβιόζη). Ωστόσο, με εφαρμογή της τεχνολογίας SSF, παρατήρησαν ότι προέκυπταν μεγαλύτερες αποδόσεις αιθανόλης. Απέδωσαν την αύξηση αυτή στην απομάκρυνση της γλυκόζης και της κελοβιόζης κατά τη ζύμωση, αίροντας την αναστολή της δράσης των ενζύμων. Το τελευταίο είναι και ο πιο σημαντικός λόγος για τη χρήση της SSF παρότι υπάρχουν πολλά ακόμα πλεονεκτήματα. Ο συνδυασμός υδρόλυσης-ζύμωσης μειώνει τον αριθμό των απαιτούμενων βιοαντιδραστήρων και κατ' επέκταση του κόστους εξοπλισμού. Η μείωση του κεφαλαιουχικού κόστους εκτιμάται ότι είναι μεγαλύτερη του 20% γεγονός ιδιαίτερα σημαντικό καθώς το κεφαλαιουχικό κόστος μπορεί να είναι συγκρίσιμο με το κόστος της πρώτης ύλης κατά την παραγωγή αιθανόλης. Άλλα πλεονεκτήματα της τεχνολογίας SSF, όπως η συγκατανάλωση πεντοζών και εξοζών, αλλά και η αποτοξίνωση (Olofsson *et al.*, 2008).

Ωστόσο, είναι αυτονόητο ότι τα ένζυμα, για την υδρόλυση της κυτταρίνης, και οι μικροοργανισμοί, για την ζύμωση, απαιτούν διαφορετικές βέλτιστες συνθήκες (κυρίως θερμοκρασίας και pH). Οι κυτταρινάσες υδρολύουν σε ένα άριστο pH 4-5 και σε θερμοκρασία 40-50°C, ενώ η ζύμωση των εξοζών πραγματοποιείται στους 30°C και στο ίδιο pH. Το πρόβλημα αυτό μπορεί να ξεπεραστεί με χρήση γενετικά τροποποιημένων μικροοργανισμών, οι οποίοι είναι ικανοί να ζυμώσουν τη γλυκόζη, την ξυλόζη και την αραβινόζη. Από οικονομικής σκοπιάς, οι αποδόσεις της SSF πρέπει να προσεγγίσουν αυτές που έχουν επιτευχθεί από τις αμυλούχες πρώτες ύλες (Olofsson *et al.*, 2008).

7.2.3. Ενοποιημένη βιοδιεργασία (CBP)

Μια εναλλακτική στρατηγική στη βιομετατροπή της λιγνινοκυτταρινούχου βιομάζας είναι η «ενοποιημένη βιοδιεργασία» (Consolidated Bioprocessing) ή CBP, γνωστή και ως «άμεση μικροβιακή μετατροπή» (Direct Microbial Conversion, DMC), στην οποία εφαρμόζεται ένα μόνο μικροβιακό σύστημα που έχει την ικανότητα να παράγει τα απαραίτητα υδρολυτικά ένζυμα και να μεταβολίζει τα προϊόντα τους σε αιθανόλη. Η ιδέα της CBP ενσωματώνει σε ένα μοναδικό στάδιο τρεις βιομετατροπές: (α) παραγωγή των υδρολυτικών

ενζύμων, (β) υδρόλυση των δομικών συστατικών της βιομάζας, (γ) ζύμωση των παραγόμενων εξοζών (γλυκόζης, μαννόζης, γαλακτόζης) και των πεντοζών (ξυλόζης, αραβινόζης). Η CBP προσφέρει τη δυνατότητα για χαμηλότερο κόστος παραγωγής βιοκαυσίμων, χαμηλότερες ενεργειακές απαιτήσεις, υψηλότερη αποδοτικότητα βιομετατροπής σε σχέση με την SSF και πλήρη συμβατότητα μικροοργανισμών-ενζύμων. Επίσης, δεν απαιτούνται επιπλέον κεφάλαια και λειτουργικό κόστος για την παραγωγή των ενζύμων. Υποψήφιοι μικροοργανισμοί για CBP είναι ορισμένοι μύκητες όπως *Fusarium*, *Neurospora*, *Monilia*, *Rhizopus*, *Aspergillus*, και *Trichoderma*, οι οποίοι παράγουν υδρολυτικά ένζυμα και μπορούν να μετατρέπουν τα παραγόμενα από την υδρόλυση σάκχαρα σε αιθανόλη, με χαμηλές όμως αποδόσεις και αργούς ρυθμούς ζύμωσης (Lynd et al. 2005, Panagiotou et al. 2005, Cardona & Sánchez 2007, van Zyl et al. 2007, Chandel et al. 2007, Carere et al. 2008, Xu 2009, Knocke & Vogt 2009, Hayes 2009, Wei et al. 2009).

7.2.4. Μικροοργανισμοί στην αλκοολική ζύμωση

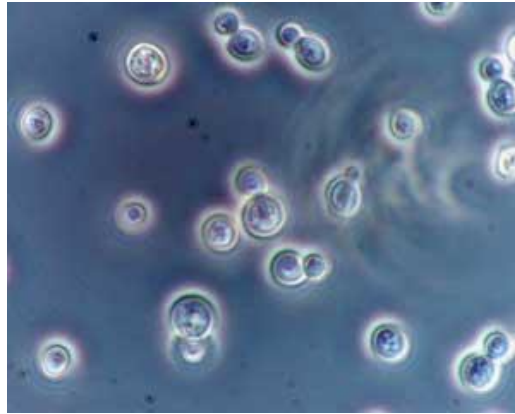
Οι μικροοργανισμοί είναι απαραίτητοι στο στάδιο της μετατροπής, όπου και συντελείται ο μεταβολισμός των ζυμώσιμων σακχάρων (πεντόζες, εξόζες), που προέκυψαν από την υδρόλυση της λιγνινοκυτταρινούχου βιομάζας. Στο στάδιο αυτό, παράγεται η επιθυμητή αιθανόλη, CO₂ και άλλα παραπροϊόντα. Για να χρησιμοποιηθεί κάποιος μικροοργανισμός στην παραγωγή αιθανόλης πρέπει να πληροί κάποια κριτήρια. Κάποια από αυτά είναι η ικανότητα του μικροοργανισμού να παράγει υψηλές αποδόσεις αιθανόλης, με μεγάλη, μάλιστα, παραγωγικότητα αλλά και να είναι ανθεκτικοί στην υψηλές συγκεντρώσεις αιθανόλης.

Οι πιο σημαντικοί και πιο ευρέως χρησιμοποιημένοι μικροοργανισμοί στην παραγωγή αιθανόλης είναι ο *Saccharomyces cerevisiae*, ο *Pichia stipitis* (ευκαρυωτικοί), ο *Escherichia coli* και ο *Zymomonas mobilis* (προκαρυωτικοί).

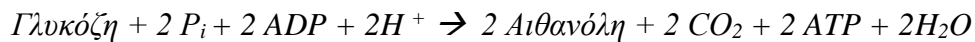
7.2.4.1. *Saccharomyces cerevisiae*

Η ζύμη *Saccharomyces cerevisiae*, είναι μονοκύτταρος οργανισμός και αναπαράγεται με εκβλάστηση (Εικόνα 17). Είναι πιθανώς ο πιο οικείος στον άνθρωπο ζυμομύκητας, τόσο λόγω της χρήσης του από αρχαιοτάτων χρόνων στην αρτοποιεία και ζυθοποιεία, όσο και γιατί είναι ένας από τους πιο εκτενώς μελετημένους ευκαρυωτικούς οργανισμούς από την μοριακή και κυτταρική βιολογία. Το γονιδίωμα του ήταν το πρώτο ευκαρυωτικό γονιδίωμα που αποκωδικοποιήθηκε το 1996. Η κατάταξη του *Saccharomyces cerevisiae* σύμφωνα με την βάση δεδομένων NCBI (National Center for Biotechnology Information) είναι η εξής : Eukaryota (Υπερβασίλειο), Fungi (Βασίλειο), Ascomycota (Φύλο), Saccharomycotina (Υποφύλο), Saccharomycetes (Κλάση), Saccharomycetales (Τάξη), Saccharomycetaceae (Οικογένεια), *Saccharomyces* (Γένος), *Saccharomyces cerevisiae* (Είδος).

Εικόνα 19: Ο μικροοργανισμός *Saccharomyces cerevisiae* από οπτικό μικροσκόπιο



Ο *Saccharomyces cerevisiae* είναι ικανός να λειτουργεί τόσο υπό αερόβιες όσο και υπό αναερόβιες συνθήκες. Γλυκόλυση [μονοπάτι EMP (Embden-Meyerhof-Parnas)] είναι μία αλληλουχία αντιδράσεων μέσω των οποίων η γλυκόζη μετατρέπεται σε πυροσταφυλικό οξύ με ταυτόχρονη παραγωγή ATP. Στους αερόβιους οργανισμούς η γλυκόλυση προηγείται του κύκλου του τρικαβοξυλικού οξέος (κύκλος Krebs) και της αλυσίδας μεταφοράς ηλεκτρονίων. Στα δύο αυτά μονοπάτια αποθηκεύεται το μεγαλύτερο ποσοστό της ενέργειας που περιέχεται στη γλυκόζη. Υπό αερόβιες συνθήκες το πυροσταφυλικό εισέρχεται στα μιτοχόνδρια, όπου και οξειδώνεται σε CO₂ και H₂O. Αν η παροχή οξυγόνου είναι ανεπαρκής, το πυροσταφυλικό μετατρέπεται σε γαλακτικό οξύ. Σε μερικούς αναερόβιους μικροοργανισμούς, όπως οι ζύμες, το πυροσταφυλικό μετατρέπεται σε αιθανόλη (Stryer, 1988). Η συνολική αντίδραση μετατροπής της γλυκόζης σε αιθανόλη είναι :



Συνοπτικά, η γλυκόζη διασπάται σε δύο μόρια πυροσταφυλικού οξέος, με τη δράση ενζύμων, σε μια σειρά χημικών μετατροπών. Τα δύο αυτά πυροσταφυλικά αποκαρβοξυλιώνονται με τη δράση της πυροσταφυλικής αποκαρβοξυλάσης, για να σχηματίσουν δύο μόρια ακεταλδεΐδης και CO₂. Το τελευταίο στάδιο στο σχηματισμό αλκοόλης, είναι η προσθήκη πρωτονίου στην αλδεΐδη, για σχηματισμό αιθανόλης. Αυτό το πρωτόνιο λαμβάνεται από το NADH, που παράγεται κατά τη διάρκεια της γλυκόλυσης και μετατρέπεται ξανά σε NAD⁺ (F.W.Bai, et al, 2008).

7.2.4.2. Ο μύκητας *Fusarium oxysporum*

Οι μύκητες του γένους *Fusarium* είναι νηματοειδείς μύκητες και βρίσκονται ευρέως καταναμημένοι στα φυτά και στο έδαφος. Συνήθως εμφανίζονται στην φυσική μικροχλωρίδα φυτικών αγαθών, όπως ρύζι, φασόλι, σόγια και άλλες σοδειές (Pitt et al. 1994). Το γένος *Fusarium* ήδη περιέχει περισσότερα από 20 είδη. Τα πιο κοινά είναι *Fusarium solani*, *Fusarium chlamydosporum* και *Fusarium oxysporum*.

Ο μύκητας *Fusarium oxysporum* είναι από τους λίγους μικροοργανισμούς που έχουν αναφερθεί ότι ζυμώνουν κυτταρινούχα υλικά απευθείας σε αιθανόλη (Christakopoulos et al. 1989). Η κατάταξη του *Fusarium oxysporum* σύμφωνα με την βάση δεδομένων NCBI (National Center for Biotechnology Information) είναι η εξής : Eukaryota (Υπερβασιλείο), Fungi (Βασιλείο), Ascomycota (Φύλο), Pezizomycotina (Υποφύλο), Sordariomycetes (Κλάση), Hypocreomycetidae (Υποκλάση), Hypocreales (Τάξη), *Fusarium* (Γένος), *Fusarium oxysporum* (Είδος).

Συγκεκριμένα το στέλεχος *Fusarium oxysporum* F3, που έχει απομονωθεί από το κύμνο, εμφανίζει πολύ καλές αποδόσεις σε αιθανόλη. Ο *F. oxysporum* διαθέτει την ικανότητα ζύμωσης όχι μόνο της γλυκόζης και της ξυλόζης, αλλά και της κελλοβιόζης και της κυτταρίνης. Ο μύκητας *F. oxysporum* F3 διαθέτει την εκπληκτική ικανότητα μετατροπής της κυτταρίνης και της ημικυτταρίνης άμεσα προς αιθανόλη, μέσω διαδοχικών σταδίων υδρόλυσης των πολυσακχαριτών και ζύμωσης των ολιγοσακχαριτών που προκύπτουν (Christakopoulos et al. 1989). Επειδή παράγει ένα μεγάλο εύρος χαρακτηρισμένων κυτταρινασών και ξυλανασών, δεν είναι απαραίτητη η ενζυμική υδρόλυση της λιγνινοκυτταρινούχου πρώτης ύλης, εάν χρησιμοποιηθεί ο *F. oxysporum* για την παραγωγή βιοαιθανόλης από φυτική βιομάζα (Panagiotou et al. 2005α).



Εικόνα 20: Μικροσκοπική παρουσίαση του *Fusarium oxysporum*.

Η παραγωγή της αιθανόλης από το στέλεχος F3 επηρεάζεται σημαντικά από το pH, τόσο κατά το στάδιο της αερόβιας προκαλλιέργειας, όσο και της αναερόβιας ζύμωσης. Οι βέλτιστες τιμές παραγωγής έχουν βρεθεί όταν η τιμή του pH στην αερόβια προκαλλιέργεια και στην αναερόβια ζύμωση της κυτταρίνης ήταν 5.5 και 6, αντίστοιχα. Η βέλτιστη θερμοκρασία ανάπτυξης, όσον αφορά την απόδοση σε αιθανόλη, έχει βρεθεί στους 34 °C (Christakopoulos et al. 1989). Η μετατροπή της κυτταρίνης προς αιθανόλη από τον *F. oxysporum* είναι μια αργή διαδικασία και έχει ως αποτέλεσμα τον σχηματισμό σημαντικών ποσοτήτων οξικού οξέος ως παραπροϊόν (Panagiotou et al. 2005α).

Η ανάπτυξη του μύκητα σε μέσο κυτταρίνης έχει ως αποτέλεσμα την παραγωγή εξωκυτταρικών ενζύμων ενδογλουκανάσης [endo-(1→4)-β-D-glucanase], εξωγλουκανάσης [exo-(1→4)-β-D-glucanase] και β-γλυκοζιδάσης [cellobiase ή β-D-glucosylhydrolase]. Από αυτά, οι ενδογλουκανάσες και οι εξωγλουκανάσες δρουν συνεργιστικά με αποτέλεσμα την εκτενή διαλυτοποίηση της κρυσταλλικής κυτταρίνης. Η β-γλυκοζιδάση δεν έχει άμεσο ρόλο στην διάλυση του πλέγματος της κυτταρίνης, αλλά λειτουργεί σε επόμενα στάδια της αποικοδόμησης (Christakopoulos et al. 1994). Ο μύκητας *F. oxysporum* παράγει επαρκή επίπεδα ενεργότητας β-γλυκοζιδάσης ώστε να αποτραπεί έντονη αναστολή από το προϊόν, την κελλοβιόζη, κατά την διαδικασία της υδρόλυσης (Panagiotou et al. 2005β).

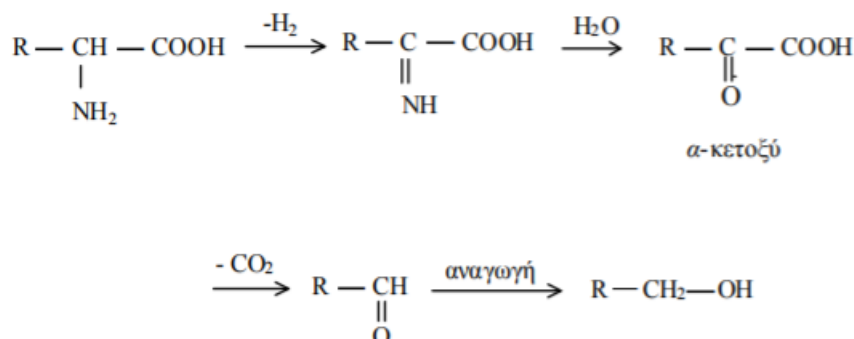
8. Παραπροϊόντα αλκοολικής ζύμωσης

Τα παραπροϊόντα της αλκοολικής ζύμωσης είναι χημικές ενώσεις που προέρχονται είτε από τον ίδιο το μηχανισμό της αλκοολικής ζύμωσης, είτε από το μεταβολισμό της ζύμης, είτε από την πρώτη ύλη. Κυριότερα παραπροϊόντα της αλκοολικής ζύμωσης είναι η μεθανόλη, οι ανώτερες αλκοόλες, η γλυκερίνη, η ακεταλδεΐδη, τα οξέα, οι εστέρες και οι ακετάλες.

- Η **μεθανόλη** δεν προέρχεται από το μηχανισμό της αλκοολικής ζύμωσης, αλλά παράγεται από την υδρόλυση των πηκτινικών υλών. Το μόριο των πηκτινών είναι ένας πολυσακχαρίτης που έχει ως μονομερές γαλακτουρονικό οξύ με ελεύθερες και

εστεροποιημένες, με μεθύλιο, καρβοξυλικές ομάδες. Οι τελευταίες υδρολύονται σε μεθανόλη, με την καταλυτική δράση του ενζύμου πηκτινομεθυλεστεράση.

- Οι **ανώτερες αλκοόλες** σχηματίζονται από την αποκαρβοξυλίωση και απαμίνωση των αμινοξέων, καθώς και από τα σάκχαρα με σύνθεση από τις ζύμες των αντίστοιχων α-κετοξέων, τα οποία, στη συνέχεια, αποκαρβοξυλιώνονται και ανάγονται προς αλκοόλες. Οι πιο σημαντικές είναι η 1-προπανόλη, η ισοπροπυλική, η ισοβουτυλική, η 1-εξανόλη, η 2-μέθυλο-1-βουτανόλη και 3-μέθυλο-1-βουτανόλη.



Εικόνα 21: Μηχανισμός απαμίνωσης και αποκαρβοξυλίωσης των αμινοξέων κατά το σχηματισμό των ανώτερων αλκοολών

- Η **γλυκερίνη** παράγεται από τις ζύμες στην αρχή της ζύμωσης. Είναι σημαντικό παραπροϊόν της αλκοολικής ζύμωσης και η συγκέντρωσή τους εξαρτάται από το στέλεχος της ζύμης και από τις συνθήκες ζύμωσης. Ο σχηματισμός της ευνοείται από χαμηλές θερμοκρασίες, υψηλή περιεκτικότητα σε τρυγικό οξύ και από την προσθήκη SO_2 .



Εικόνα 22: Δέσμευση της ακατελδεύδης από το θειώδες

- Η **ακεταλδεΐδη** είναι παραπροϊόν της αλκοολικής ζύμωσης και προκύπτει από το μηχανισμό της αλκοολικής ζύμωσης από την αποκαρβοξυλίωση του πυροσταφυλικού οξέος. Η προσθήκη θειώδους έχει ως αποτέλεσμα τη δέσμευση της ακεταλδεΐδης λόγω της αντίδρασης προσθήκης.
- Το σημαντικότερο **οξύ**, που παράγεται ως παραπροϊόν, είναι το **οξικό οξύ**. Ένα μέρος της περιεκτικότητάς του οφείλεται στην οξείδωση της ακεταλδεΐδης, ενώ ένα άλλο μέρος οφείλεται στη δράση των οξικών βακτηρίων, που οξειδώνουν την αιθυλική αλκοόλη σε οξικό οξύ, με τη βοήθεια του ενζύμου αλκοολοξειδάση, παρουσία ατμοσφαιρικού οξυγόνου. Άλλα οξέα είναι το γαλακτικό, το μυρμηκικό, το βουτυρικό και το προπιονικό οξύ.
- Οι **εστέρες** σχηματίζονται μέσω της αμφίδρομης αντίδρασης της εστεροποίησης, όταν μια αλκοόλη αντιδρά με ένα οξύ. Οι εστέρες της αιθυλικής αλκοόλης είναι οι πιο σημαντικοί, ενώ ακολουθούν και οι οξικοί εστέρες των ανώτερων αλκοολών. Ο ρόλος

των εστέρων στα κύτταρα ζύμης δεν έχει γίνει πλήρως κατανοητός ακόμα. Κατά την αναερόβια ζύμωση, τα κύτταρα του *S. cerevisiae* απελευθερώνουν μεγάλες ποσότητες μεσαίου μεγέθους αλυσίδες λιπαρών οξέων, από τους αντίστοιχους εστέρες. Γνωρίζοντας ότι αυτά τα λιπαρά οξέα είναι τοξικά για τις ζύμες, πιστεύονταν ότι η μετατροπή τους σε εστέρες αποτελούσε έναν αμυντικό μηχανισμό. Ωστόσο, μελέτες έδειξαν ότι η μετατροπή αυτή είναι αποτέλεσμα της παρεμπόδισης της βιοσύνθεσης των λιπιδίων, λόγω έλλειψης οξυγόνου.

- Οι **ακετάλες** σχηματίζονται από την αντίδραση της ακεταλδεΐδης με την αιθανόλη (Παπανικολάου Β. , 2006)

B. ΜΕΘΟΔΟΙ ΚΑΙ ΥΛΙΚΑ

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. ΠΡΩΤΗ ΥΛΗ- ΧΗΜΙΚΑ ΑΝΤΙΔΡΑΣΤΗΡΙΑ

Η διάθεση των ξηρών διατροφικών απορριμμάτων (FW) για τις ανάγκες της πειραματικής διαδικασίας έγινε από το Εργαστήριο Οργανικής Χημικής Τεχνολογίας της Σχολής Χημικών Μηχανικών, ΕΜΠ.

Τα χημικά αντιδραστήρια που χρησιμοποιήθηκαν ήταν αναλυτικού βαθμού καθαρότητας, προϊόντα της εταιρείας Sigma (Η.Π.Α.).

Χρησιμοποιήθηκε το εμπορικό σκεύασμα Cellic® CTec2 της εταιρείας Novozymes (Δανία) το οποίο αποτελεί μίγμα κυτταρινασών και ξυλανάσης.

3. ΠΡΟΚΑΤΕΡΓΑΣΙΑ

Η δοθείσα πρώτη ύλη προκατεργάστηκε υδροθερμικά παρουσία αραιού διαλύματος θεικού οξέος. Σε κωνικές φιάλες, τύπου Erlenmeyer, όγκου 250ml, τοποθετούνταν 30 g ξηρών διατροφικών απορριμμάτων τα οποία προκατεργάζονταν παρουσία θεικού οξέος (1, 2 και 3 g H₂SO₄/100 g ξηρού FW) στους 90 °C και 100 °C για 180 min. Η προκατεργασία πραγματοποιήθηκε σε συγκέντρωση στερεού 30% (β/ο).

4. ΜΙΚΡΟΟΡΓΑΝΙΣΜΟΙ

Χρησιμοποιήθηκε ο μύκητας *Fusarium oxysporum* F3, ο οποίος έχει απομονωθεί από κύμνο (Christakopoulos *et al.* 1989), και ξηρή μαγιά αρτοποιίας (Giotis).

5. Αερόβια ανάπτυξη του μύκητα *F. oxysporum* F3

5.1 Προκαλλιέργεια

Η σύσταση του θρεπτικού μέσου προκαλλιέργειας ήταν (g/l): KH₂PO₄ 1.0, (NH₄)₂PO₄ 10.0, NaH₂PO₄·2H₂O 15.6 και Na₂HPO₄·2H₂O 1.52, MgSO₄·7H₂O 0.3, CaCl₂·2H₂O 0.3, γλυκόζη 20.0 g/L (Christakopoulos *et al.*, 1999). Το pH ρυθμίστηκε στο 6.0. Η προκαλλιέργεια πραγματοποιήθηκε σε φιάλες Erlenmeyer όγκου 250 mL οι οποίες περιείχαν 100 mL από το θρεπτικό μέσο. Πραγματοποιήθηκε αποστείρωση του μέσου στους 121°C για 20 min. Ως εμβόλιο χρησιμοποιήθηκε μικροοργανισμός αποθηκευμένος σε γλυκερόλη 10% w/w (1 mL

ανά 100 mL προκαλλιέργειας) και η επώαση πραγματοποιήθηκε σε θερμοστατούμενο αναδευτήρα (180 rpm) για 48 ώρες στους 30°C.

5.2 Παραγωγή υδρολυτικών ενζύμων από το μύκητα *F. oxysporum* F3 με ζύμωση στερεάς κατάστασης.

Η σύσταση του θρεπτικού μέσου (εκτός της πηγής άνθρακα) που χρησιμοποιήθηκε για την ανάπτυξή του σε στερεή καλλιέργεια, παρουσιάζεται στον Πίνακα 6. Το pH του μέσου ρυθμίστηκε στο 6.0. Ως πηγή άνθρακα χρησιμοποιήθηκε πίτουρο σίτου (wheat bran, WB), άχυρο σίτου (wheat straw), άξονας σπάδικα αραβόσιτου (corn cobs) και διατροφικά απορρίμματα (FW). Οι ποσότητες θρεπτικού μέσου και στερεού ήταν 7.8 ml και 3g, αντίστοιχα, επιτυγχάνοντας υγρασία 75%. Η ανάπτυξη έγινε σε κωνικές φιάλες των 100ml. Η αποστείρωση του μέσου πραγματοποιήθηκε στους 121°C για 30min. Το εμβόλιο του μικροοργανισμού ήταν 1ml προκαλλιέργειας (§5.1) και η επώαση πραγματοποιήθηκε στους 30°C για 7 ημέρες. Δείγματα λαμβάνονταν σε τακτά χρονικά διαστήματα για τον προσδιορισμό της ενεργότητας των κυτταρινολυτικών και ημικυτταρινολυτικών ενζύμων. Όλα τα πειράματα πραγματοποιήθηκαν εις διπλούν.

Πίνακας 6: Σύσταση θρεπτικού μέσου

| Συστατικό | Συγκέντρωση (g/l) |
|---|-------------------|
| (NH ₄) ₂ PO ₄ | 10.0 |
| Na ₂ HPO ₄ ·2H ₂ O | 1.52 |
| NaH ₂ PO ₄ ·2H ₂ O | 15.6 |
| KH ₂ PO ₄ | 1.0 |
| MgSO ₄ ·7H ₂ O | 0.3 |
| CaCl ₂ ·2H ₂ O | 0.3 |

6. Αλκοολική ζύμωση με μικτή μικροβιακή καλλιέργεια

Μετά την προκατεργασία των διατροφικών απορριμμάτων (§ 3) ακολουθεί ρύθμιση του pH στην τιμή 5.5 με προσθήκη διαλύματος NaOH 10N. Στη συνέχεια, γίνεται προσθήκη της αερόβιας καλλιέργειας του μύκητα *F. oxysporum* F3, ο οποίος έχει αναπτυχθεί για 6 μέρες σε στερεά κατάσταση. Ταυτόχρονα προστίθεται και η ζύμη αρτοποιίας (15mg/g στερεού). Οι κωνικές φιάλες τοποθετούνται σε θερμοστατούμενο επωαστήρα στους 30°C υπό ήπια ανάδευση (100 rpm) για 6 ημέρες. Δείγματα λαμβάνονταν σε τακτά χρονικά διαστήματα, φυγοκεντρώνταν και αναλύονταν ως προς τα ολικά αναγωγικά σάκχαρα, τη γλυκόζη και την παραγόμενη αιθανόλη. Όλα τα πειράματα πραγματοποιήθηκαν εις διπλούν.

Μετά την επιλογή των βέλτιστων συνθηκών προκατεργασίας, μελετήθηκε η επίδραση του εξωγενώς προστιθέμενου ενζύμου. Στις καλλιέργειες προστέθηκε και Cellic® Ctec2 έτσι ώστε το εξωγενώς προστιθέμενο ένζυμο να αντιστοιχεί σε 4, 6, 8 και 10 FPU/g κυτταρίνης. Οι υπόλοιπες συνθήκες διατηρήθηκαν σταθερές όπως αναφέρεται παραπάνω. Δείγματα λαμβάνονταν σε τακτά χρονικά διαστήματα, φυγοκεντρώνταν και αναλύονταν ως προς τα

ολικά αναγωγικά σάκχαρα, τη γλυκόζη και την παραγόμενη αιθανόλη. Όλα τα πειράματα πραγματοποιήθηκαν εις διπλούν.

7. ΕΚΧΥΛΙΣΗ ENZYMΩΝ

Για την εκχύλιση των ενζύμων από το στερεό υπόστρωμα, προστέθηκε 10πλάσιος από το βάρος του στερεού όγκος ($3g \times 10 = 30ml$) ρυθμιστικού διαλύματος κυτρικών/φωσφορικών 50 mM, pH 6.0 και οι φιάλες τοποθετήθηκαν σε περιστροφικό αναδευτήρα για 1 ώρα, σε θερμοκρασία 30°C. Ακολούθησε φυγοκέντρηση (10min, 12000rpm) και το υπερκείμενο χρησιμοποιήθηκε για τον προσδιορισμό της ενεργότητας των ενζύμων.

8. ENZYMΙΚΗ ΥΔΡΟΛΥΣΗ

Σε προκατεργασμένα διατροφικά απορρίμματα (100°C, 2% β/β θειικό οξύ, 3 ώρες) γίνεται προσθήκη της αερόβιας καλλιέργειας του μύκητα *F. oxysporum* F3, και ποσότητα ενζύμου Cellic® Ctec2 έτσι ώστε το εξωγενώς προστιθέμενο ένζυμο να αντιστοιχεί σε 0, 4, 6, 8 και 10 FPU/g κυτταρίνης. Επιπλέον προστέθηκε αζίδιο του νατρίου ώστε η συγκέντρωσή του στο μίγμα της αντίδρασης να είναι 0.01% β/ο. Ακολουθεί επώαση των φιαλών σε θερμοστατούμενο επωαστήρα στους 50°C και 180 rpm. Δείγματα λαμβάνονταν σε τακτά χρονικά διαστήματα (0, 12, 24, 38, και 48h) ύστερα από φυγοκέντρηση, μετρήθηκαν τα ολικά αναγωγικά σάκχαρα και η γλυκόζη. Όλα τα πειράματα πραγματοποιήθηκαν εις διπλούν.

9. ΑΝΑΛΥΣΗ ΣΥΣΤΑΣΗΣ ΤΗΣ ΠΡΩΤΗΣ ΥΛΗΣ

9.1 Προσδιορισμός υγρασίας (NREL/TP-510-42618)

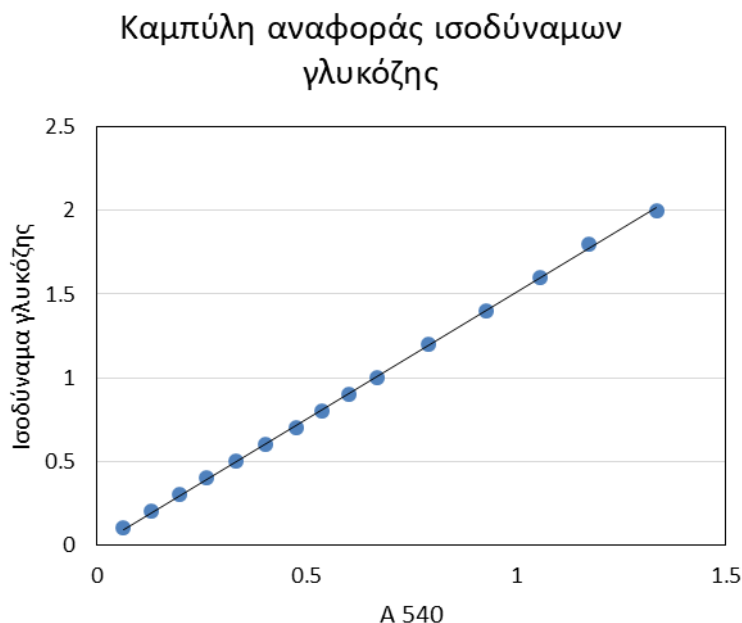
Για τον προσδιορισμό της υγρασίας των διατροφικών απορριμμάτων, ζυγίστηκε ποσότητα δείγματος, σε ξηρά, προζυγισμένα φύλλα αλουμινίου και καταγράφηκε το βάρος τους. Στη συνέχεια, τα φύλλα αλουμινίου, μαζί με το δείγμα τοποθετήθηκαν στο φούρνο ξήρανσης για 24 ώρες σε θερμοκρασία 105 °C. Μετά το πέρας των 24 ωρών, μεταφέρθηκαν σε ξηραντήρα (με silica gel) για τουλάχιστον 30 λεπτά προκειμένου να αποκτήσουν θερμοκρασία περιβάλλοντος, χωρίς να επαναπροσλάβουν υγρασία. Τέλος, καταγράφηκε το βάρος των φύλλων αλουμινίου μαζί με το ξηρό, πλέον, δείγμα. Να σημειωθεί ότι ο χειρισμός των φύλλων αλουμινίου έγινε με χρήση λαβίδας. Όλες οι ζυγίσεις πραγματοποιήθηκαν σε αναλυτικό ζυγό με ακρίβεια 0.1 mg.

9.2 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% (β/ο). Η φιάλη πωματίστηκε και τοποθετήθηκε για 1 ώρα σε θερμοστατούμενο αναδευτήρα σε θερμοκρασία 50 °C. Ακολούθησε διήθηση υπό κενό με χρήση ξηρού, προζυγισμένου διηθητικού χαρτιού 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. Το διηθητικό χαρτί, μαζί με το στερεό υπόλειμμα, υπέστη ξήρανση σε φούρνο και στη συνέχεια αναλύθηκε βάσει της διαδικασίας που περιγράφεται παρακάτω. Τα διηθήματα και τα εκπλύματα συλλέχτηκαν και προσδιορίστηκε η συγκέντρωση των μη δομικών σακχάρων σε αυτά .

9.3 Προσδιορισμός αναγωγικών σακχάρων

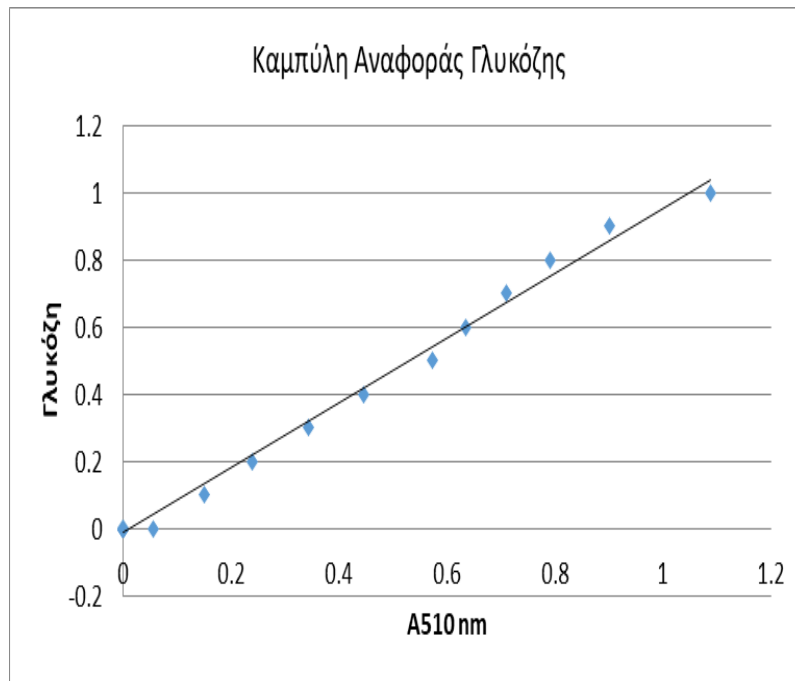
Ο προσδιορισμός των αναγωγικών σακχάρων πραγματοποιείται με τη φωτομετρική μέθοδο του 3,5-δινιτροσαλικυλικού οξέος (ή 2-υδρόξυ-3,5-δινιτροβενζοϊκό οξύ) (Miller, 1959). Στο **Διάγραμμα 1**, παρουσιάζεται η καμπύλη αναφοράς των αναγωγικών σακχάρων σε ισοδύναμα γλυκόζης. Η εξίσωση της καμπύλης είναι ίση με $y=1,5115 \cdot \text{ABS}_{540} - 0,0021$ ($R^2 = 0,9996$).



Διάγραμμα 1: Καμπύλη συγκέντρωσης ισοδύναμων γλυκόζης-απορρόφησης στα 540nm

9.4 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 2**, φαίνεται η καμπύλη αναφοράς της γλυκόζης η οποία ισούται με $y=1,0159 \cdot \text{ABS}_{510} - 0,0473$ ($R^2=0,9925$).



Διάγραμμα 2: Καμπύλη αναφοράς γλυκόζης

10. ΜΕΤΡΗΣΗ ΕΝΕΡΓΟΤΗΤΑΣ ΕΝΖΥΜΩΝ

Ως μονάδα ενζυμικής ενεργότητας (U) ορίστηκε η ποσότητα του ενζύμου που απαιτείται για την απελευθέρωση 1 μmol προϊόντος / min, στους 50 °C, σε pH 6.0. Η ενζυμική απόδοση εκφράστηκε σε U / g υποστρώματος.

Η ενεργότητα της ξυλανάσης μετρήθηκαν με επώαση του ενζύμου σε 1% (β/ο) ξυλάνη από ξύλο σημύδας (Sigma) (για την παρασκευή του υποστρώματος, η ξυλάνη διαλύθηκε σε ρυθμιστικό διάλυμα για 10min στους 80 °C, ακολούθησε βρασμός για 1-2 min και τέλος ολονύκτια ανάδευση χωρίς θέρμανση), όπως περιγράφεται σε άλλες εργασίες (Christakopoulos *et al.* 1995, Kalogeris *et al.* 1998). Τα απελευθερωθέντα σάκχαρα μετρήθηκαν με τη μέθοδο του δινιτροσαλικυλικού οξέος (DNS) (Miller 1959).

Η ενεργότητα της α -αμυλάσης μετρήθηκε με επώαση του ενζύμου σε 1% (β/ο) διαλυτού αμύλου (για την παρασκευή του υποστρώματος, το άμυλο διαλύθηκε σε ρυθμιστικό διάλυμα για 15 min στους 100°C και, τέλος, πραγματοποιήθηκε ψύξη του, σε θερμοκρασία περιβάλλοντος). Τα απελευθερωθέντα σάκχαρα μετρήθηκαν, επίσης, με τη μέθοδο του δινιτροσαλικυλικού οξέος (DNS) (Miller 1959).

Η ενεργότητα της β -ξυλοζιδάσης προσδιορίστηκε με επώαση του ενζύμου σε 1mM ο-νιτροφαινυλ- β -D-ξυλοπυρανοζιδίου (Sigma). Η αντίδραση τελείωσε με προσθήκη ανθρακικού νατρίου 10% (β/ο) και η νιτροφαινόλη που απελευθερώθηκε υπολογίστηκε από την απορρόφηση στα 410 nm (Puls & Putanen, 1989, Christakopoulos *et al.* 1994).

Η ενεργότητα της γλυκοαμυλάσης προσδιορίστηκε με επώαση του ενζύμου σε 1mM p-νιτροφαινυλ- α -D- γλυκοπυρανοσίδιο (Sigma). Η αντίδραση τελείωσε με προσθήκη ανθρακικού νατρίου 10% (β/ο) και η π-νιτροφαινόλη που απελευθερώθηκε προσδιορίστηκε από την απορρόφηση στα 410 nm (AOAC Official Method 994.09).

11. ΜΕΤΡΗΣΗ ΑΙΘΑΝΟΛΗΣ

Η αιθανόλη προσδιορίστηκε με τη χρήση αέριου χρωματογράφου. Στον τελευταίο, η στήλη διαχωρισμού ήταν DB-WAX (15m x 0.54 mm) (J & D Scientific) και ο ανιχνευτής ιονισμού φλόγας. Χρησιμοποιήθηκε ήλιο ως φέρον αέριο (ροή 7 ml/min) και εφαρμόστηκε βαθμίδωση θερμοκρασίας 50-250°C. Η θερμοκρασία του εισαγωγέα δείγματος ήταν 250°C.

12. ΚΟΚΚΟΜΕΤΡΙΚΗ ΔΙΑΒΑΘΜΙΣΗ ΜΕ ΚΟΣΚΙΝΑ

Η μέθοδος αφορά στον προσδιορισμό της κατανομής του μεγέθους των κόκκων σε λεπτόκοκκα ή χονδρόκοκκα υλικά με τη χρήση κοσκίνων κυκλικών οπών. Ξηρό δείγμα διατροφικού απορρίμματος κοσκινίζεται μέσα από μια σειρά κοσκίνων και καταγράφεται το βάρος του υλικού που συγκρατείται από το κάθε κόσκινο.

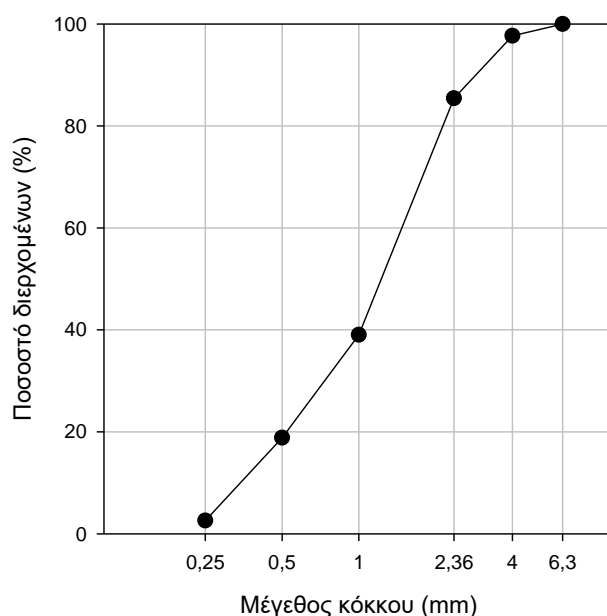
Η διαδικασία που ακολουθήθηκε περιγράφεται ως εξής:

1. Το δείγμα θερμαίνεται στους 105 °C για 24 ώρες και ζυγίζεται σε ζυγό ακριβείας.
2. Ζυγίζονται τα κόσκινα.
3. Τοποθετούνται τα κόσκινα με το μέγεθος βρογχίδας να αυξάνει από κάτω προς τα πάνω. Το τελευταίο κόσκινο συγκρατεί το πιο λεπτομερές κλάσμα του υλικού.
4. Τοποθετείται το δείγμα στο κόσκινο με τη μεγαλύτερο διάμετρο.
5. Το δείγμα κοσκινίζεται.
6. Αφαιρούνται τα κόσκινα και ζυγίζονται μαζί με την ποσότητα του ξηρού υλικού που έχουν συγκρατήσει.
7. Υπολογίζεται το ποσοστό του συγκρατούμενου υλικού σε κάθε κόσκινο διαιρώντας το βάρος του συγκρατούμενου με το συνολικό βάρος του δείγματος, καθώς και το ποσοστό του διερχόμενου υλικού αφαιρώντας σταδιακά το ποσοστό του συγκρατούμενου σε κάθε κόσκινο.

Σ. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

1. Κοκκομετρική ανάλυση ξηρών Διατροφικών Απορριμμάτων (FW)

Τα αποτελέσματα της κοκκομετρικής ανάλυσης με χρήση κόσκινων τοποθετήθηκαν σε ημιλογαριθμικό διάγραμμα και σχεδιάστηκε η κοκκομετρική καμπύλη (**Διάγραμμα 3**). Σύμφωνα με την κοκκομετρική καμπύλη τα ξηρά διατροφικά απορρίμματα παρουσιάζουν μεγάλο εύρος κατανομής μεγέθους, δηλαδή μεγάλη ανομοιογένεια υλικού. Συγκεκριμένα, ποσοστό 97.64% του διατροφικού απορρίμματος διήλθε από κόσκινο, διαμέτρου οπής 4 mm και 85.4% από το κόσκινο διαμετρήματος οπής 2.36 mm, ενώ μικρότερο ποσοστό, δηλαδή 40%, πέρασε από το κόσκινο διαμέτρου 1 mm, ακόμα μικρότερο ποσοστό 20% διήλθε από το αμέσως μικρότερο κόσκινο διαμέτρου οπής 0.5 mm ενώ μόλις το 3% του δείγματος διήλθε από το κόσκινο διαμέτρου οπής 0.250 mm.



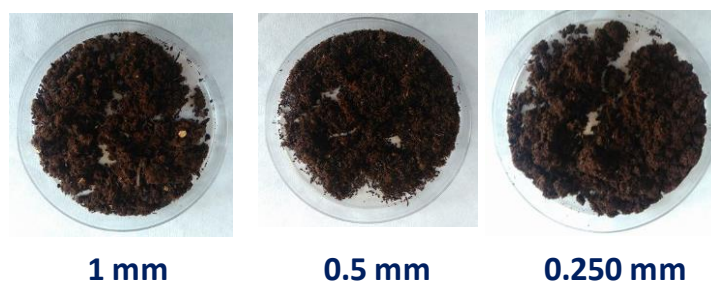
Διάγραμμα 3: Μέγεθος κόκκου συναρτήσεως του ποσοστού διερχομένων σωματιδίων

Στην **Εικόνα 21** παρουσιάζονται τα κλάσματα του δείγματος ξηρού διατροφικού απορρίμματος που συγκρατήθηκαν στα κόσκινα με τα διαφορετικά διαμετρήματα οπών.



4 mm

2.36 mm



Εικόνα 21: Κόκκοι διατροφικών απορριμμάτων μετά από κοσκίνισμα

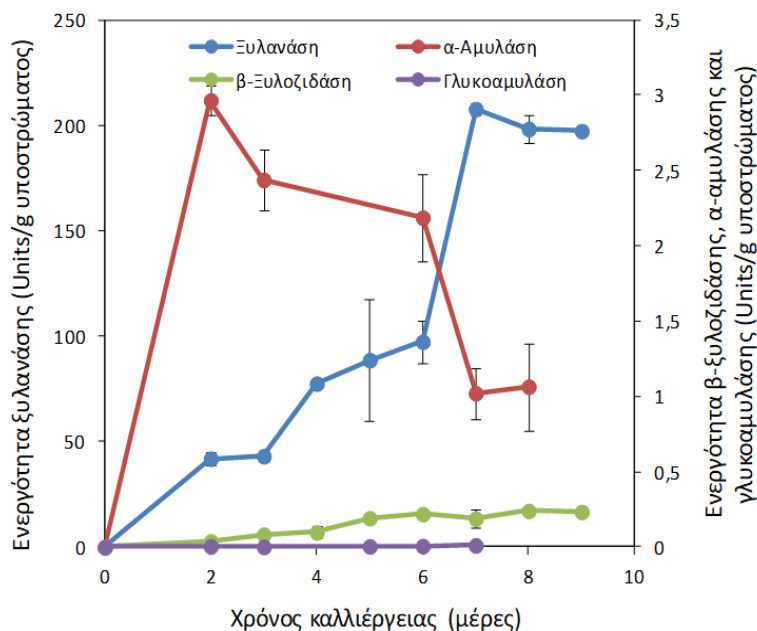
Η σωστή διεξαγωγή των πειραμάτων απαιτούσε την εξάλειψη της ανομοιογένειας του υλικού. Τα διατροφικά απορρίμματα αλέστηκαν σε μύλο με κόσκινο διαμέτρου 0.75 mm. Η σύσταση της πρώτης ύλης που χρησιμοποιήθηκε στους πειραματισμούς της παρούσας εργασίας παρουσιάζεται στον **Πίνακα 7**.

Πίνακας 7: Σύσταση ξηρών διατροφικών απορριμμάτων

| Συστατικό | (%, β/β, ξηρή βάση) |
|-----------------------------------|----------------------|
| Πρωτεΐνη | 13.70 ± 0.44 |
| Λιπαρά | 12.26 ± 0.11 |
| Υδατοδιαλυτά (Extractives) | 27.29 ± 1.71 |
| Γλυκόζη | 0.00 |
| Σακχαρόζη | 0.51 ± 0.04 |
| Συνολικά αναγωγικά σάκχαρα | 4.96 ± 1.01 |
| Πρωτεΐνη | 0.33 ± 0.02 |
| Υδατοδιαλυτό άμυλο | 1.15 ± 0.09 |
| Άμυλο | 10.68 ± 0.07 |
| Πηκτίνη | 3.27 ± 0.82 |
| Κυτταρίνη | 10.31 ± 0.07 |
| Ημικυτταρίνη | 11.32 ± 0.017 |
| Ολική λιγνίνη | 6.75 ± 0.15 |
| Τέφρα | 7.16 ± 0.27 |

2. ΠΑΡΑΓΩΓΗ ΗΜΙΚΥΤΤΑΡΙΝΟΛΥΤΙΚΩΝ ΚΑΙ ΑΜΥΛΟΛΥΤΙΚΩΝ ΕΝΖΥΜΩΝ ΑΠΟ ΤΟ ΜΥΚΗΤΑ *F. oxysporum* F3 ΜΕ ΖΥΜΩΣΗ ΣΤΕΡΕΑΣ ΚΑΤΑΣΤΑΣΗΣ

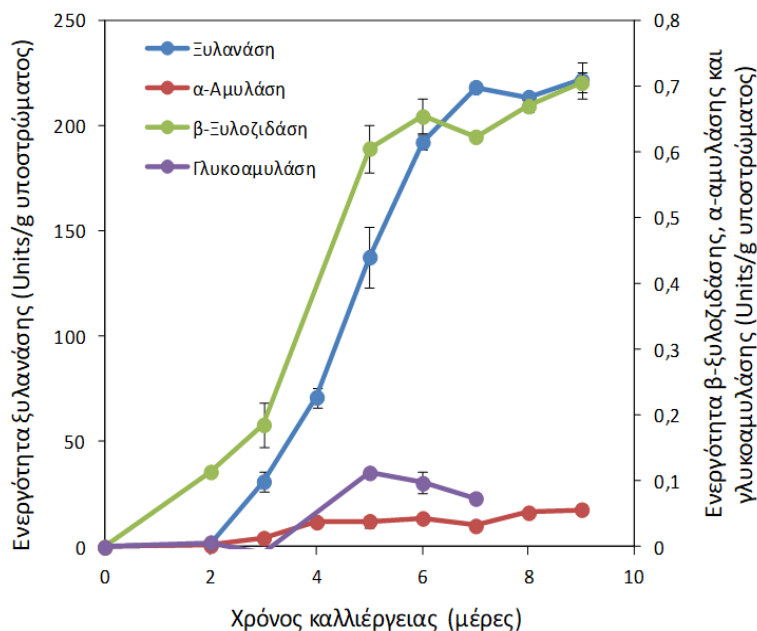
Στο πρώτο μέρος των πειραμάτων, μελετήθηκε η παραγωγή ημικυτταρινολυτικών (ξυλανάση, β-ξυλοζιδάση) και αμυλολυτικών (α-αμυλάση, γλυκοαμυλάση) ενζύμων από το *Fusarium oxysporum* F3. Στόχος της διεργασίας είναι η *in situ* παραγωγή ενζύμων, από χαμηλής αξίας πρώτες ύλες. Συνεπώς, εξετάστηκε η παραγωγή των ενζύμων στα υποστρώματα: α) άχυρο σίτου (wheat straw), β) άξονας σπάδικα αραβόσιτου (corn cobs), γ) πίτουρο σίτου (wheat bran) και δ) διατροφικά απορρίμματα (food waste). Ακολουθούν τα αποτελέσματα της παραγωγής των κυτταρινολυτικών και ημικυτταρινολυτικών ενζύμων, υπό μορφή πινάκων και διαγραμμάτων, καθώς και ο σχολιασμός και τα συμπεράσματα αυτών.



Διάγραμμα 4: Χρονική μεταβολή παραγόμενων ημικυτταρινολυτικών (ξυλανάση, β-ξυλοζιδάση) και αμυλολυτικών (γλυκοαμυλάση, α-αμυλάση) ενζύμων, από το μύκητα *F. oxysporum* F3, χρησιμοποιώντας ως πηγή άνθρακα άχυρο σίτου..

Πίνακας 9: Αναλυτική παρουσίαση των ενεργοτήτων των ημικυτταρινολυτικών (ξυλανάση, β-ξυλοζιδάση) και αμυλολυτικών (γλυκοαμυλάση, α-αμυλάση) ενζύμων, ανά ημέρα καλλιέργειας του μύκητα *F. oxysporum* F3, με πηγή άνθρακα άχυρο σίτου.

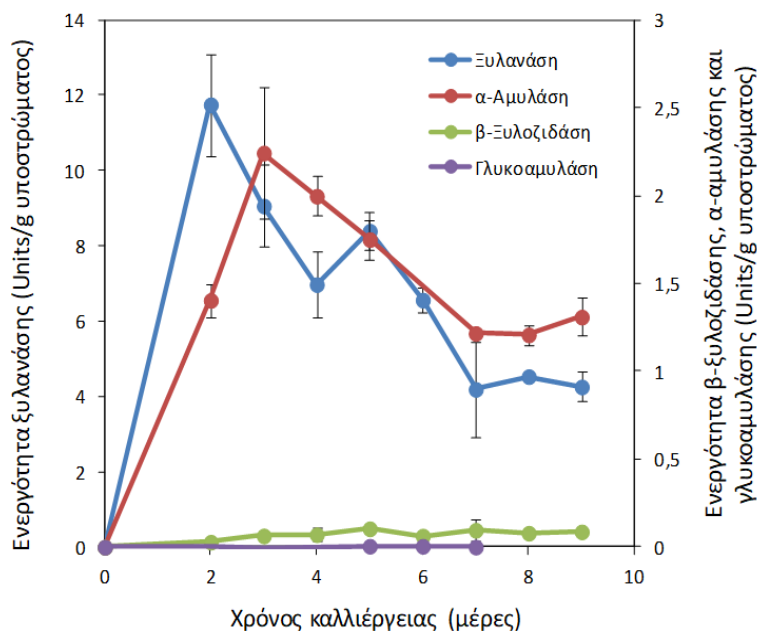
| Χρόνος καλλιέργειας (d) | Ενεργότητες (Units/g υποστρώματος) | | | |
|-------------------------|------------------------------------|--------------|--------------|-------------|
| | Ξυλανάση | β-ξυλοζιδάση | Γλυκοαμυλάση | α-αμυλάση |
| 2 | 77.58 ± 1.04 | 0.04 ± 0.01 | 0.01 ± 0.00 | 2.97 ± 0.66 |
| 3 | 97.45 ± 10.23 | 0.08 ± 0.00 | 0.00 ± 0.00 | 2.44 ± 0.51 |
| 4 | 137.59 ± 99.27 | 0.10 ± 0.04 | 0.00 ± 0.00 | - |
| 5 | 43.12 ± 2.72 | 0.19 ± 0.00 | 0.01 ± 0.00 | - |
| 6 | 41.97 ± 2.90 | 0.22 ± 0.02 | 0.01 ± 0.00 | 2.19 ± 0.29 |
| 7 | 88.70 ± 28.90 | 0.19 ± 0.06 | 0.01 ± 0.01 | 1.02 ± 0.17 |
| 8 | 133.41 ± 6.68 | 0.24 ± 0.01 | 0.00 ± 0.00 | 1.07 ± 0.29 |
| 9 | 197.35 ± 1.40 | 0.23 ± 0.02 | 0.00 ± 0.01 | 2.22 ± 0.32 |



Διάγραμμα 5: Χρονική μεταβολή παραγόμενων ημικυτταρινολυτικών (ξυλανάση, β-ξυλοζιδάση) και αμυλολυτικών (γλυκοαμυλάση, α-αμυλάση) ενζύμων, από το μύκητα *F. oxysporum* F3, χρησιμοποιώντας ως πηγή άνθρακα πίτουρο σίτου.

Πίνακας 10: Ενεργότητες ημικυτταρινολυτικών (ξυλανάση, β-ξυλοζιδάση) και αμυλολυτικών (γλυκοαμυλάση, α-αμυλάση) ενζύμων, του μύκητα *F. oxysporum* F3, χρησιμοποιώντας ως πηγή άνθρακα πίτουρο σίτου.

| Χρόνος καλλιέργειας (d) | Ενεργότητες (Units/g υποστρώματος) | | | |
|-------------------------|------------------------------------|--------------|--------------|--------------|
| | Ξυλανάση | β-ξυλοζιδάση | Γλυκοαμυλάση | α-αμυλάση |
| 2 | 1.44 ± 0.21 | 0.11 ± 0.00 | 0.01 ± 0.00 | 0.72 ± 0.78 |
| 3 | 31.07 ± 4.40 | 0.19 ± 0.03 | 0.01 ± 0.00 | 4.31 ± 0.98 |
| 4 | 71.09 ± 4.76 | 0.06 ± 0.03 | 0.09 ± 0.01 | 11.88 ± 0.74 |
| 5 | 137.59 ± 14.14 | 0.60 ± 0.04 | 0.11 ± 0.00 | 12.30 ± 2.78 |
| 6 | 192.08 ± 3.57 | 0.65 ± 0.03 | 0.10 ± 0.02 | 13.66 ± 1.37 |
| 7 | 218.17 ± 2.07 | 0.62 ± 0.00 | 0.07 ± 0.01 | 10.07 ± 1.70 |
| 8 | 213.48 ± 2.07 | 0.67 ± 0.01 | - | 16.32 ± 1.33 |
| 9 | 221.53 ± 8.49 | 0.70 ± 0.02 | - | 17.81 ± 2.13 |



Διάγραμμα 6: Χρονική μεταβολή παραγόμενων ημικυτταρινολυτικών (ξυλανάση, β-ξυλοζιδάση) και αμυλολυτικών (γλυκοαμυλάση, α-αμυλάση) ενζύμων, από το μύκητα *F. oxysporum* F3, χρησιμοποιώντας ως πηγή άνθρακα άξονα σπάδικα αραβοσίτου

Πίνακας 11: Ενεργότητες ημικυτταρινολυτικών (ξυλανάση, β-ξυλοζιδάση) και αμυλολυτικών (γλυκοαμυλάση, α-αμυλάση) ενζύμων, του μύκητα *F. oxysporum* F3, χρησιμοποιώντας ως πηγή άνθρακα άξονα σπάδικα αραβοσίτου.

| Χρόνος καλλιέργειας (d) | Ενεργότητες (Units/g υποστρώματος) | | | |
|-------------------------|------------------------------------|--------------|--------------|-------------|
| | Ξυλανάση | β-ξυλοζιδάση | Γλυκοαμυλάση | α-αμυλάση |
| 2 | 11.75 ± 1.35 | 0.03 ± 0.01 | 0.00 ± 0.00 | 2.24 ± 0.09 |
| 3 | 6.97 ± 1.09 | 0.06 ± 0.01 | 0.00 ± 0.00 | 1.40 ± 0.38 |
| 4 | 4.19 ± 0.88 | 0.07 ± 0.01 | 0.00 ± 0.00 | 2.00 ± 0.11 |
| 5 | 9.06 ± 0.52 | 0.10 ± 0.00 | 0.01 ± 0.01 | 1.22 ± 0.11 |
| 6 | 6.56 ± 0.34 | 0.06 ± 0.01 | 0.01 ± 0.01 | 0.91 ± 0.01 |
| 7 | 8.39 ± 1.27 | 0.10 ± 0.01 | 0.00 ± 0.01 | 1.75 ± 0.02 |
| 8 | 4.53 ± 0.10 | 0.08 ± 0.01 | 0.01 ± 0.01 | 1.21 ± 0.06 |
| 9 | 4.26 ± 0.39 | 0.09 ± 0.02 | 0.00 ± 0.00 | 1.31 ± 0.11 |

Όταν τα διατροφικά απορρίμματα χρησιμοποιήθηκαν ως υποστρώματα στην παραγωγή ενζύμων, οι ενεργότητες αυτών είναι μηδενικές, κυρίως λόγω της περιεκτικότητάς τους σε άμεσα μεταβολίσιμα σάκχαρα.

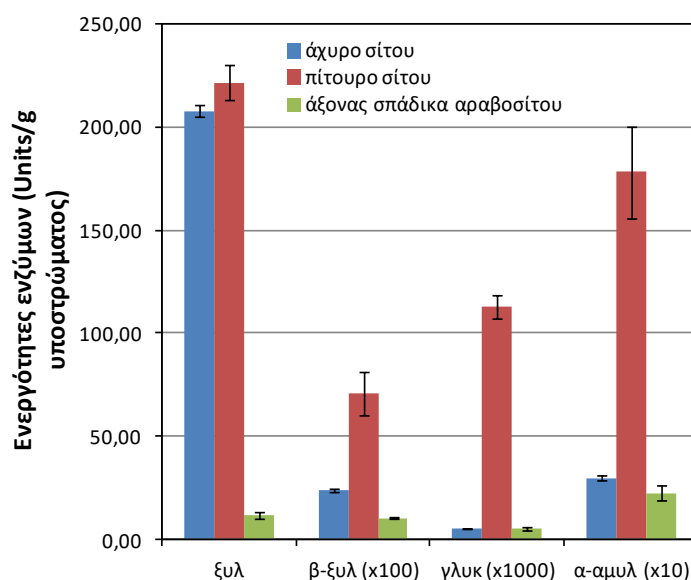
Κατά την καλλιέργεια του μύκητα *F. oxysporum* F3 σε υπόστρωμα άχυρο σίτου, η μέγιστη τιμή ενεργότητας της ξυλανάσης παρουσιάζεται την 7^η ημέρα όπου και έχει την τιμή 207.79 U/g υποστρώματος. Όσον αφορά τη β-ξυλοζιδάση, οι τιμές της ενεργότητας παραμένουν χαμηλές με το πέρασμα του χρόνου, φτάνοντας τη μέγιστη τιμή των 0.24 U/g υποστρώματος την 8^η ημέρα καλλιέργειας, εμφανίζοντας μια ελαφρά πτώση την 9^η ημέρα. Η γλυκοαμυλάση εμφανίζει μηδενικές τιμές ενεργότητας, καθ' όλη τη διάρκεια της καλλιέργειας. Σε αντίθεση με τα ημικυτταρινολυτικά ένζυμα, η α-αμυλάση εμφανίζει μέγιστη ενεργότητα την 2^η ημέρα καλλιέργειας (2.97 U/g υποστρώματος), ενώ τις επόμενες μέρες παρουσιάζεται πτώση στις τιμές ενεργοτήτων (**Διάγραμμα 4**).

Όταν χρησιμοποιείται ως πηγή άνθρακα το πίτουρο σίτου, παρατηρήθηκαν υψηλότερες τιμές ενεργότητας για όλα τα ένζυμα. Πιο συγκεκριμένα, η ξυλανάση παρουσιάζει

αυξανόμενες τιμές ενεργότητας κατά τη διάρκεια της καλλιέργειας, με μεγαλύτερο, αρχικά και, στη συνέχεια, μικρότερο ρυθμό, παρουσιάζοντας μέγιστη τιμή, ίση με 221.53 U/g υποστρώματος, την 9^η ημέρα. Την ίδια ημέρα εμφανίζει μέγιστη τιμή και η β-ξυλοζιδάση, ίση με 0.70 U/g υποστρώματος, παρουσιάζοντας παρόμοια διακύμανση, με την ξυλανάση. Τελείως διαφορετική συμπεριφορά, σε σχέση με το υπόστρωμα άχυρο σίτου, εμφανίζει η α-αμυλάση, η οποία εμφανίζει αυξανόμενες τιμές ενεργότητας μέχρι και την τελευταία ημέρα καλλιέργειας, οπότε και παρουσιάζει την μέγιστη τιμή 17.81 U/g υποστρώματος. Η ενεργότητα της γλυκοαμυλάσης κυμάνθηκε σε χαμηλά επίπεδα (μέγιστη τιμή 0.11 U/g υποστρώματος, την 5^η ημέρα καλλιέργειας) (**Διάγραμμα 5**).

Τέλος, με χρήση άξονα σπάρικα αραβόσιτου ως υπόστρωμα, εμφανίζονται οι χαμηλότερες τιμές ενεργότητας για όλα τα εξεταζόμενα ένζυμα. Ειδικότερα, όσον αφορά την ξυλανάση, η μέγιστη τιμή εμφανίζεται την 2^η ημέρα (11.75 U/g υποστρώματος), όμως, στη συνέχεια, παρατηρείται μια αυξομείωση στις τιμές, με σταθεροποίηση στο 30%, περίπου, της μέγιστης τιμής. Η β-ξυλοζιδάση παρουσιάζει μια σταθεροποίηση, κοντά στη μέγιστη τιμή της (0.10 U/g υποστρώματος), κατά τις τελευταίες ημέρες της καλλιέργειας. Η γλυκοαμυλάση εμφανίζει μηδενικές τιμές ενεργότητας, καθ' όλη τη διάρκεια της καλλιέργειας. Ίδια συμπεριφορά, όπως και στην περίπτωση του αχύρου σίτου, εμφανίζει και η α-αμυλάση. Η μέγιστη τιμή ενεργότητάς της εμφανίζεται την 2^η ημέρα (2.24 U/g υποστρώματος), ενώ, στη συνέχεια, παρατηρήθηκε μείωση των τιμών ενεργότητας (**Διάγραμμα 6**).

Στο **Διάγραμμα 7** και στον Πίνακα 12 παρουσιάζονται οι μέγιστες τιμές των ενεργοτήτων των ημικυτταρινολυτικών και αμυλολυτικών ενζύμων που επιτεύχθηκαν στα διαφορετικά υποστρώματα.



Διάγραμμα 7: Συγκριτική απεικόνιση των ενεργοτήτων των ενζύμων ξυλανάση (ξυλ), β-ξυλοζιδάση (β-ξυλ), γλυκοαμυλάση (γλυκ) και α-αμυλάση (α-αμυλ) στα διαφορετικά υποστρώματα (άχυρο σίτου, πίτουρο σίτου, άξονας σπάρικα αραβοσίτου).

Πίνακας 12: Οι μέγιστες ενεργότητες ενζύμων που επιτυγχάνονται ανά υπόστρωμα

| Ένζυμο | Ενεργότητα (Units/g πηγής άνθρακα) | | |
|--------------|------------------------------------|---------------|---------------------------|
| | Άχυρο σίτου | Πίτουρο σίτου | Άξονας σπάδικα αραβοσίτου |
| ξυλανάση | 207.79 ± 2.89 | 221.53 ± 8.59 | 11.75 ± 1.35 |
| β-ξυλοζιδάση | 0.24 ± 0.01 | 0.70 ± 0.02 | 0.10 ± 0.00 |
| γλυκοαμυλάση | 0.01 ± 0.00 | 0.11 ± 0.00 | 0.01 ± 0.00 |
| α-αμυλάση | 2.97 ± 0.10 | 17.81 ± 2.13 | 2.24 ± 0.38 |

Από την παραπάνω σύγκριση, γίνεται αντιληπτό, ότι οι υψηλότερες τιμές ενεργότητας, για όλα τα εξεταζόμενα ένζυμα, εμφανίζονται, όταν χρησιμοποιείται ως υπόστρωμα το πίτουρο σίτου. Μάλιστα, αυτό είναι αναμενόμενο αν αναλογιστεί κανείς τη σύστασή του (**Πίνακας 13**). Η παρουσία του αμύλου είναι αυτή που προκαλεί τις αυξημένες ενεργότητες στα αμυλολυτικά ένζυμα, όταν το πίτουρο σίτου χρησιμοποιείται ως πηγή άνθρακα στην καλλιέργεια με το μύκητα *F. oxysporum* F3.

Πίνακας 13: Σύσταση πίτουρου σίτου.

| Συστατικό | Εύρος περιεκτικότητας | Αναφορά |
|---------------------|-----------------------|--|
| Διαιτητικές ίνες | 33.4-63.0 | Curti et al. (2013) |
| Υγρασία | 8.1-12.7 | |
| Τέφρα | 3.9-8.10 | |
| Πρωτεΐνες | 9.60-18.6 | Curti et al. (2013), Yan et al. (2015) |
| Άμυλο | 9.10-38.9 | |
| Ολικοί υδατάνθρακες | 60.0-75.0 | Javed et al. (2012) |

Έτσι, στα επόμενα πειράματα η αερόβια ανάπτυξη του μύκητα *F. oxysporum* F3 πραγματοποιήθηκε χρησιμοποιώντας το πίτουρο σίτου ως πηγή άνθρακα.

3. Επίδραση της προκατεργασίας στην παραγωγή βιοαιθανόλης

Στο επόμενο στάδιο, πραγματοποιήθηκε μελέτη της επίδρασης διαφόρων συνθηκών προκατεργασίας στην παραγωγή βιοαιθανόλης. Ο μύκητας *F. oxysporum* F3 αναπτύχθηκε αερόβια σε ΖΣΚ χρησιμοποιώντας πίτουρο σίτου ως πηγή άνθρακα (όπως προκύπτει από την § 2). Οι ενεργότητες των κυτταρινολυτικών (τα αποτελέσματα ελήφθησαν από τη Διπλωματική Εργασία του Γεωργίου Πρασσούλα), ημικυτταρινολυτικών και αμυλολυτικών ενζύμων που παρήχθησαν παρουσιάζονται στον **Πίνακα 14**.

Πίνακας 14: Ενεργότητες κυτταρινολυτικών, ημικυτταρινολυτικών και αμυλολυτικών ενζύμων που παράγονται από τον μύκητα *F. oxysporum* F3 αναπτυχθέντος αερόβια σε ΖΣΚ χρησιμοποιώντας πίτουρο σίτου ως πηγή άνθρακα.

| Ένζυμο | Ενεργότητα (Units/g πίτουρο σίτου) |
|-------------------------------|------------------------------------|
| Ολική ενεργότητα κυτταρινασών | 1.47 |
| Ενδογλουκανάση | 62.49 |
| Εξωγλουκανάση | 2.07 |
| β-Γλυκοζιδάση | 27.34 |
| Ξυλανάση | 221.53 |
| β-Ξυλοζιδάση | 0.70 |
| α-Αμυλάση | 17.81 |
| Γλυκοαμυλάση | 0.11 |

Η προκατεργασία των διατροφικών απορριμμάτων που εφαρμόστηκε ήταν θερμού νερού παρουσία θειικού οξέος. Εξετάστηκαν οι κάτωθι συνδυασμοί περιεκτικότητας θειικού οξέος (% β/β) και θερμοκρασίας (°C), διατηρώντας το χρόνο προκατεργασίας στις 3 ώρες.

Πίνακας 15: Συγκεντρώσεις θειικού οξέος και θερμοκρασίες για την προκατεργασία του υλικού

| Θερμοκρασία προκατεργασίας (°C) | Συγκέντρωση θειικού οξέος (% β/β) |
|---------------------------------|-----------------------------------|
| 90 | 1 |
| 90 | 3 |
| 100 | 1 |
| 100 | 2 |
| 100 | 3 |

Για το στάδιο παραγωγής βιοαιθανόλης χρησιμοποιήθηκε μικτή μικροβιακή καλλιέργεια του μύκητα *F. oxysporum* F3 και της ζύμης *S. cerevisiae*. Συνοπτικά η διαδικασία περιελάμβανε τα εξής στάδια : προκατεργασία ξηρών διατροφικών απορριμμάτων (στις συνθήκες που αναφέρονται παραπάνω), ψύξη του προκατεργασμένου υλικού και ρύθμιση του pH στην τιμή 5.5, προσθήκη της στερεής καλλιέργειας του μύκητα *F. oxysporum* F3 (αναλογία προκατεργασμένων διατροφικών απορριμμάτων/ στερεής καλλιέργειας μύκητα 10/1 g/g) και της ζύμης *S. cerevisiae* .

Με βάση τη σύσταση των ξηρών διατροφικών απορριμμάτων (**Πίνακας 7**) η μέγιστη θεωρητική απόδοση αιθανόλης από τη πλήρη βιομετατροπή των σακχαρόζη, άμυλο, κυτταρίνη και ημικυτταρίνη παρουσιάζεται στον **Πίνακα 16**.

Πίνακας 16: Θεωρητική απόδοση αιθανόλης με βάση το περιεχόμενο των διατροφικών απορριμμάτων σε σακχαρόζη και πολυσακχαρίτες.

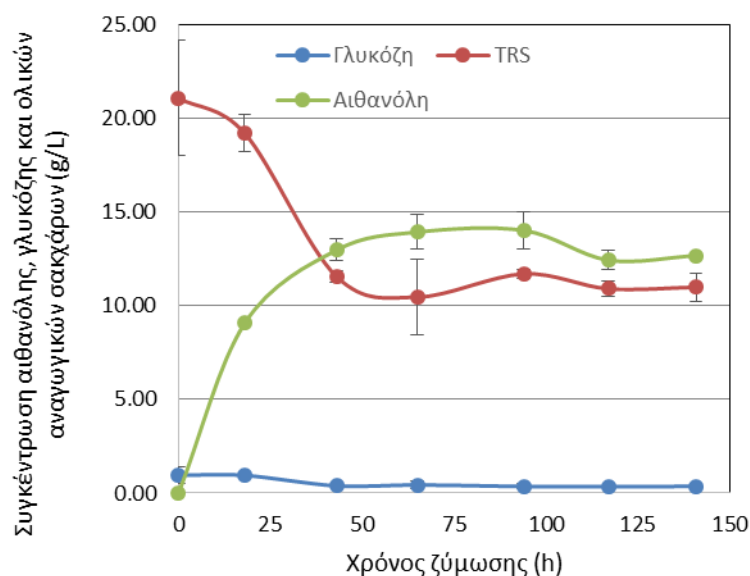
| Συστατικό | Αιθανόλη (g/100 g ξηρών διατροφικών απορριμμάτων) |
|---------------------------|--|
| Σακχαρόζη ¹ | 0.27 |
| Άμυλο ² | 6.07 |
| Κυτταρίνη ² | 5.86 |
| Ημικυτταρίνη ³ | 6.56 |
| Σύνολο | 18.76 |

¹ Ο συντελεστής μετατροπής σακχαρόζης σε γλυκόζη είναι 1.05 και ο θεωρητικός συντελεστής μετατροπής της γλυκόζης σε αιθανόλη είναι $Y_{\text{αιθανόλης/γλυκόζη}}=0.511$

² Ο συντελεστής μετατροπής κυτταρίνης και άμυλου σε γλυκόζη είναι 1.11 και ο θεωρητικός συντελεστής μετατροπής της γλυκόζης σε αιθανόλη είναι $Y_{\text{αιθανόλης/γλυκόζη}}=0.511$

³ Ο συντελεστής μετατροπής ημικυτταρίνης σε ξυλόζη είναι 1.14 και ο θεωρητικός συντελεστής μετατροπής της γλυκόζης σε αιθανόλη είναι $Y_{\text{αιθανόλης/ξυλόζη}}=0.51$

Ακολουθεί η παρουσίαση των αποτελεσμάτων της επίδρασης διαφόρων συνθηκών προκατεργασίας στην παραγωγή βιοαιθανόλης, υπό μορφή πινάκων και διαγραμμάτων, καθώς και σχολιασμός αυτών.



Διάγραμμα 8: Χρονική μεταβολή συγκέντρωσης (g/L) αιθανόλης, γλυκόζης και ολικών αναγωγικών σακχάρων κατά τη βιομετατροπή προκατεργασμένων ξηρών διατροφικών απορριμμάτων, με μικτή μικροβιακή καλλιέργεια του μύκητα *F. oxysporum* F3, αναπτυχθέντος αερόβια, σε ΖΣΚ και πηγή άνθρακα πίτουρο σίτου και της ζύμης *S. cerevisiae*. Συνθήκες προκατεργασίας διατροφικών απορριμμάτων: θερμοκρασία 90°C, χρόνος προκατεργασίας 3h, συγκέντρωση θειικού οξέος 1% β/β.

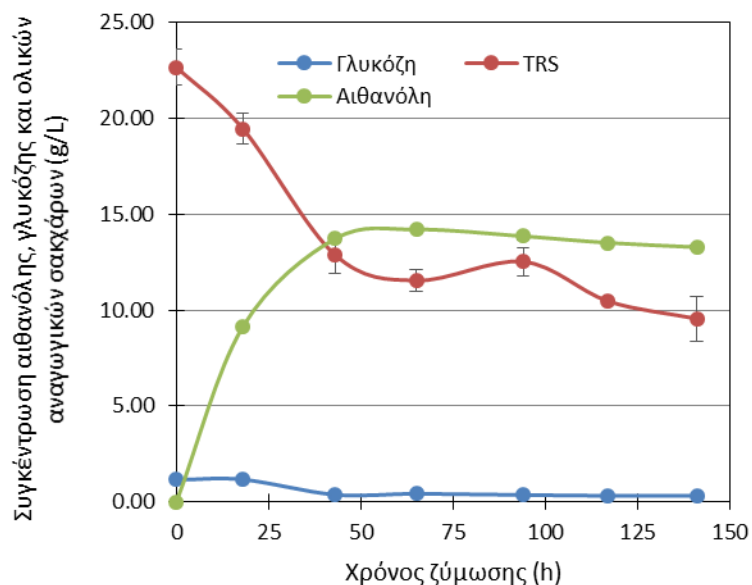
Πίνακας 17: Αναλυτικός πίνακας παρουσίασης των συγκεντρώσεων αιθανόλης, γλυκόζης και αναγωγικών σακχάρων στη χρονική εξέλιξη του πειράματος, για βιομετατροπή προκατεργασμένων ξηρών διατροφικών απορριμμάτων, με μικτή μικροβιακή καλλιέργεια του μύκητα *F. oxysporum* F3, αναπτυχθέντος αερόβια, σε ΖΣΚ και πηγή άνθρακα πίτουρο σίτου και της ζύμης *S. cerevisiae*. Συνθήκες προκατεργασίας διατροφικών απορριμμάτων: θερμοκρασία 90°C, χρόνος προκατεργασίας 3h, συγκέντρωση θειικού οξέος 1% β/β.

| Χρόνος ζύμωσης (h) | Αιθανόλη (g/L) | Απόδοση ¹ | Απόδοση ² | Γλυκόζη (g/L) | TRS ³ (g/L) |
|--------------------|----------------|----------------------|----------------------|---------------|------------------------|
| 0 | 0.00 ± 0.00 | 0.00 ± 0.00 | 0.00 ± 0.00 | 0.96 ± 0.44 | 21.07 ± 3.08 |
| 18 | 9.06 ± 0.15 | 3.31 ± 0.05 | 3.01 ± 0.05 | 0.95 ± 0.12 | 19.20 ± 0.97 |
| 43 | 12.96 ± 0.59 | 4.73 ± 0.22 | 4.30 ± 0.20 | 0.39 ± 0.01 | 11.56 ± 0.30 |
| 65 | 13.93 ± 0.91 | 5.09 ± 0.33 | 4.62 ± 0.30 | 0.44 ± 0.20 | 10.46 ± 2.02 |
| 94 | 14.02 ± 1.01 | 5.12 ± 0.37 | 4.65 ± 0.33 | 0.36 ± 0.12 | 11.70 ± 0.22 |
| 117 | 12.43 ± 0.54 | - | - | 0.35 ± 0.04 | 10.91 ± 0.41 |
| 141 | 12.67 ± 0.11 | - | - | 0.36 ± 0.03 | 10.99 ± 0.74 |

¹ Απόδοση εκφρασμένη σε g αιθανόλης/ 100g διατροφικών απορριμμάτων (FW).

² Απόδοση εκφρασμένη σε g αιθανόλης/100 g συνολικών στερεών (FW + WB)

³ TRS: Total Reducing Sugars (ολικά αναγωγικά σάκχαρα)



Διάγραμμα 9: Χρονική μεταβολή συγκέντρωσης (g/L) αιθανόλης, γλυκόζης και ολικών αναγωγικών σακχάρων κατά τη βιομετατροπή προκατεργασμένων ξηρών διατροφικών απορριμμάτων, με μικτή μικροβιακή καλλιέργεια του μύκητα *F. oxysporum* F3, αναπτυχθέντος αερόβια, σε ΖΣΚ και πηγή άνθρακα πίτουρο σίτου και της ζύμης *S. cerevisiae*. Συνθήκες προκατεργασίας διατροφικών απορριμμάτων: θερμοκρασία 90°C, χρόνος προκατεργασίας 3h, συγκέντρωση θειικού οξέος 3% β/β.

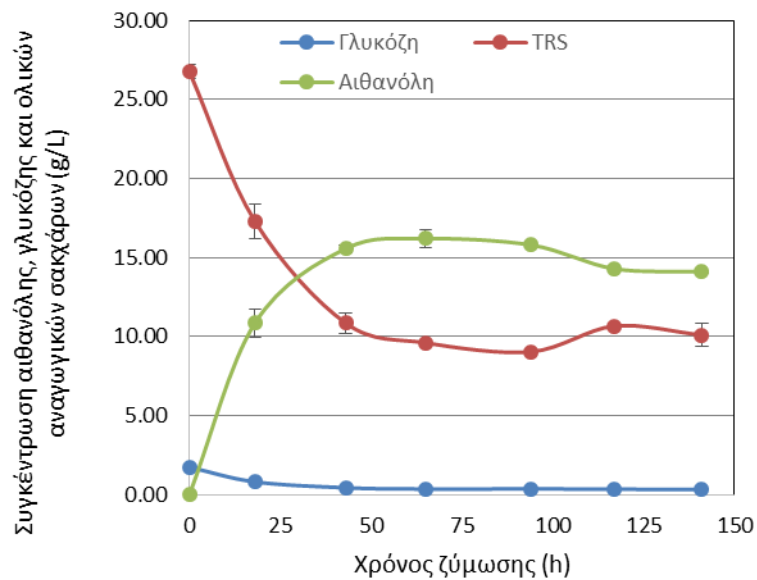
Πίνακας 18: Αναλυτικός πίνακας παρουσίασης των συγκεντρώσεων αιθανόλης, γλυκόζης και αναγωγικών σακχάρων στη χρονική εξέλιξη του πειράματος, για βιομετατροπή προκατεργασμένων ξηρών διατροφικών απορριμμάτων, με μικτή μικροβιακή καλλιέργεια του μύκητα *F. oxysporum* F3, αναπτυχθέντος αερόβια, σε ΖΣΚ και πηγή άνθρακα πίτουρο σίτου και της ζύμης *S. cerevisiae*. Συνθήκες προκατεργασίας διατροφικών απορριμμάτων: θερμοκρασία 90°C, χρόνος προκατεργασίας 3h, συγκέντρωση θειικού οξέος 3% β/β.

| Χρόνος ζύμωσης (h) | Αιθανόλη (g/L) | Απόδοση ¹ | Απόδοση ² | Γλυκόζη (g/L) | TRS ³ (g/L) |
|--------------------|----------------|----------------------|----------------------|---------------|------------------------|
| 0 | 0.00 ± 0.00 | 0.00 ± 0.00 | 0.00 ± 0.00 | 1.15 ± 0.09 | 22.67 ± 0.92 |
| 18 | 9.13 ± 0.16 | 3.34 ± 0.06 | 3.03 ± 0.05 | 1.16 ± 0.12 | 19.47 ± 0.81 |
| 43 | 13.72 ± 0.21 | 5.01 ± 0.08 | 4.55 ± 0.07 | 0.37 ± 0.03 | 12.88 ± 0.94 |
| 65 | 14.21 ± 0.02 | 5.19 ± 0.01 | 4.72 ± 0.01 | 0.42 ± 0.03 | 11.55 ± 0.59 |
| 94 | 13.86 ± 0.18 | - | - | 0.36 ± 0.04 | 12.53 ± 0.72 |
| 117 | 13.51 ± 0.03 | - | - | 0.32 ± 0.00 | 10.46 ± 0.02 |
| 141 | 13.28 ± 0.10 | - | - | 0.31 ± 0.01 | 9.55 ± 1.18 |

¹ Απόδοση εκφρασμένη σε g αιθανόλης/ 100g διατροφικών απορριμμάτων (FW).

² Απόδοση εκφρασμένη σε g αιθανόλης/100 g συνολικών στερεών (FW + WB)

³ TRS: Total Reducing Sugars (ολικά αναγωγικά σάκχαρα)



Διάγραμμα 10: Χρονική μεταβολή συγκέντρωσης (g/L) αιθανόλης, γλυκόζης και ολικών αναγωγικών σακχάρων κατά τη βιομετατροπή προκατεργασμένων ξηρών διατροφικών απορριμμάτων, με μικτή μικροβιακή καλλιέργεια του μύκητα *F. oxysporum* F3, αναπτυχθέντος αερόβια, σε ΖΣΚ και πηγή άνθρακα πίτουρο σίτου και της ζύμης *S. cerevisiae*. Συνθήκες προκατεργασίας διατροφικών απορριμμάτων: θερμοκρασία 100°C, χρόνος προκατεργασίας 3h, συγκέντρωση θειικού οξέος 1% β/β.

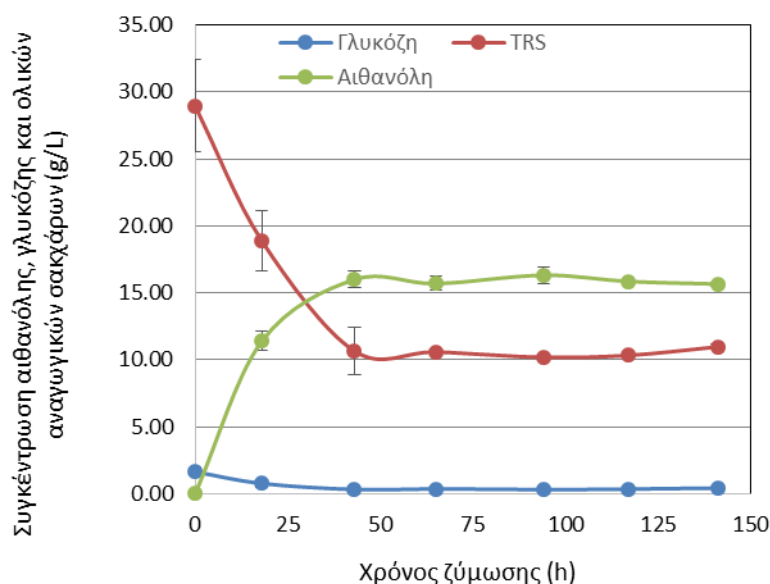
Πίνακας 19: Αναλυτικός πίνακας παρουσίασης των συγκεντρώσεων αιθανόλης, γλυκόζης και αναγωγικών σακχάρων στη χρονική εξέλιξη του πειράματος, για βιομετατροπή προκατεργασμένων ξηρών διατροφικών απορριμμάτων, με μικτή μικροβιακή καλλιέργεια του μύκητα *F. oxysporum* F3, αναπτυχθέντος αερόβια, σε ΖΣΚ και πηγή άνθρακα πίτουρο σίτου και της ζύμης *S. cerevisiae*. Συνθήκες προκατεργασίας διατροφικών απορριμμάτων: θερμοκρασία 100°C, χρόνος προκατεργασίας 3h, συγκέντρωση θειικού οξέος 1% β/β.

| Χρόνος ζύμωσης (h) | Αιθανόλη (g/L) | Απόδοση ¹ | Απόδοση ² | Γλυκόζη (g/L) | TRS ³ (g/L) |
|--------------------|----------------|----------------------|----------------------|---------------|------------------------|
| 0 | 0.00 ± 0.00 | 0.00 ± 0.00 | 0.00 ± 0.00 | 1.73 ± 0.19 | 26.75 ± 0.43 |
| 18 | 10.84 ± 0.87 | 3.95 ± 0.32 | 3.59 ± 0.29 | 0.81 ± 0.04 | 17.29 ± 1.08 |
| 43 | 15.56 ± 0.25 | 5.67 ± 0.09 | 5.16 ± 0.08 | 0.43 ± 0.01 | 10.85 ± 0.65 |
| 65 | 16.19 ± 0.56 | 5.90 ± 0.20 | 5.36 ± 0.19 | 0.35 ± 0.02 | 9.60 ± 0.11 |
| 94 | 15.79 ± 0.21 | - | - | 0.36 ± 0.02 | 9.04 ± 0.14 |
| 117 | 14.29 ± 0.03 | - | - | 0.34 ± 0.05 | 10.66 ± 0.04 |
| 141 | 14.10 ± 0.08 | - | - | 0.32 ± 0.03 | 10.10 ± 0.76 |

¹ Απόδοση εκφρασμένη σε g αιθανόλης/ 100g διατροφικών απορριμμάτων (FW).

² Απόδοση εκφρασμένη σε g αιθανόλης/100 g συνολικών στερεών (FW + WB)

³ TRS: Total Reducing Sugars (ολικά αναγωγικά σάκχαρα)



Διάγραμμα 11: Χρονική μεταβολή συγκέντρωσης (g/L) αιθανόλης, γλυκόζης και ολικών αναγωγικών σακχάρων κατά τη βιομετατροπή προκατεργασμένων ξηρών διατροφικών απορριμμάτων, με μικτή μικροβιακή καλλιέργεια του μύκητα *F. oxysporum* F3, αναπτυχθέντος αερόβια, σε ΖΣΚ και πηγή άνθρακα πίτουρο σίτου και της ζύμης *S. cerevisiae*. Συνθήκες προκατεργασίας διατροφικών απορριμμάτων: θερμοκρασία 100°C, χρόνος προκατεργασίας 3h, συγκέντρωση θειικού οξέος 2% β/β.

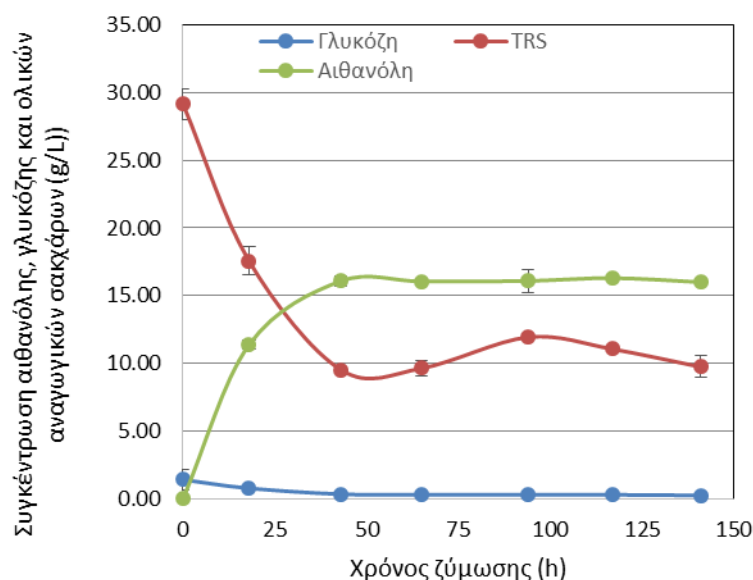
Πίνακας 20: Αναλυτικός πίνακας παρουσίασης των συγκεντρώσεων αιθανόλης, γλυκόζης και αναγωγικών σακχάρων στη χρονική εξέλιξη του πειράματος, για βιομετατροπή προκατεργασμένων ξηρών διατροφικών απορριμμάτων, με μικτή μικροβιακή καλλιέργεια του μύκητα *F. oxysporum* F3, αναπτυχθέντος αερόβια, σε ΖΣΚ και πηγή άνθρακα πίτουρο σίτου και της ζύμης *S. cerevisiae*. Συνθήκες προκατεργασίας διατροφικών απορριμμάτων: θερμοκρασία 100°C, χρόνος προκατεργασίας 3h, συγκέντρωση θειικού οξέος 2% β/β.

| Χρόνος ζύμωσης (h) | Αιθανόλη (g/L) | Απόδοση ¹ | Απόδοση ² | Γλυκόζη (g/L) | TRS ³ (g/L) |
|--------------------|----------------|----------------------|----------------------|---------------|------------------------|
| 0 | 0.00 ± 0.00 | 0.00 ± 0.00 | 0.00 ± 0.00 | 1.64 ± 0.40 | 28.97 ± 3.45 |
| 18 | 11.39 ± 0.71 | 4.16 ± 0.26 | 3.78 ± 0.23 | 0.78 ± 0.27 | 18.89 ± 2.27 |
| 43 | 16.00 ± 0.60 | 5.84 ± 0.22 | 5.31 ± 0.20 | 0.33 ± 0.01 | 10.66 ± 1.75 |
| 65 | 15.70 ± 0.52 | 5.73 ± 0.19 | 5.21 ± 0.17 | 0.36 ± 0.05 | 10.59 ± 0.11 |
| 94 | 16.33 ± 0.63 | 5.96 ± 0.23 | 5.42 ± 0.21 | 0.32 ± 0.02 | 10.20 ± 0.14 |
| 117 | 15.86 ± 0.06 | - | - | 0.36 ± 0.05 | 10.34 ± 0.19 |
| 141 | 15.67 ± 0.15 | - | - | 0.43 ± 0.03 | 10.98 ± 0.19 |

¹ Απόδοση εκφρασμένη σε g αιθανόλης/ 100g διατροφικών απορριμμάτων (FW).

² Απόδοση εκφρασμένη σε g αιθανόλης/100 g συνολικών στερεών (FW + WB)

³ TRS: Total Reducing Sugars (ολικά αναγωγικά σάκχαρα)



Διάγραμμα 12: Χρονική μεταβολή συγκέντρωσης (g/L) αιθανόλης, γλυκόζης και ολικών αναγωγικών σακχάρων κατά τη βιομετατροπή προκατεργασμένων ξηρών διατροφικών απορριμμάτων, με μικτή μικροβιακή καλλιέργεια του μύκητα *F. oxysporum* F3, αναπτυχθέντος αερόβια, σε ΖΣΚ και πηγή άνθρακα πίτουρο σίτου και της ζύμης *S. cerevisiae*. Συνθήκες προκατεργασίας διατροφικών απορριμμάτων: θερμοκρασία 100°C, χρόνος προκατεργασίας 3h, συγκέντρωση θειικού οξέος 3% β/β.

Πίνακας 21: Αναλυτικός πίνακας παρουσίασης των συγκεντρώσεων αιθανόλης, γλυκόζης και αναγωγικών σακχάρων στη χρονική εξέλιξη του πειράματος, για βιομετατροπή προκατεργασμένων ξηρών διατροφικών απορριμμάτων, με μικτή μικροβιακή καλλιέργεια του μύκητα *F. oxysporum* F3, αναπτυχθέντος αερόβια, σε ΖΣΚ και πηγή άνθρακα πίτουρο σίτου και της ζύμης *S. cerevisiae*. Συνθήκες προκατεργασίας διατροφικών απορριμμάτων: θερμοκρασία 100°C, χρόνος προκατεργασίας 3h, συγκέντρωση θειικού οξέος 3% β/β.

| Χρόνος ζύμωσης (h) | Αιθανόλη (g/L) | Απόδοση ¹ | Απόδοση ² | Γλυκόζη (g/L) | TRS ³ (g/L) |
|--------------------|----------------|----------------------|----------------------|---------------|------------------------|
| 0 | 0.00 ± 0.00 | 0.00 ± 0.00 | 0.00 ± 0.00 | 1.41 ± 0.72 | 29.16 ± 1.13 |
| 18 | 11.38 ± 0.31 | 4.16 ± 0.11 | 3.78 ± 0.10 | 0.79 ± 0.05 | 17.56 ± 1.03 |
| 43 | 16.08 ± 0.35 | 5.87 ± 0.13 | 5.34 ± 0.11 | 0.35 ± 0.02 | 9.53 ± 0.11 |
| 65 | 16.06 ± 0.04 | 5.86 ± 0.02 | 5.33 ± 0.01 | 0.30 ± 0.00 | 9.64 ± 0.59 |
| 94 | 16.10 ± 0.84 | 5.88 ± 0.31 | 5.34 ± 0.28 | 0.30 ± 0.01 | 11.94 ± 0.05 |
| 117 | 16.30 ± 0.11 | 5.95 ± 0.04 | 5.51 ± 0.04 | 0.30 ± 0.02 | 11.06 ± 0.24 |
| 141 | 16.00 ± 0.17 | - | - | 0.25 ± 0.00 | 9.74 ± 0.81 |

¹ Απόδοση εκφρασμένη σε g αιθανόλης/ 100g διατροφικών απορριμμάτων (FW).

² Απόδοση εκφρασμένη σε g αιθανόλης/100 g συνολικών στερεών (FW + WB)

³ TRS: Total Reducing Sugars (ολικά αναγωγικά σάκχαρα)

Σε όλες τις εξετασθείσες περιπτώσεις παρατηρήθηκε αυξημένος ρυθμός παραγωγής βιαθανόλης τις πρώτες 11 ώρες καλλιέργειας. Ο ρυθμός παραγωγής μειώνεται για το χρονικό διάστημα 11-43 ώρες (Διαγράμματα 8-12). Η συγκέντρωση της γλυκόζης κατά την έναρξη της ζύμωσης βρέθηκε σε χαμηλά επίπεδα (περίπου 1.4 g/L). Αναφορικά με τα ολικά αναγωγικά σάκχαρα διαφοροποίηση παρατηρήθηκε μεταξύ των διαφορετικών συνθηκών προκατεργασίας και συγκεκριμένα αύξηση της έντασης της προκατεργασίας οδήγησε σε ελαφρά αύξηση των ολικών αναγωγικών σακχάρων (Πίνακες 17-21).

Οι μέγιστες επιτευχθείσες τιμές αιθανόλης συναρτήσει της έντασης της προκατεργασίας παρουσιάζονται στον Πίνακα 22.

Πίνακας 22: Μέγιστες τιμές αιθανόλης συναρτήσει της έντασης της προκατεργασίας κατά τη βιομετατροπή ξηρών διατροφικών απορριμμάτων με μικτή μικροβιακή καλλιέργεια του μύκητα *F. oxysporum* F3 και της ζύμης *S. cerevisiae*

| Προκατεργασία Θερμοκρασία (°C)/C_{H2SO4} (% β/β) | Αιθανόλη (g/L) | Απόδοση¹ (g/100 g προκ. FW) | Απόδοση² (g/100 g FW+WB) | Ποσοστό επί της μέ- γιστης θεωρητικής (%)³ |
|---|---------------------------|---|--|--|
| 90/1 | 14.02 ± 1.01 | 5.12 ± 0.37 | 4.65 ± 0.33 | 27.28 ± 1.96 |
| 90/3 | 14.21 ± 0.02 | 5.19 ± 0.01 | 4.72 ± 0.05 | 27.66 ± 0.03 |
| 100/1 | 16.19 ± 0.56 | 5.90 ± 0.20 | 5.36 ± 0.19 | 31.44 ± 1.09 |
| 100/2 | 16.33 ± 0.63 | 5.96 ± 0.23 | 5.42 ± 0.21 | 31.78 ± 1.24 |
| 100/3 | 16.30 ± 0.11 | 5.95 ± 0.04 | 5.41 ± 0.04 | 31.73 ± 0.21 |

¹ Απόδοση εκφρασμένη σε g αιθανόλης/100 g διατροφικών απορριμμάτων (FW)

² Απόδοση εκφρασμένη σε g αιθανόλης/100 g συνολικών στερεών (FW + WB)

³ Με βάση τη μέγιστη θεωρητική απόδοση αιθανόλης από τη βιομετατροπή της κυτταρίνης ($Y_{\text{αιθανόλης/σακχάρου}}=0.511$) και της ημικυτταρίνης ($Y_{\text{αιθανόλης/σακχάρου}}=0.51$).

Από τα πειραματικά αποτελέσματα προκύπτει ότι στο εύρος συνθηκών που εξετάστηκαν σημαντικότερη παράμετρος είναι η θερμοκρασία. Ειδικότερα αύξηση της συγκέντρωσης του οξέος από 1% σε 3% (β/β, g H₂SO₄/100 g ξηρών ΔΑ) διατηρώντας τη θερμοκρασία προκατεργασίας στους 90°C δεν βελτιώνει την παραγόμενη αιθανόλη η οποία κυμάνθηκε στα 14 g/L. Αύξηση της θερμοκρασίας στους 100°C οδηγεί σε αύξηση της παραγόμενης αιθανόλης στα 16.33 g/L (5.96 g /100 g ξηρών ΔΑ, ή 31.78% της μέγιστης θεωρητικής απόδοσης) για συγκέντρωση οξέος 2% (β/β). Θα πρέπει να σημειωθεί ότι όπως και στην περίπτωση των 90°C οι διακυμάνσεις στην παραγόμενη αιθανόλη με αύξηση της συγκέντρωσης του οξέος ήταν μικρές. Επιλέχθηκε η προκατεργασία σε θερμοκρασία 100°C παρουσία 2 g H₂SO₄/100 g ξηρών ΔΑ για 3 h για τα επόμενα πειράματα.

4. Επίδραση του εξωγενώς προστιθέμενου ενζυμικού σκευάσματος Cellic® Ctec 2

Με στόχο τη βελτίωση των αποδόσεων μελετήθηκε η επίδραση της προσθήκης κυτταρινολυτικού σκευάσματος Cellic® CTec 2 (εμπορικού σκευάσματος της εταιρείας Novozymes). Εξετάστηκε η επίδραση της προσθήκης 0, 4, 6, 8, 10 FPU/g κυτταρίνης ΔΑ Cellic® CTec 2. Θα πρέπει να σημειωθεί ότι 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

Η προσθήκη λοιπόν του εμπορικού σκευάσματος ενισχύει τόσο το κυτταρινολυτικό όσο και το αμυλολυτικό ενζυμικό φορτίο.

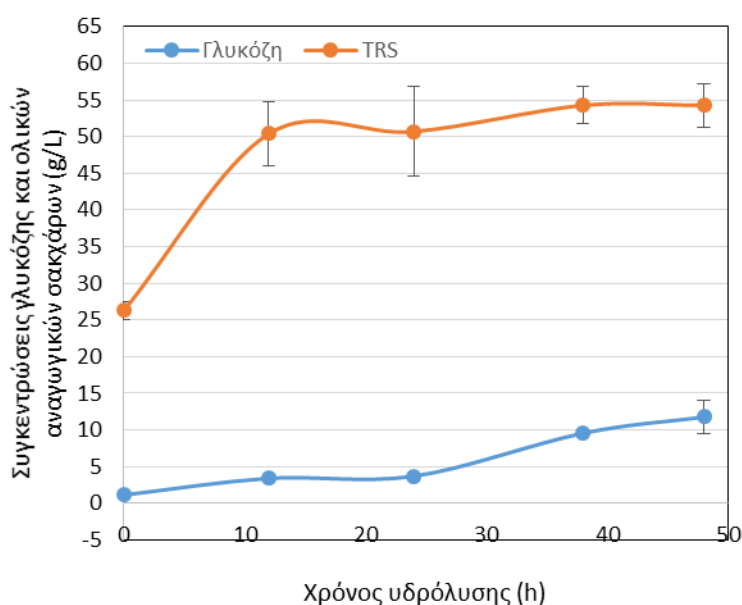
Ανά συνθήκη το συνολικό ενζυμικό φορτίο (το φορτίο που προέρχεται από το αερόβιο στάδιο της ανάπτυξης του μύκητα *F. oxysporum* F3 + το φορτίο που προστίθεται εξωγενώς) παρουσιάζεται στον Πίνακα 22.

Πίνακας 22: Ολικό ενζυμικό φορτίο κυτταρινολυτικών και αμυλολυτικών ενζύμων

| Προστιθέμενο φορτίο από Cellic [®] CTec 2 | Ολικό κυτταρινολυτικό φορτίο (FPU/g κυτταρίνης ΔΑ) | Ολικό φορτίο αμυλασών (U/g αμύλου ΔΑ) | |
|--|--|---------------------------------------|--------------|
| | | α-αμυλάση | Γλυκοαμυλάση |
| 0 | 1.43 | 10.45 | 2.21 |
| 4 | 5.43 | 11.03 | 3.22 |
| 6 | 7.43 | 11.33 | 3.72 |
| 8 | 9.43 | 11.62 | 4.22 |
| 10 | 11.43 | 11.91 | 4.72 |

3.1 Ενζυμική υδρόλυση

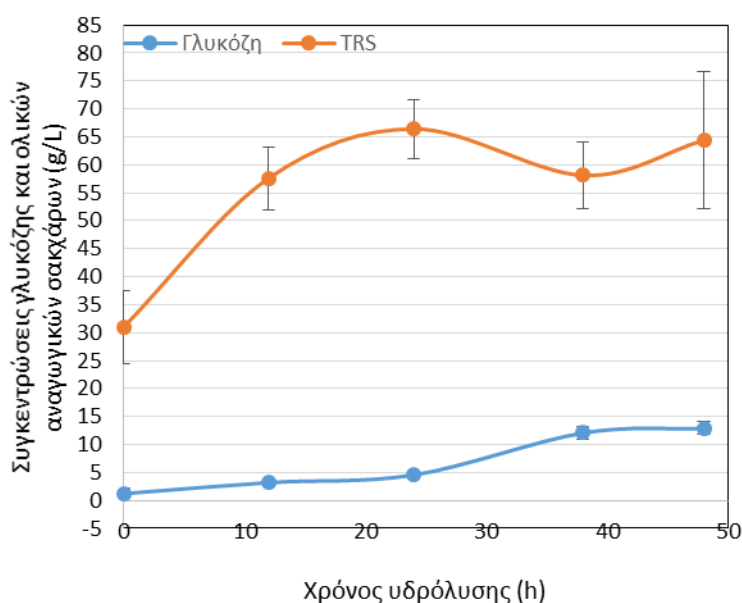
Αρχικά, μελετήθηκε η επίδραση του εξωγενώς προστιθέμενου ενζυμικού σκευάσματος, Cellic[®] CTec 2, στο στάδιο της υδρόλυσης των διατροφικών απορριμμάτων. Ακολουθεί η παρουσίαση των αποτελεσμάτων υπό μορφή πινάκων και διαγραμμάτων, καθώς και σχολιασμός αυτών.



Διάγραμμα 13: Χρονική μεταβολή συγκέντρωσης (g/L) γλυκόζης και ολικών αναγωγικών σακχάρων κατά την υδρόλυση προκατεργασμένων ξηρών διατροφικών απορριμμάτων, με μικτή μικροβιακή καλλιέργεια του μύκητα *F. oxysporum* F3, αναπτυχθέντος αερόβια, σε ΖΣΚ και πηγή άνθρακα πίτουρο σίτου. Δεν πραγματοποιήθηκε προσθήκη του εξωγενώς προστιθέμενου ενζύμου Cellic CTec 2 (0 FPU/g κυτταρίνης).

Πίνακας 23: Αναλυτικός πίνακας παρουσίασης των συγκεντρώσεων γλυκόζης και αναγωγικών σακχάρων στη χρονική εξέλιξη της υδρόλυσης προκατεργασμένων, ξηρών διατροφικών απορριμμάτων, με μικτή μικροβιακή καλλιέργεια του μύκητα *F. oxysporum* F3, αναπτυχθέντος αερόβια, σε ΖΣΚ και πηγή άνθρακα πίτουρο σίτου. Δεν πραγματοποιήθηκε προσθήκη του εξωγενώς προστιθέμενου ενζύμου *Cellic Cteq 2* (0 FPU/g κυτταρίνης).

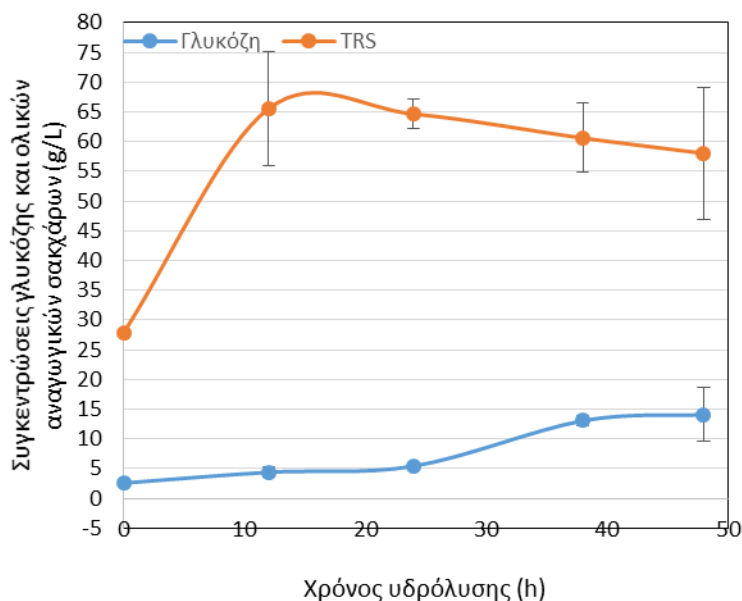
| Χρόνος υδρόλυσης (h) | Γλυκόζη (g/L) | TRS (g/L) |
|----------------------|---------------|--------------|
| 0 | 1.14 ± 0.05 | 26.29 ± 1.19 |
| 12 | 3.41 ± 0.37 | 50.41 ± 4.42 |
| 24 | 3.71 ± 0.25 | 50.70 ± 6.07 |
| 38 | 9.57 ± 0.40 | 54.28 ± 2.50 |
| 48 | 11.78 ± 2.23 | 49.27 ± 2.97 |



Διάγραμμα 14: Χρονική μεταβολή συγκέντρωσης (g/L) γλυκόζης και ολικών αναγωγικών σακχάρων κατά την υδρόλυση προκατεργασμένων ξηρών διατροφικών απορριμμάτων, με μικτή μικροβιακή καλλιέργεια του μύκητα *F. oxysporum* F3, αναπτυχθέντος αερόβια, σε ΖΣΚ και πηγή άνθρακα πίτουρο σίτου. Πραγματοποιήθηκε προσθήκη του εξωγενώς προστιθέμενου ενζύμου, *Cellic Cteq 2*, σε τέτοια ποσότητα ώστε να αντιστοιχεί σε 4FPU/g κυτταρίνης.

Πίνακας 24: Αναλυτικός πίνακας παρουσίασης των συγκεντρώσεων γλυκόζης και αναγωγικών σακχάρων στη χρονική εξέλιξη της υδρόλυσης προκατεργασμένων, ξηρών διατροφικών απορριμμάτων, με μικτή μικροβιακή καλλιέργεια του μύκητα *F. oxysporum* F3, αναπτυχθέντος αερόβια, σε ΖΣΚ και πηγή άνθρακα πίτουρο σίτου. Πραγματοποιήθηκε προσθήκη του εξωγενώς προστιθέμενου ενζύμου, *Cellic Cteq 2*, σε τέτοια ποσότητα ώστε να αντιστοιχεί σε 4FPU/g κυτταρίνης.

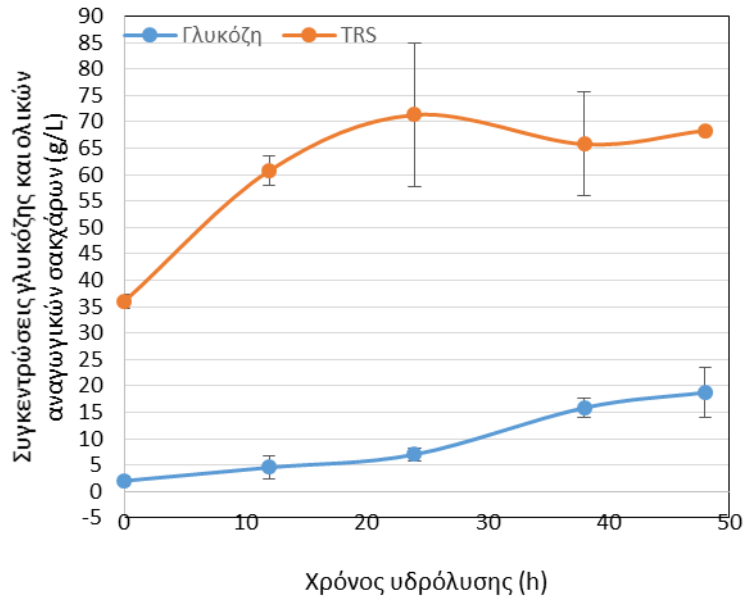
| Χρόνος υδρόλυσης (h) | Γλυκόζη (g/L) | TRS (g/L) |
|----------------------|---------------|---------------|
| 0 | 1.23 ± 0.91 | 26.37 ± 6.58 |
| 12 | 3.21 ± 0.43 | 61.62 ± 5.61 |
| 24 | 4.57 ± 0.25 | 62.72 ± 5.26 |
| 38 | 12.07 ± 1.10 | 53.95 ± 5.93 |
| 48 | 12.90 ± 1.15 | 55.71 ± 12.34 |



Διάγραμμα 15: Χρονική μεταβολή συγκέντρωσης (g/L) γλυκόζης και ολικών αναγωγικών σακχάρων κατά την υδρόλυση προκατεργασμένων ξηρών διατροφικών απορριμμάτων, με μικτή μικροβιακή καλλιέργεια του μύκητα *F. oxysporum* F3, αναπτυχθέντος αερόβια, σε ΖΣΚ και πηγή άνθρακα πίτουρο σίτου. Πραγματοποιήθηκε προσθήκη του εξωγενώς προστιθέμενου ενζύμου, *Cellic Cteq 2*, σε τέτοια ποσότητα ώστε να αντιστοιχεί σε 6FPU/g κυτταρίνης.

Πίνακας 25: Αναλυτικός πίνακας παρουσίασης των συγκεντρώσεων γλυκόζης και αναγωγικών σακχάρων στη χρονική εξέλιξη της υδρόλυσης προκατεργασμένων, ξηρών διατροφικών απορριμμάτων, με μικτή μικροβιακή καλλιέργεια του μύκητα *F. oxysporum* F3, αναπτυχθέντος αερόβια, σε ΖΣΚ και πηγή άνθρακα πίτουρο σίτου. Πραγματοποιήθηκε προσθήκη του εξωγενώς προστιθέμενου ενζύμου, *Cellic Cteq 2*, σε τέτοια ποσότητα ώστε να αντιστοιχεί σε 6FPU/g κυτταρίνης.

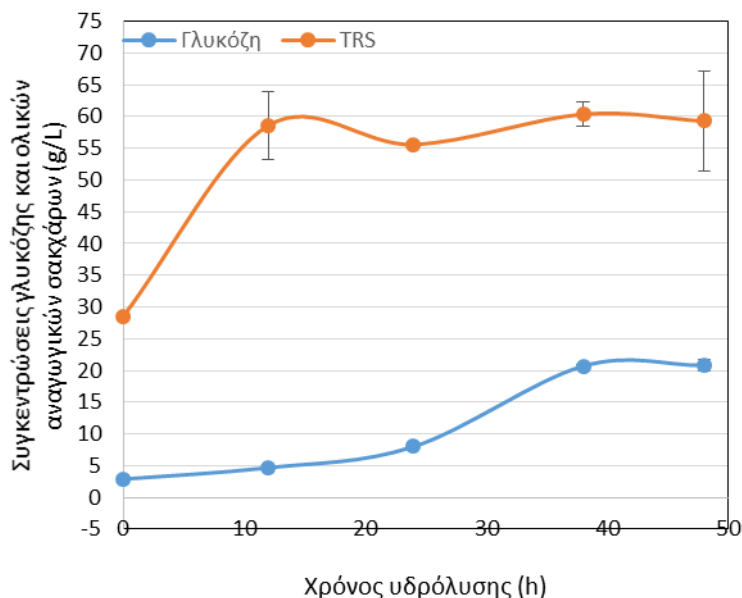
| Χρόνος υδρόλυσης (h) | Γλυκόζη (g/L) | TRS (g/L) |
|----------------------|---------------|---------------|
| 0 | 2.58 ± 0.77 | 27.86 ± 0.38 |
| 12 | 4.40 ± 0.88 | 65.55 ± 9.66 |
| 24 | 5.42 ± 0.34 | 54.66 ± 2.50 |
| 38 | 13.06 ± 0.88 | 60.62 ± 5.80 |
| 48 | 14.09 ± 4.56 | 58.05 ± 11.06 |



Διάγραμμα 16: Χρονική μεταβολή συγκέντρωσης (g/L) γλυκόζης και ολικών αναγωγικών σακχάρων κατά την υδρόλυση προκατεργασμένων ξηρών διατροφικών απορριμμάτων, με μικτή μικροβιακή καλλιέργεια του μύκητα *F. oxysporum* F3, αναπτυχθέντος αερόβια, σε ΖΣΚ και πηγή άνθρακα πίτουρο σίτου. Πραγματοποιήθηκε προσθήκη του εξωγενώς προστιθέμενου ενζύμου, *Cellic Cteq 2*, σε τέτοια ποσότητα ώστε να αντιστοιχεί σε 8FPU/g κυτταρίνης.

Πίνακας 26: Αναλυτικός πίνακας παρουσίασης των συγκεντρώσεων γλυκόζης και αναγωγικών σακχάρων στη χρονική εξέλιξη της υδρόλυσης προκατεργασμένων, ξηρών διατροφικών απορριμμάτων, με μικτή μικροβιακή καλλιέργεια του μύκητα *F. oxysporum* F3, αναπτυχθέντος αερόβια, σε ΖΣΚ και πηγή άνθρακα πίτουρο σίτου. Πραγματοποιήθηκε προσθήκη του εξωγενώς προστιθέμενου ενζύμου, *Cellic Cteq 2*, σε τέτοια ποσότητα ώστε να αντιστοιχεί σε 8FPU/g κυτταρίνης.

| Χρόνος υδρόλυσης (h) | Γλυκόζη (g/L) | TRS (g/L) |
|----------------------|---------------|---------------|
| 0 | 2.03 ± 0.90 | 35.95 ± 1.35 |
| 12 | 2.97 ± 2.23 | 60.74 ± 2.75 |
| 24 | 7.01 ± 1.26 | 71.30 ± 13.62 |
| 38 | 15.83 ± 1.71 | 55.76 ± 9.85 |
| 48 | 18.76 ± 4.71 | 58.33 ± 0.00 |



Διάγραμμα 17: Χρονική μεταβολή συγκέντρωσης (g/L) γλυκόζης και ολικών αναγωγικών σακχάρων κατά την υδρόλυση προκατεργασμένων ξηρών διατροφικών απορριμμάτων, με μικτή μικροβιακή καλλιέργεια του μύκητα *F. oxysporum* F3, αναπτυχθέντος αερόβια, σε ΖΣΚ και πηγή άνθρακα πίτουρο σίτου. Πραγματοποιήθηκε προσθήκη του εξωγενώς προστιθέμενου ενζύμου, *Cellic Cteq 2*, σε τέτοια ποσότητα ώστε να αντιστοιχεί σε 10 FPU/g κυτταρίνης.

Πίνακας 28: Αναλυτικός πίνακας παρουσίασης των συγκεντρώσεων γλυκόζης και αναγωγικών σακχάρων στη χρονική εξέλιξη της υδρόλυσης προκατεργασμένων, ξηρών διατροφικών απορριμμάτων, με μικτή μικροβιακή καλλιέργεια του μύκητα *F. oxysporum* F3, αναπτυχθέντος αερόβια, σε ΖΣΚ και πηγή άνθρακα πίτουρο σίτου. Πραγματοποιήθηκε προσθήκη του εξωγενώς προστιθέμενου ενζύμου, *Cellic Cteq 2*, σε τέτοια ποσότητα ώστε να αντιστοιχεί σε 10FPU/g κυτταρίνης.

| Χρόνος υδρόλυσης (h) | Γλυκόζη (g/L) | TRS (g/L) |
|----------------------|---------------|--------------|
| 0 | 2.87 ± 0.76 | 28.51 ± 0.54 |
| 12 | 4.67 ± 0.02 | 58.61 ± 5.34 |
| 24 | 7.98 ± 0.05 | 55.62 ± 0.20 |
| 38 | 20.68 ± 0.23 | 60.38 ± 1.96 |
| 48 | 20.79 ± 0.83 | 59.29 ± 7.96 |

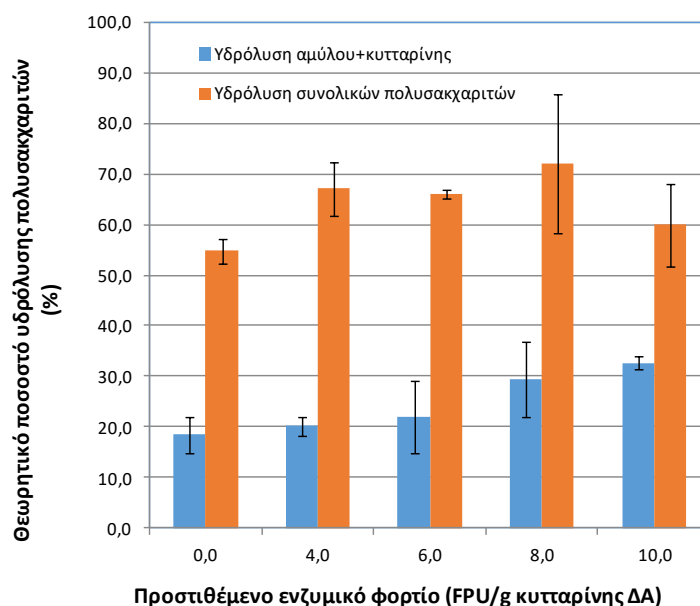
Σε όλες τις εξετασθείσες περιπτώσεις παρατηρήθηκε αργή απελευθέρωση της γλυκόζης τις πρώτες 24 ώρες υδρόλυσης, με αύξηση του ρυθμού για το διάστημα 24-48 ώρες. Παρακάτω παρουσιάζονται οι μέγιστες συγκεντρώσεις γλυκόζης και ολικών αναγωγικών σακχάρων, που επιτυγχάνονται με προσθήκη ενζυμικού σκευάσματος με διαφορετικές ενεργότητες (**Πίνακας 29**). Συγκρίνοντας τη μέγιστη συγκέντρωση της γλυκόζης χωρίς την προσθήκη *Cellic® CTec 2* και την αντίστοιχη με προσθήκη *Cellic® CTec 2* στα 10 FPU/g κυτταρίνης, παρατηρείται μια αύξηση της τάξης του 76%. Η αύξηση που επιτυγχάνεται, με κάθε διαφορετική ποσότητα *Cellic® CTec 2*, είναι περίπου 9-10% μεγαλύτερη, από την αμέσως προηγούμενη ποσότητα. Εξάιρεση αποτελεί η μεταβολή που παρατηρείται από τα 6 στα 8 FPU/g κυτταρίνης του ενζυμικού σκευάσματος, όπου η αύξηση που παρατηρείται είναι της τάξης του 33%.

Λιγότερο ξεκάθαρα είναι τα πράγματα για τη μεταβολή που παρατηρείται στις μέγιστες συγκεντρώσεις των ολικών αναγωγικών σακχάρων αναλόγως την περιεχόμενη ποσότητα Cellic® CTec 2. Η υψηλότερη τιμή (71.30g/L) παρατηρείται με την προσθήκη 8 FPU/g κυτταρίνης του ενζυμικού σκευάσματος. Ωστόσο, με εξαίρεση την τιμή αυτή, η προσθήκη 4, 6 και 10 FPU/g κυτταρίνης του Cellic® CTec 2, επιφέρει αντιστρόφως ανάλογη μεταβολή της μέγιστης συγκέντρωσης των ολικών αναγωγικών σακχάρων.

Πίνακας 29: Οι μέγιστες συγκεντρώσεις γλυκόζης και ολικών αναγωγικών σακχάρων που παρουσιάζονται κατά την υδρόλυση προκατεργασμένων, ξηρών διατροφικών απορριμμάτων.

| Cellic Ctec 2 (FPU/g κυτταρίνης) | Γλυκόζη (g/L) | TRS (g/L) |
|----------------------------------|---------------|---------------|
| 0 | 11.78 ± 2.23 | 54.28 ± 2.50 |
| 4 | 12.90 ± 1.15 | 66.44 ± 5.26 |
| 6 | 14.09 ± 4.56 | 64.66 ± 2.50 |
| 8 | 18.76 ± 4.71 | 71.30 ± 13.62 |
| 10 | 20.79 ± 0.83 | 60.38 ± 1.96 |

Τα θεωρητικά ποσοστά υδρόλυσης των πολυσακχαριτών των διατροφικών απορριμμάτων συναρτήσει του προστιθέμενου ενζυμικού σκευάσματος παρουσιάζονται στο Διάγραμμα 18.

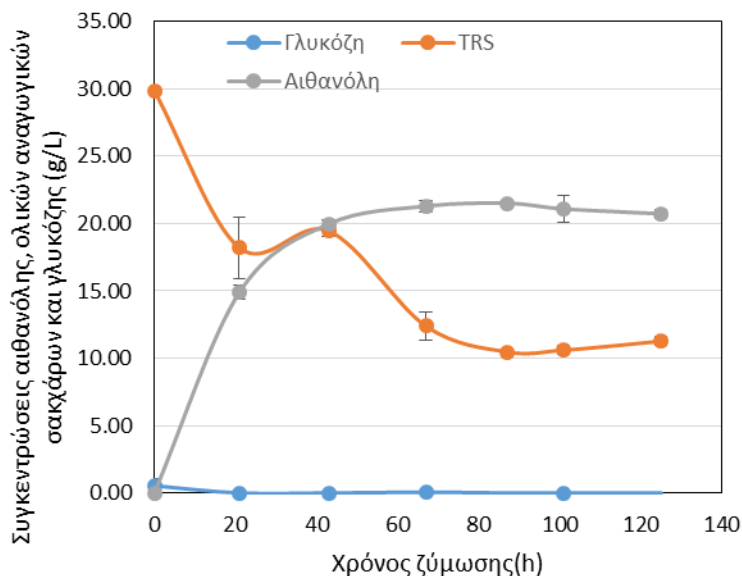


Διάγραμμα 18: Θεωρητικά ποσοστά υδρόλυσης πολυσακχαριτών.

Η αύξηση του ενζυμικού φορτίου οδηγεί σε αύξηση του ποσοστού υδρόλυσης κυτταρίνης και αμύλου (Διάγραμμα 18). Το μέγιστο ποσοστό υδρόλυσης, 32.58%, επιτεύχθηκε στο μεγαλύτερη προστιθέμενη ποσότητα Cellic® CTec 2.

3.2 Αλκοολική ζύμωση

Ακολούθως μελετήθηκε η επίδραση του εξωγενώς προστιθέμενου ενζυμικού σκευάσματος, Cellic® CTec 2, στο στάδιο της βιομετατροπής των διατροφικών απορριμμάτων σε αιθανόλη. Ακολουθούν τα αποτελέσματα σε μορφή διαγραμμάτων και πινάκων και ο σχολιασμός αυτών.



Διάγραμμα 19: Χρονική μεταβολή συγκέντρωσης (g/L) αιθανόλης, γλυκόζης και ολικών αναγωγικών σακχάρων κατά τη βιομετατροπή προκατεργασμένων, ξηρών διατροφικών απορριμμάτων, με μικτή μικροβιακή καλλιέργεια του μύκητα *F. oxysporum* F3, αναπτυχθέντος αερόβια, σε ΖΣΚ και πηγή άνθρακα πίτουρο σίτου και της ζύμης *S. cerevisiae*. Πραγματοποιήθηκε προσθήκη του εξωγενώς προστιθέμενου ενζύμου, *Cellic® Cteq 2*, σε τέτοια ποσότητα ώστε να αντιστοιχεί σε 4FPU/g κυτταρίνης.

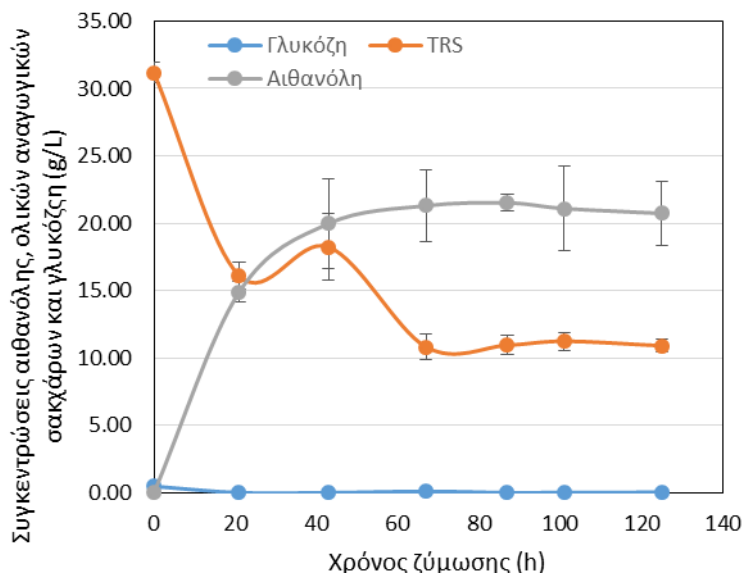
Πίνακας 30: Αναλυτικός πίνακας παρουσίασης των συγκεντρώσεων αιθανόλης, γλυκόζης και αναγωγικών σακχάρων στη χρονική εξέλιξη του πειράματος, για βιομετατροπή προκατεργασμένων ξηρών διατροφικών απορριμμάτων, με μικτή μικροβιακή καλλιέργεια του μύκητα *F. oxysporum* F3, αναπτυχθέντος αερόβια, σε ΖΣΚ και πηγή άνθρακα πίτουρο σίτου και της ζύμης *S.cerevisiae*. Πραγματοποιήθηκε προσθήκη του εξωγενώς προστιθέμενου ενζύμου, *Cellic® Cteq 2*, σε τέτοια ποσότητα ώστε να αντιστοιχεί σε 4FPU/g κυτταρίνης.

| Χρόνος ζύμωσης (h) | Αιθανόλη (g/L) | Απόδοση ¹ | Απόδοση ² | Γλυκόζη (g/L) | TRS ³ (g/L) |
|--------------------|----------------|----------------------|----------------------|---------------|------------------------|
| 0 | 0.00 ± 0.00 | 0.00 ± 0.00 | 0.00 ± 0.00 | 0.54 ± 0.48 | 29.88 ± 0.00 |
| 21 | 14.89 ± 0.55 | 5.44 ± 0.20 | 4.94 ± 0.18 | 0.00 ± 0.00 | 18.21 ± 2.27 |
| 43 | 19.98 ± 0.28 | 7.29 ± 0.10 | 6.63 ± 0.09 | 0.00 ± 0.00 | 19.46 ± 0.40 |
| 67 | 21.30 ± 0.41 | 7.78 ± 0.15 | 7.07 ± 0.14 | 0.04 ± 0.02 | 12.38 ± 1.08 |
| 87 | 21.51 ± 0.19 | 7.85 ± 0.07 | 7.14 ± 0.06 | 0.00 ± 0.00 | 10.48 ± 0.09 |
| 101 | 21.10 ± 0.99 | 7.70 ± 0.36 | 7.00 ± 0.33 | 0.01 ± 0.00 | 10.61 ± 0.33 |
| 125 | 20.73 ± 0.35 | 7.57 ± 0.13 | 6.88 ± 0.12 | 0.00 ± 0.00 | 11.26 ± 0.31 |

¹ Απόδοση εκφρασμένη σε g αιθανόλης/ 100g διατροφικών απορριμμάτων (FW).

² Απόδοση εκφρασμένη σε g αιθανόλης/100 g συνολικών στερεών (FW + WB)

³ TRS: Total Reducing Sugars (ολικά αναγωγικά σάκχαρα)



Διάγραμμα 20: Χρονική μεταβολή συγκέντρωσης (g/L) αιθανόλης, γλυκόζης και ολικών αναγωγικών σακχάρων κατά τη βιομετατροπή προκατεργασμένων, ξηρών διατροφικών απορριμμάτων, με μικτή μικροβιακή καλλιέργεια του μύκητα *F. oxysporum* F3, αναπτυχθέντος αερόβια, σε ΖΣΚ και πηγή άνθρακα πίτουρο σίτου και της ζύμης *S. cerevisiae*. Πραγματοποιήθηκε προσθήκη του εξωγενώς προστιθέμενου ενζύμου, *Cellic® Cteq 2*, σε τέτοια ποσότητα ώστε να αντιστοιχεί σε 6 FPU/g κυτταρίνης.

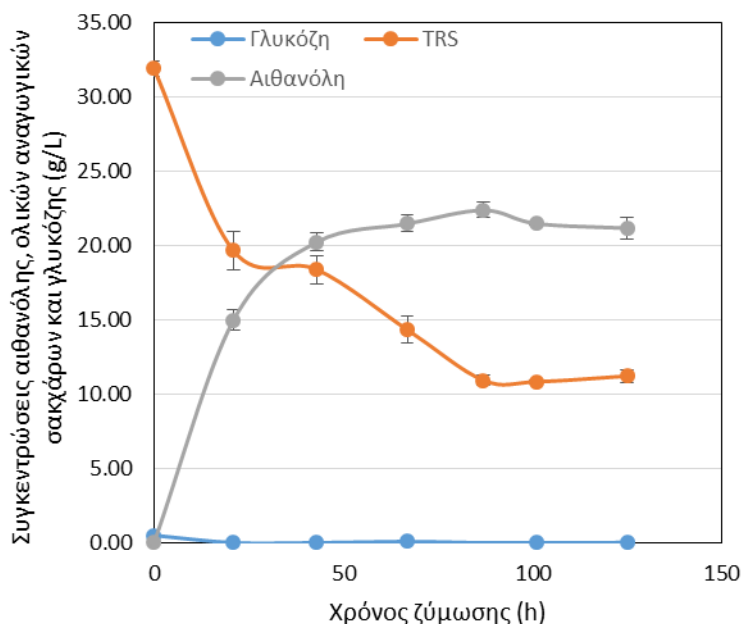
Πίνακας 33: Αναλυτικός πίνακας παρουσίασης των συγκεντρώσεων αιθανόλης, γλυκόζης και αναγωγικών σακχάρων στη χρονική εξέλιξη του πειράματος, για βιομετατροπή προκατεργασμένων ξηρών διατροφικών απορριμμάτων, με μικτή μικροβιακή καλλιέργεια του μύκητα *F. oxysporum* F3, αναπτυχθέντος αερόβια, σε ΖΣΚ και πηγή άνθρακα πίτουρο σίτου και της ζύμης *S. cerevisiae*. Πραγματοποιήθηκε προσθήκη του εξωγενώς προστιθέμενου ενζύμου, *Cellic® Cteq 2*, σε τέτοια ποσότητα ώστε να αντιστοιχεί σε 6FPU/g κυτταρίνης.

| Χρόνος ζύμωσης (h) | Αιθανόλη (g/L) | Απόδοση ¹ | Απόδοση ² | Γλυκόζη (g/L) | TRS ³ (g/L) |
|--------------------|----------------|----------------------|----------------------|---------------|------------------------|
| 0 | 0.00 ± 0.00 | 0.00 ± 0.00 | 0.00 ± 0.00 | 0.48 ± 0.19 | 31.18 ± 0.76 |
| 21 | 13.96 ± 0.78 | 5.10 ± 0.28 | 4.63 ± 0.26 | 0.00 ± 0.05 | 16.11 ± 1.03 |
| 43 | 17.99 ± 3.33 | 6.57 ± 1.22 | 5.97 ± 1.11 | 0.00 ± 0.04 | 18.24 ± 2.45 |
| 67 | 18.96 ± 2.64 | 6.92 ± 0.96 | 6.29 ± 0.88 | 0.10 ± 0.02 | 10.82 ± 0.92 |
| 87 | 21.57 ± 0.61 | 7.88 ± 0.22 | 7.16 ± 0.20 | 0.00 ± 0.01 | 10.95 ± 0.71 |
| 101 | 18.52 ± 3.16 | 6.76 ± 1.15 | 6.15 ± 1.05 | 0.02 ± 0.00 | 11.24 ± 0.67 |
| 125 | 18.52 ± 2.36 | 6.76 ± 0.86 | 6.15 ± 0.78 | 0.03 ± 0.01 | 10.91 ± 0.46 |

¹ Απόδοση εκφρασμένη σε g αιθανόλης/ 100g διατροφικών απορριμμάτων (FW).

² Απόδοση εκφρασμένη σε g αιθανόλης/100 g συνολικών στερεών (FW + WB)

³ TRS: Total Reducing Sugars (ολικά αναγωγικά σάκχαρα)



Διάγραμμα 21: Χρονική μεταβολή συγκέντρωσης (g/L) αιθανόλης, γλυκόζης και ολικών αναγωγικών σακχάρων κατά τη βιομετατροπή προκατεργασμένων, ξηρών διατροφικών απορριμμάτων, με μικτή μικροβιακή καλλιέργεια του μύκητα *F. oxysporum* F3, αναπτυχθέντος αερόβια, σε ΖΣΚ και πηγή άνθρακα πίτουρο σίτου και της ζύμης *S. cerevisiae*. Πραγματοποιήθηκε προσθήκη του εξωγενώς προστιθέμενου ενζύμου, *Cellic® Cteq 2*, σε τέτοια ποσότητα ώστε να αντιστοιχεί σε 8 FPU/g κυτταρίνης.

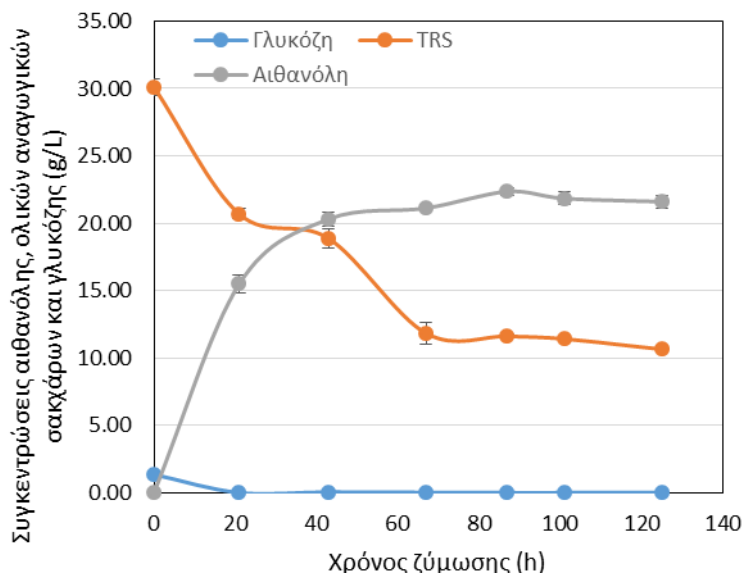
Πίνακας 34: Αναλυτικός πίνακας παρουσίασης των συγκεντρώσεων αιθανόλης, γλυκόζης και αναγωγικών σακχάρων στη χρονική εξέλιξη του πειράματος, για βιομετατροπή προκατεργασμένων ξηρών διατροφικών απορριμμάτων, με μικτή μικροβιακή καλλιέργεια του μύκητα *F. oxysporum* F3, αναπτυχθέντος αερόβια, σε ΖΣΚ και πηγή άνθρακα πίτουρο σίτου και της ζύμης *S. cerevisiae*. Πραγματοποιήθηκε προσθήκη του εξωγενώς προστιθέμενου ενζύμου, *Cellic® Cteq 2*, σε τέτοια ποσότητα ώστε να αντιστοιχεί σε 8FPU/g κυτταρίνης.

| Χρόνος ζύμωσης (h) | Αιθανόλη (g/L) | Απόδοση ¹ | Απόδοση ² | Γλυκόζη (g/L) | TRIS ³ (g/L) |
|--------------------|----------------|----------------------|----------------------|---------------|-------------------------|
| 0 | 0.00 ± 0.00 | 0.00 ± 0.00 | 0.00 ± 0.00 | 0.50 ± 0.22 | 31.90 ± 0.49 |
| 21 | 14.98 ± 0.69 | 5.47 ± 0.25 | 4.97 ± 0.23 | 0.00 ± 0.01 | 19.66 ± 1.29 |
| 43 | 20.23 ± 0.62 | 7.39 ± 0.23 | 6.71 ± 0.21 | 0.00 ± 0.02 | 18.39 ± 0.94 |
| 67 | 21.47 ± 0.56 | 7.84 ± 0.20 | 7.13 ± 0.18 | 0.07 ± 0.05 | 14.33 ± 0.92 |
| 87 | 22.38 ± 0.51 | 8.17 ± 0.19 | 7.43 ± 0.17 | 0.00 ± 0.01 | 10.94 ± 0.32 |
| 101 | 21.48 ± 0.11 | 7.84 ± 0.04 | 7.13 ± 0.04 | 0.00 ± 0.02 | 10.84 ± 0.14 |
| 125 | 21.17 ± 0.76 | 7.73 ± 0.28 | 7.03 ± 0.25 | 0.01 ± 0.00 | 11.22 ± 0.42 |

¹ Απόδοση εκφρασμένη σε g αιθανόλης/ 100g διατροφικών απορριμμάτων (FW).

² Απόδοση εκφρασμένη σε g αιθανόλης/100 g συνολικών στερεών (FW + WB)

³ TRS: Total Reducing Sugars (ολικά αναγωγικά σάκχαρα)



Διάγραμμα 22: Χρονική μεταβολή συγκέντρωσης (g/L) αιθανόλης, γλυκόζης και ολικών αναγωγικών σακχάρων κατά τη βιομετατροπή προκατεργασμένων, ξηρών διατροφικών απορριμμάτων, με μικτή μικροβιακή καλλιέργεια του μύκητα *F. oxysporum* F3, αναπτυχθέντος αερόβια, σε ΖΣΚ και πηγή άνθρακα πίτουρο σίτου και της ζύμης *S. cerevisiae*. Πραγματοποιήθηκε προσθήκη του εξωγενώς προστιθέμενου ενζύμου, *Cellic® Cteq 2*, σε τέτοια ποσότητα ώστε να αντιστοιχεί σε 10 FPU/g κυτταρίνης.

Πίνακας 35: Αναλυτικός πίνακας παρουσίασης των συγκεντρώσεων αιθανόλης, γλυκόζης και αναγωγικών σακχάρων στη χρονική εξέλιξη του πειράματος, για βιομετατροπή προκατεργασμένων ξηρών διατροφικών απορριμμάτων, με μικτή μικροβιακή καλλιέργεια του μύκητα *F. oxysporum* F3, αναπτυχθέντος αερόβια, σε ΖΣΚ και πηγή άνθρακα πίτουρο σίτου και της ζύμης *S. cerevisiae*. Πραγματοποιήθηκε προσθήκη του εξωγενώς προστιθέμενου ενζύμου, *Cellic® Cteq 2*, σε τέτοια ποσότητα ώστε να αντιστοιχεί σε 10 FPU/g κυτταρίνης.

| Χρόνος ζύμωσης (h) | Αιθανόλη (g/L) | Απόδοση ¹ | Απόδοση ² | Γλυκόζη (g/L) | TRS ³ (g/L) |
|--------------------|----------------|----------------------|----------------------|---------------|------------------------|
| 0 | 0.00 ± 0.00 | 0.00 ± 0.00 | 0.00 ± 0.00 | 1.35 ± 0.16 | 30.11 ± 0.65 |
| 21 | 15.49 ± 0.67 | 5.66 ± 0.25 | 5.14 ± 0.22 | 0.00 ± 0.01 | 20.69 ± 0.38 |
| 43 | 20.30 ± 0.54 | 7.41 ± 0.20 | 6.74 ± 0.18 | 0.05 ± 0.03 | 18.87 ± 0.70 |
| 67 | 21.12 ± 0.11 | 7.71 ± 0.04 | 7.01 ± 0.04 | 0.02 ± 0.04 | 11.83 ± 0.78 |
| 87 | 22.35 ± 0.31 | 8.16 ± 0.11 | 7.42 ± 0.10 | 0.00 ± 0.03 | 11.61 ± 0.16 |
| 101 | 21.84 ± 0.49 | 7.98 ± 0.18 | 7.25 ± 0.16 | 0.00 ± 0.04 | 11.42 ± 0.08 |
| 125 | 21.60 ± 0.50 | 7.89 ± 0.18 | 7.17 ± 0.17 | 0.02 ± 0.00 | 10.65 ± 0.13 |

¹ Απόδοση εκφρασμένη σε g αιθανόλης/ 100g διατροφικών απορριμμάτων (FW).

² Απόδοση εκφρασμένη σε g αιθανόλης/100 g συνολικών στερεών (FW + WB)

³ TRS: Total Reducing Sugars (ολικά αναγωγικά σάκχαρα)

Σε όλες τις εξετασθείσες περιπτώσεις παρατηρήθηκε αυξημένος ρυθμός παραγωγής βιαιθανόλης τις πρώτες 21 ώρες καλλιέργειας. Ο ρυθμός παραγωγής μειώνεται για το χρονικό διάστημα 21-87 ώρες (Διαγράμματα 19-22). Η συγκέντρωση της γλυκόζης κατά την έναρξη της ζύμωσης βρέθηκε σε χαμηλά επίπεδα (περίπου 1.4 g/L), ενώ δεν ανιχνεύεται γλυκόζη στο τέλος της ζύμωσης. Αναφορικά με τα ολικά αναγωγικά σάκχαρα η τιμή τους στην έναρξη της

ζύμωσης κυμαίνεται στα 30 g/L. Παρατηρείται σημαντική μείωση αυτών στις πρώτες 21 ώρες καλλιέργειας. Ο ρυθμός κατανάλωσής τους μειώνεται για το χρονικό διάστημα 21-87 ώρες (Διαγράμματα 19-22).

Οι μέγιστες επιτευχθείσες τιμές αιθανόλης συναρτήσει του προστιθέμενου ενζυμικού σκευάσματος παρουσιάζονται στον Πίνακα 36.

Πίνακας 36: Μέγιστες τιμές αιθανόλης συναρτήσει του ενζυμικού φορτίου

| Ενζυμικό φορτίο (FPU/g κυτταρί- νης) | Αιθανόλη (g/L) | Απόδοση ¹ (g/100 g FW+WB) | Απόδοση ² (g/100 g προκ. FW) | Ποσοστό επί της μέ- γιστης θεωρητικής (%) ³ |
|--|-------------------|--|---|--|
| 0 | 16.33 ± 0.63 | 5.42 ± 0.21 | 5.96 ± 0.23 | 31.78 ± 1.24 |
| 4 | 21.51 ± 0.19 | 7.85 ± 0.07 | 7.14 ± 0.06 | 41.87 ± 0.38 |
| 6 | 21.57 ± 0.61 | 7.88 ± 0.22 | 7.16 ± 0.20 | 41.99 ± 1.18 |
| 8 | 22.38 ± 0.51 | 8.17 ± 0.19 | 7.43 ± 0.17 | 43.56 ± 0.99 |
| 10 | 22.35 ± 0.31 | 8.16 ± 0.11 | 7.42 ± 0.10 | 43.51 ± 0.61 |

¹ Απόδοση εκφρασμένη σε g αιθανόλης/ 100g διατροφικών απορριμμάτων (FW).

² Απόδοση εκφρασμένη σε g αιθανόλης/100 g συνολικών στερεών (FW + WB)

³Με βάση τη μέγιστη θεωρητική απόδοση αιθανόλης από τη βιομετατροπή της κυτταρίνης ($Y_{\text{αιθανόλης/σακχάρου}}=0.511$) και της ημικυτταρίνης ($Y_{\text{αιθανόλης/σακχάρου}}=0.51$).

Η προσθήκη Cellic[®] CTec 2 βελτιώνει την παραγωγή αιθανόλης κατά περίπου 30% έναντι της χρήσης μόνο των παραγόμενων από το μύκητα *F. oxysporum* F3 ενζύμων. Δεν παρατηρείται σημαντική διαφοροποίηση στη μέγιστη παραγόμενη αιθανόλη κατά την προσθήκη 4 ή 6 FPU/g κυτταρίνης ΔΑ όπως και κατά την προσθήκη 8 ή 10 FPU/g κυτταρίνης ΔΑ.

D. ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ

Σκοπός της παρούσας διπλωματικής εργασίας ήταν η μελέτη παραμέτρων που επηρεάζουν την παραγωγή βιοαιθανόλης από ξηρά διατροφικά απορρίμματα. Τα διατροφικά απορρίμματα είναι ένα σύνθετο υλικό που αποτελείται από άμυλο, κυτταρίνη, ημικυτταρίνη, λιγνίνη, πρωτεΐνες, λιπαρά, κ.λπ. Η παραγωγή βιοαιθανόλης από το κλάσμα αμύλου και κυτταρίνης περιλαμβάνει την υδρόλυση των πολυσακχαριτών με χρήση των αμυλολυτικών και κυτταρινολυτικών ενζύμων και η προκύπτουσα γλυκόζη μπορεί να βιομετατραπεί σε αιθανόλη με χρήση ενός αιθανολοπαραγωγού μικροοργανισμού όπως η ζύμη *Saccharomyces cerevisiae*. Με τον τρόπο μένει αναξιοποίητο το κλάσμα της ημικυτταρίνης της πρώτης ύλης, εφόσον και να υδρολυθεί η ημικυτταρίνη, η ζύμη δεν έχει την ικανότητα να μεταβολίσει τις προκύπτουσες πεντόζες σε αιθανόλη. Επιπλέον η χρήση εμπορικών ενζυμικών σκευασμάτων στο στάδιο της υδρόλυσης της πρώτης ύλης συνεισφέρει σημαντικά στο συνολικό κόστος της διεργασίας. Με γνώμονα τα παραπάνω στα πλαίσια της παρούσας εργασίας, χρησιμοποιήθηκε ο μύκητας *Fusarium oxysporum* F3, ο οποίος έχει την ικανότητα να μεταβολίζει και τις πεντόζες πέραν των εξοζών προς αιθανόλη και επιπλέον να παράγει ένα ευρύ φάσμα ενζύμων για την υδρόλυση της πρώτης ύλης. Η αερόβια ανάπτυξη του μύκητα για την παραγωγή των ενζύμων πραγματοποιήθηκε σε Ζύμωση Στερεάς Κατάστασης (ΖΣΚ) χρησιμοποιώντας ως πηγές άνθρακα λιγνινοκυτταρινούχα υλικά. Η βιομετατροπή των διατροφικών απορριμμάτων σε αιθανόλη πραγματοποιήθηκε με μικτή μικροβιακή καλλιέργεια του μύκητα *F. oxysporum* F3 με τη ζύμη *S. cerevisiae* εφαρμόζοντας τη διεργασία Ταυτόχρονης Σακχαροποίησης και Ζύμωσης. Η χρήση μικτής μικροβιακής καλλιέργειας παρουσιάζει το πλεονέκτημα της άρσης της παρεμπόδισης της υδρολυτικής δράσης των ενζύμων από τα τελικά προϊόντα υδρόλυσης (σάκχαρα) γεγονός που οφείλεται στην ικανότητα της ζύμης να μεταβολίζει ταχύτατα τις εξόζες σε αιθανόλη.

Στο πρώτο μέρος της παρούσας εργασίας μελετήθηκε η παραγωγή αμυλολυτικών (α-αμυλάση, γλυκοαμυλάση) και ημικυτταρινολυτικών (ξυλανάση, β-ξυλοζιδάση) ενζύμων σε ΖΣΚ από το μύκητα *F. oxysporum* F3 χρησιμοποιώντας ως πηγές άνθρακα άχυρο σίτου, πίτυρο σίτου και άξονα σπάδικα αραβόσιτου. Οι μέγιστες τιμές ενζύμων παρατηρήθηκαν, κατά την ανάπτυξη σε υπόστρωμα πίτυρο σίτου, ήταν 221.53, 0.70, 0.11 και 17.81 U/g υποστρώματος για την ξυλανάση, β-ξυλοζιδάση, γλυκοαμυλάση και α-αμυλάση αντίστοιχα. Θα πρέπει να σημειωθεί ότι οι ενεργότητες των αμυλολυτικών ενζύμων όταν ως πηγή άνθρακα χρησιμοποιήθηκαν άχυρο σίτου και άξονας σπάδικα αραβόσιτου ήταν εξαιρετικά χαμηλότερες, γεγονός που μπορεί να αποδοθεί στην μη ύπαρξη αμύλου στις προαναφερθείσες πρώτες ύλες.

Ακολούθως εφαρμόστηκε προκατεργασία θερμού νερού παρουσία θειικού οξέος στην πρώτη ύλη. Εξετάστηκαν διάφοροι συνδυασμοί περιεκτικότητας θειικού οξέος (% β/β) και θερμοκρασίας (°C), διατηρώντας το χρόνο προκατεργασίας στις 3 ώρες. Η βιομετατροπή σε αιθανόλη των προκατεργασμένων διατροφικών απορριμμάτων πραγματοποιήθηκε με μικτή μικροβιακή καλλιέργεια του μύκητα *F. oxysporum* F3 με τη ζύμη *S. cerevisiae* εφαρμόζοντας τη διεργασία Ταυτόχρονης Σακχαροποίησης και Ζύμωσης. Οι μέγιστες παραχθείσες ενεργότητες από το αερόβιο στάδιο ανάπτυξης του μύκητα αντιστοιχούν σε ενζυμικά φορτία ίσα με 1.43 FPU/g κυτταρίνης ΔΑ, 16.67 Units α-αμυλάσης/g αμύλου ΔΑ, 0.11 Units γλυκοαμυλάσης/g αμύλου ΔΑ, 197.70 Units ξυλανάσης/g ημικυτταρίνης ΔΑ και 0.62 Units β-ξυλοζιδάσης/g ημικυτταρίνης ΔΑ. Από τα πειραματικά αποτελέσματα προκύπτει ότι στο εύρος συνθηκών που εξετάστηκαν σημαντικότερη παράμετρος είναι η θερμοκρασία. Ειδικότερα αύξηση της συγκέντρωσης του οξέος από 1% σε 3% (β/β, g H₂SO₄/100 g ξηρών ΔΑ) διατηρώντας τη θερμοκρασία προκατεργασίας στους 90°C δεν βελτιώνει την παραγόμενη αιθανόλη η οποία κυμάνθηκε στα 14 g/L. Αύξηση της θερμοκρασίας στους 100°C οδηγεί σε αύξηση της παραγόμενης αιθανόλης στα 16.33 g/L (5.96 g/100 g ξηρών ΔΑ, ή 31.78% της μέγιστης θεωρητικής

απόδοσης) για συγκέντρωση οξέος 2% (β/β). Θα πρέπει να σημειωθεί ότι όπως και στην περίπτωση των 90°C οι διακυμάνσεις στην παραγόμενη αιθανόλη με αύξηση της συγκέντρωσης του οξέος ήταν μικρές.

Προκειμένου να αυξηθεί παραγόμενη αιθανόλη στη βέλτιστη προκατεργασία (100°C, 2% (β/β) θειικό οξύ για 3 h) μελετήθηκε η επίδραση εξωγενώς προστιθέμενου κυτταρινολυτικού σκευάσματος στο στάδιο της βιομετατροπής με δεδομένο ότι ολική ενεργότητα κυτταρινασών από το αερόβιο στάδιο ανάπτυξης του μύκητα είναι χαμηλή. Η προσθήκη Cellic® CTec 2 (εμπορικού σκευάσματος της εταιρείας Novozymes) σε φορτία 4-10 FPU/ g κυτταρίνης ΔΑ (συνολικό φορτίο 5.43-11.43 FPU/ g κυτταρίνης ΔΑ) οδηγεί σε βελτίωση της παραγόμενης αιθανόλης. Η προσθήκη 8 FPU/g κυτταρίνης ΔΑ αυξάνει τη συγκέντρωση της αιθανόλης στα 22.38 g/L, τιμή που αντιστοιχεί στο 43.56% της μέγιστης θεωρητικής απόδοσης.

Τα αποτελέσματα της παρούσας μελέτης είναι σχετικά χαμηλά συγκρινόμενα με αντίστοιχα της διεθνούς βιβλιογραφίας (Πίνακας 35). Για τη βιομετατροπή των διατροφικών απορριμμάτων σε αιθανόλη, έχουν εφαρμοστεί διάφορες διεργασίες, με κυριότερες, τη διακριτή υδρόλυση και ζύμωση (SHF) και την ταυτόχρονη σακχαροποίηση και ζύμωση (SSF).

Οι Moon et al. (2009) αναφέρουν παραγωγή αιθανόλης ύψους 29.1 g/L από διατροφικά απορρίμματα τα οποία προήλθαν από τοπική καφετέρια και χωρίστηκαν σε τέσσερις κατηγορίες (λαχανικά, σπόροι, κρέας και φρούτα) προσεγγίζοντας τη μέση σύσταση των διατροφικών απορριμμάτων που προέρχονται από σπίτια και κουζίνες, με εφαρμογή διεργασίας SHF. Τα απορρίμματα υδρολύθηκαν με τη χρήση αμυλογλυκοζιδάσης, και carbohydrase,.

Ελαφρώς μεγαλύτερη απόδοση πέτυχαν οι Uncu και Cekmecelioglu (2011) μελετώντας διαφορετικούς συνδυασμούς φορτίου του στερεού, όγκου του εμβολίου και του χρόνου της ζύμωσης, με εφαρμογή διεργασίας SHF. Επιτεύχθηκε μέγιστη συγκέντρωση αιθανόλης ίση με 32.2 g/L, με 20% (β/ο) φορτίου του στερεού. Για την υδρόλυση χρησιμοποιήθηκε η α-αμυλάση σε πρώτο στάδιο για την ρευστοποίηση του αμυλούχου απορρίμματος στους 95°C, ακολουθούμενη από προσθήκη αμυλογλυκοζιδάσης, κυτταρινάσης και β-γλυκοζιδάσης στους 55°C.

Οι Cekmecelioglu Uncu (2013) μελέτησαν την επίδραση της προκατεργασίας, της ενζυμικής υδρόλυσης αλλά και της προσθήκης θρεπτικών ουσιών στα απορρίμματα τροφίμων για την παραγωγή αιθανόλης. Χρησιμοποιώντας το *S.cerevisiae* από ξηρή ζύμη αρτοποιίας στο στάδιο της ζύμωσης, και τα ένζυμα α-αμυλάση, αμυλογλυκοζιδάση, κυτταρίναση και β-γλυκοζιδάση, στο στάδιο της υδρόλυσης, βρέθηκε, ότι η μέγιστη συγκέντρωση αιθανόλης αντιστοιχεί στα 23.3 g/L. Η τιμή αυτή προέκυψε χωρίς την προσθήκη θρεπτικών ουσιών αλλά και από διατροφικά απορρίμματα που δεν είχαν υποστεί προκατεργασία.

Οι Yan et al. (2012) πραγματοποίησαν υδρόλυση διατροφικών απορριμμάτων χρησιμοποιώντας α-αμυλάση, κυτταρινάση και γλυκοαμυλάση και παραγωγή αιθανόλης από το συμπυκνωμένο υδρόλυμα, χρησιμοποιώντας κύτταρα της ζύμης *S.cerevisiae* (CGMCC 2982) ακινητοποιημένα σε μίσχους καλαμποκιού. Η χρήση ακινητοποιημένων κυττάρων έχει το πλεονέκτημα της μεγαλύτερης ταχύτητας αντίδρασης, εξαιτίας της μεγαλύτερης κυτταρικής πυκνότητας, αυξημένων αποδόσεων και αρκετών κύκλων ζύμωσης. Έτσι, από συμπυκνωμένο υδρόλυμα, τελικής συγκέντρωσης σακχάρων 202.64 g/L, επιτεύχθηκε η βέλτιστη συγκέντρωση αιθανόλης των 82.23 g/L στις 60h ζύμωσης.

Πίνακας 35: Παραγωγή βιοαιθανόλης από διατροφικά απορρίμματα.

| Μικροοργανισμός | Διεργασία | Χρησιμοποιούμενα ένζυμα | Αιθανόλη (g/L) | Απόδοση (g/100 g dry FW) | Αναφορά |
|---|---|--|----------------|--------------------------|----------------------------|
| <i>Saccharomyces cerevisiae</i> | SHF | GA, carbohydrase ¹ | 29.1 | 23.0 | Moon et al., 2009 |
| <i>S. cerevisiae</i> (dry baker's yeast) | SHF | α-αμυλάση, GA, κυτταρινάσες, β-γλυκοζιδάση | 32.2 | 16.0 | Uncu & Cekmecelioglu, 2011 |
| <i>S. cerevisiae</i> CGMCC 2982 | SHF ² | GA, α-αμυλάση | 82.2 | Δ.Α. | Yan et al., 2012 |
| <i>S. cerevisiae</i> (dry baker's yeast) | SHF | α-αμυλάση, GA, κυτταρινάσες, β-γλυκοζιδάση | 23.3 | Δ.Α. | Cekmecelioglu & Uncu 2013 |
| <i>S. cerevisiae</i> (dry baker's yeast) | SHF | Κυτταρινάσες, β-γλυκοζιδάση | 43.0 | 11.0 | Matsakas et al., 2014 |
| <i>S. cerevisiae</i> (dry baker's yeast) | SHF | Ακατέργαστο Ενζυμικό Σκεύασμα ³ | 58.0 | 33.0 | Kiran & Liu, 2015 |
| <i>Zymomonas mobilis</i> 10225 | SSF | GA, πρωτεάση | 53.4 | Δ.Α. | Wa et al., 2008 |
| <i>S. cerevisiae</i> | SSF | GA | 33.0 | 23.0 | Wang et al., 2008 |
| <i>S. cerevisiae</i> KCCM No 50549 | SSF | GA, α-αμυλάση, πρωτεάση | 36.0 | Δ.Α. | Hong & Yoon, 2011 |
| <i>S. cerevisiae</i> | SSF ⁴ | Carbohydrase | 20.0 | 20.0 | Kim et al., 2011 |
| <i>S. cerevisiae</i> (dry baker's yeast) | NSSF ⁵ ημιδιαλείποντος έργου | GA, κυτταρινάσες | 53.9 | 14.87 | Loizidou et al., 2017 |
| <i>S. cerevisiae</i> (dry baker's yeast) + <i>Fusarium oxysporum</i> F3 | SSF | Ακατέργαστο Ενζυμικό Σκεύασμα ⁶ | 22.38 | 8.17 | Παρούσα εργασία |

GA: γλυκοαμυλάση, Δ.Α.: Δεν Αναφέρεται, ¹ Carbohydrase, μίγμα κυτταρινολυτικών και ημικυτταρινολυτικών ενζύμων που έχουν παραχθεί από το μύκητα *Aspergillus aculeatus*, ² συμπυκνωμένο υδρόλυμα τελικής συγκέντρωσης σακχάρων 202.64 g/L, ³ ακατέργαστο ενζυμικό σκεύασμα που έχει παραχθεί με ΖΣΚ από το μύκητα *A. awamori*, ⁴SSF συνεχούς έργου, ⁵NSSF: Non Isothermal Simultaneous Saccharification and Fermentation-Μη ισοθερμοκρασιακή ταυτόχρονη σακχαροποίηση και ζύμωση, τα πειράματα πραγματοποιήθηκαν σε πιλοτική εγκατάσταση, ⁶ακατέργαστο ενζυμικό σκεύασμα που έχει παραχθεί με ΖΣΚ από το μύκητα *F. oxysporum* F3

Οι Kiran et al. (2015) μελέτησαν την παραγωγή υδρολυτικών ενζύμων (γλυκοαμυλάση, α-αμυλάση, κυτταρινάση, ξυλανάση, β-γλυκοζιδάση και πρωτεάση) με ΖΣΚ χρησιμοποιώντας το μύκητα *A. awamori*. Τα παραχθέντα ένζυμα μαζί με την κυτταρική μάζα του μύκητα χρησιμοποιήθηκαν για την υδρόλυση αποβλήτων αρτοποιίας. Η ζύμωση του προκύπτοντος υδρολύματος οδήγησε σε παραγωγή αιθανόλης ύψους 58 g/L μετά από 32 ώρες αλκοολικής ζύμωσης.

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 και με τη βοήθεια του ζυμομύκητα *Saccharomyces cerevisiae*, παρήγαγαν αιθανόλη συγκέντρωσης 33.05 g/L.

Οι Hong και Yoon (2011) χρησιμοποίησαν μίγμα αμυλογλυκοζιδάσης, α-αμυλάσης και πρωτεάσης και τη ζύμη *S.cerevisiae* για τη μετατροπή απορρίμματα τροφίμων σε αιθανόλη με εφαρμογή διεργασίας SSF. Μετά από 48 ώρες ζύμωσης παρήχθησαν 36g/L αιθανόλης.

Οι Koike et al. (2009) εφάρμοσαν επαναλαμβανόμενη διεργασία SSF διαλείποντος έργου, απομακρύνοντας, κάθε φορά, το 80% του πολτοποιημένου υλικού, που είχε υποστεί ζύμωση. Χρησιμοποιώντας απορρίμματα κυλικείου, πέτυχαν συγκέντρωση αιθανόλης, της τάξης των 44 g/L, με την απόδοση να φτάνει το 81.3%.

Τέλος οι Loizidou et al., (2017) αναφέρουν παραγωγή αιθανόλης ύψους 58 g/L εφαρμόζοντας μη ισοθερμοκρασιακή σακχαροποίηση και ζύμωση (NSFF) ημιδιαλείποντος έργου, με χρήση κυτταρινολυτικού εμπορικού σκευάσματος και γλυκοαμυλάσης και της ζύμης *S. cerevisiae* σε αντιδραστήρα πιλοτικής κλίμακας.

Συμπερασματικά τα διατροφικά απορρίμματα είναι κατάλληλα για χρήση ως πρώτη ύλη στην παραγωγή βιοαιθανόλης, καθώς διαθέτουν υψηλά ποσοστά περιεχόμενων ζυμώσιμων σακχάρων. Οι διαφοροποιήσεις μεταξύ των μέγιστων τιμών παραγόμενης αιθανόλης που παρατηρούνται (Πίνακας 35) οφείλονται στις διαφορές στην σύσταση της πρώτης ύλης, κάτι που εξαρτάται από την περιοχή προέλευσής του αλλά και από την εποχή, στο είδος της διεργασίας που εφαρμόζεται (SHF, SSF, διαλείποντος, ημιδιαλείποντος, συνεχούς έργου), στο ενζυμικό φορτίο που χρησιμοποιείται στο στάδιο της υδρόλυσης αλλά και στο είδος των ενζύμων. Θα πρέπει να σημειωθεί ότι το ενζυμικό φορτίο των αμυλολυτικών ενζύμων και ειδικότερα της γλυκοαμυλάσης που χρησιμοποιήθηκε στην παρούσα εργασία είναι πολύ χαμηλότερο αυτών που αναφέρονται στη βιβλιογραφία. Ενίσχυση λοιπόν του φορτίου της γλυκοαμυλάσης, είτε βελτιώνοντας την παραγωγή της γλυκοαμυλάσης από το μύκητα *F. oxysporum* F3 ή προσθέτοντας εμπορικό σκεύασμα με μπορεί να βελτιώσει τις αποδόσεις τις διεργασίας.

Ε.ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

- [1] AOAC Official Method 994.09: *Glucoamylase Activity in Industrial Enzyme Preparations*. 1994
- [2] Alamanou D.G., Malamis D., Mamma D., Kekos D.: *Bioethanol from Dried Household Food Waste Applying Non-isothermal Simultaneous Saccharification and Fermentation at High Substrate Concentration*. *Waste Biomass Valor* (2015).
- [3] Amin F.R., Khalid H., Zhang H., Rahman S., Zhang R., Liu G., Chen C.: *Pretreatment methods of lignocellulosic biomass for anaerobic digestion*. *AMB Express* (2017).
- [4] Amore A., Faraco V.: *Potential of fungi as category I Consolidated BioProcessing organisms for cellulosic ethanol production*. *Renewable and Sustainable Energy Reviews* 16, 3286-3301 (2012).
- [5] Arapoglu D., Varzakas Th., Vlyssides A., Israilides C.: *Ethanol production from potato peel waste (PPW)*. *Waste management* 30, 1898-1902 (2010).
- [6] Bai F.W., Anderson W.A., Moo-Yoong M.: *Ethanol fermentation technologies from sugar and starch feedstocks*. *Biotechnology Advances* 26(1), 89-105 (2008).
- [7] Ballesteros M., Sáez F., Ballesteros I., Manzanares P., Negro M.J., Martinez J.M., Custañeda R., Dominguez J.M.O.: *Ethanol Production from the Organic Fraction Obtained After Thermal Pretreatment of Municipal Solid Waste*. *Appl Biochem Bioethanol* 161, 423-431 (2010).
- [8] Bals B., Rogers C., Jin M., Balan V., Dale B.: *Evaluation of ammonia fibre expansion (AFEX) pretreatment for enzymatic hydrolysis of switchgrass harvested in different seasons and locations*. *Biotechnology for Biofuels* 3:1 (2010).
- [9] Canabarro N.I., Alession C., Foletto E.L., Kuhn R.C., Priamo W.L., Mazutti M.A.: *Ethanol production by solid state saccharification and fermentation in a packed-bed bioreactor*. *Renewable Energy* 102 (Part A), 9-14 (2017).
- [10] Cekmecelioglu D., Uncu O.N.: *Kinetic modelling of enzymatic hydrolysis of pretreated kitchen wastes for enhancing bioethanol production*. *Waste management* 33, 735-739 (2013).
- [11] Conde-Mejía C., Jiménez-Gutiérrez A., El-Halwagi M.: *A comparison of pretreatment methods for bioethanol production from lignocellulosic materials*. *Process Safety and Environmental Protection* 90(3), 189-202 (2012).
- [12] Dimarogona M., Topakas E., Christakopoulos P.: *Cellulose degradation by oxidative enzymes*. *Computational and Structural Biotechnology Journal*, 2(3) (2012). (e201209015, DOI : <http://dx.doi.org/10.5936/csbj.201209015>)
- [13] Ezeilo U.R., Zakaria I.I., Huyop F., Wahab R.A.: *Enzymatic breakdown of lignocellulosic biomass: the role of glycosyl hydrolases and lytic polysaccharide monoxygenases*, *Biotechnology & Biotechnological Equipment*, 31:4, 647-662, (2017) (DOI: 10.1080/13102818.2017.1330124)
- [14] Farinas C.S.: *Developments in solid-state fermentation for the production of biomass-degrading enzymes for the bioenergy sector*. *Renewable and Sustainable Energy Reviews* 52, 179-188 (2015).

- [15] Ho D.P., Ngo H.H., Guo W.: *A mini review on renewable sources for biofuel*. *Bioresource Technology* 169, 742-749 (2014).
- [16] Hong Y.S., Yoon H.H.: *Ethanol production from food residues*. *Biomass and Bioenergy* 35, 2371-3275 (2011).
- [17] Independent Statistics and Analysis, U.S. Energy Information Administration.
- [18] Kang Q., Appels L., Tan T., Dewil R. *Bioethanol from Lignocellulosic Biomass: Current Findings Determine Research Priorities*. Hindawi (2014).
- [19] Kim, J.H., Lee, J.C., Pak, D.: *Feasibility of producing ethanol from food waste*. *Waste Manage.* 31, 2121-2125 (2011)
- [20] Kim J K., Oh B. R., Shin H.J., Eom C.Y., Kim S.W.: *Statistical optimization of enzymatic saccharification and ethanol fermentation using food waste*. *Process Biochemistry* 43, 1308-1312 (2008).
- [21] Kiran E.U., Liu Y.: *Bioethanol production from mixed food waste by an effective enzymatic pretreatment*. *Fuel* 159, 463-469 (2015).
- [22] Kiran E.U., Trzcinski A.P., Liu Y.: *Glucoamylase production from food waste by solid state fermentation and its evaluation in the hydrolysis of domestic food waste*. *Biofuel Research Journal* 1(3), 98-105 (2014).
- [23] Kiran E.U., Trzcinski A.P., Ng W.J., Liu U.: *Bioconversion of food waste to energy: A review*. *Fuel* 134, 389-399 (2014).
- [24] Koike Y., An M.Z., Tang Y.Q., Syo T, Osaka N., Morimura S., Kida K.: *Production of fuel ethanol and methane from garbage by high-efficiency two-stage fermentation process*. *Journal of Bioscience and Bioengineering* 108(6), 508-512 (2009).
- [25] Lenihan P., Orozco A., O'Neill E., Ahmad M.N.M., Rooney D.W., Walker G.M.: *Dilute acid hydrolysis of lignocellulosic biomass*. *Chemical Engineering Journal* 156(2), 395-403 (2010).
- [26] Li H., Tian Y., Zuo W., Zhang J., Pan X., Li L., Su X.: *Electricity generation from food wastes and characteristics of organic matters in microbial fuel cell*. *Bioresource Technology* 205, 104-110 (2016).
- [27] Loizidou, M., Alamanou, D.G., Sotiropoulos, A., Lytras, C., Mamma, D., Malamis, D., Kekos, D.: *Pilot Scale System of Two Horizontal Rotating Bioreactors for Bioethanol Production from Household Food Waste at High Solid Concentrations*. *Waste Biomass Valor.* 8(5), 1709-1719 (2017).
- [28] Luque R., Clark J.H.: *Valorisation of food residues: waste to wealth using green chemical technologies*. *Sustainable Chemical Processes* 1:10 (2013).
- [29] Ma, H., Wang, Q., Zhang, W., Xu, W., Zhou, D.: *Optimization of the medium and process parameters for ethanol production from kitchen garbage by Zymomonas mobilis*. *Int. J. Green Energy* 5, 480-490 (2008).
- [30] Maitan-Alfenas G.P., Visser E.M., Guimarães V.M.: *Enzymatic hydrolysis of lignocellulosic biomass: converting food waste in valuable products*. *Current Opinion in Food Science*, Volume 1, 44-49 (2015).

- [31] Matsakas, L., Kekos, D., Loizidou, M., Christakopoulos, P.: Utilization of household food waste for the production of ethanol at high dry material content. *Biotechnol. Biofuels* 7, 4 (2014) (DOI: 10.1186/1754-6834-7-4).
- [32] 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*. *Int. J. Energy Res.* 33, 164-172 (2009) (DOI:10.002/er.1432).
- [33] Olofsson K., Bertilsson M., Lidén G.: *A short review on SSF-an interesting process option for ethanol production from lignocellulosic feedstocks*. *Biotechnol. Biofuels* 1:7 (2008) (DOI: 10.1186/1754-6384-1-7).
- [34] Pfaltzgraff L. A., De Bruyn M., Cooper E.C., Budarin V., Clark J.H.: *Food waste biomass: a resource for high-value chemicals*. *Green Chemistry* (2013) (DOI: 10.1039/C2GC36978H).
- [35] Pham T.P.T., Kaushik R., Parshetti G.K., Mahmood R., Balasubramanian R.: *Food waste-to-energy conversion technologies: Current status and future directions*. *Waste management* 38, 399-408 (2015).
- [36] Sanjib Kumar Karmee, *Liquid biofuels from food waste: Current trends, prospect and limitation*, *Renewable and Sustainable Energy Reviews* 53 (2016) 945–953
- [37] Singh J., Suhag M., Dhaka A.: *Augmented digestion of lignocellulose by steam explosion, acid and alkaline pretreatment methods: A review*. *Carbohydrate Polymers* 117, 624-631 (2015).
- [38] Soccol C.R, Ferreira da Costa E.S., Letti L.A.J., Karp S.G., Woiciechowski A.L., Vandenberghe P.S.: *Recent developments and innovations in solid-state fermentation*. *Biotechnology Research and Innovation* (2017) (DOI:10.1016/j.biori.2017.01.002).
- [39] Sun Y., Cheng J.: *Hydrolysis of lignocellulosic materials for ethanol production: A review*. *Bioresource Technology* 83(1), 1-11 (2002).
- [40] Uncu O.N., Cekmecelioglu D. *Cost-effective approach to ethanol production and optimization by response surface methodology*. *Waste management* 31, 636-643 (2011).
- [41] U.S. Department of Energy. *Fuels and Vehicles*
- [42] Wang, Q., Ma, H., Xu, W., Gong, L., Zhang, W., Zou, D.: *Ethanol production from kitchen garbage using response surface methodology*. *Biochem. Eng. J.* 39, 604-610 (2008)
- [43] Yan. S., Chen X., Wu J., Wang P.: *Ethanol production from concentrated food waste hydrolysates with yeast cells immobilized on corn stalk*. *Appl Microbiol Bioethanol* 829-838 (2012) (DOI: 10.1007/s00253-012-3990-7).
- [44] Yan S., Li J., Chen X., Wu J., Wang P., Ye J., Yao J.: *Enzymatical hydrolysis of food waste and ethanol production from the hydrolysate*. *Renewable Energy* 36, 1259-1265 (2011).
- [45] Zhang K., Pei Z., Wang D.: *Organic solvent pretreatment of lignocellulosic biomass for biofuels and biochemicals: A review*. *Bioresource Technology* 199, 21-33 (2016).

- [46] Zhang Y., Wang L., Chen H.: *Correlations of medium physical properties and process performance in solid-state fermentation*. Chemical Engineering Science 165, 65-73 (2017).
- [47] Χριστακόπουλος Π., Τόπακας Ε.: *Βιοτεχνολογική Παραγωγή Βιοκαυσίμων* (2015)