



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

ΔΙΠΛΩΜΑΤΙΚΗ ΕΡΓΑΣΙΑ:

**ΠΑΡΑΓΩΓΗ ΒΙΟΑΙΘΑΝΟΛΗΣ ΑΠΟ ΔΙΑΤΡΟΦΙΚΑ ΑΠΟΡΡΙΜΜΑΤΑ ΜΕ ΤΗ
ΧΡΗΣΗ ΜΟΝΟΚΑΛΛΙΕΡΓΕΙΑΣ ΤΟΥ ΜΥΚΗΤΑ FUSARIUM OXYSPORUM**



ΓΙΩΡΓΟΣ ΠΡΑΣΟΥΛΑΣ

Επιβλέπων Καθηγητής: Δημήτρης Κέκος

Αθήνα

2018

Πρόλογος

Βρίσκομαι στην ευχάριστη θέση να προλογίζω την διπλωματική μου εργασία η οποία πραγματοποιήθηκε στο πλαίσιο της ολοκλήρωσης των προπτυχιακών σπουδών μου, στο εργαστήριο Βιοτεχνολογίας της Σχολής Χημικών Μηχανικών του Εθνικού Μετσόβιου Πολυτεχνείου.

Εκφράζεται βαθιά ευγνωμοσύνη και θερμές ευχαριστίες σε όλους όσους συνέβαλαν στην πραγματοποίηση αυτής της εργασίας. Αρχικά, στον επιβλέποντα Καθηγητή κ. Δημήτρη Κέκο για την ανάθεση της διπλωματικής εργασίας, και φυσικά στη Δρ. Διομή Μαμμά για το ενδιαφέρον που υπέδειξε και την ουσιαστική υποστήριξή της κατά τη διάρκεια της εργασίας. Επίσης, χρωστάω ένα ευχαριστώ στη Δρ. Στέλλα Καλαντζή που με βοήθησε και αυτή στην εκπόνηση της παρούσας εργασίας.

Τέλος, θέλω να ευχαριστήσω την οικογένεια και τους φίλους μου, για την ηθική συμπαράσταση και υποστήριξη τους.

Πρασούλας Γιώργος

Περιεχόμενα

Abstract.....	6
A. ΘΕΩΡΗΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ	7
1.Εισαγωγή.....	8
2.Βιοαιθανόλη	8
3.Διατροφικά απορρίματα	12
3.1Δομή συστατικών διατροφικών απορριμμάτων	14
3.1.1 Κυτταρίνη.....	14
3.1.2 Ημικυτταρίνη	15
3.1.3 Λιγνίνη.....	16
3.1.4 Άμυλο.....	16
4.Παραγωγή αιθανόλης.....	17
4.1 Μέθοδοι προκατεργασίας.....	20
4.1.1 Στόχοι προεπεξεργασίας	20
4.1.2 Φυσικές μέθοδοι	21
4.1.3 Φυσικοχημικές μέθοδοι	21
4.1.4 Χημικές μέθοδοι	23
4.2 Υδρόλυση υδατανθράκων για την παραγωγή σακχάρων	26
4.3 Ζύμωση στερεάς κατάστασης (ΖΣΚ) για την παραγωγή ενζύμων	29
4.4 Αλκοολική ζύμωση	31
4.5 Μικροοργανισμοί για την παραγωγή βιοαιθανόλης	34
4.5.1 <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	34
4.5.2 <i>Fusarium oxysporum</i>	35
B. ΜΕΘΟΔΟΙ ΚΑΙ ΥΛΙΚΑ	37
1.Όργανα.....	38
2. Πρώτη ύλη – Χημικά αντιδραστήρια	38

3. Προκατεργασία.....	39
4. Μικροοργανισμοί	39
5. Αερόβια ανάπτυξη του μύκητα <i>F. oxysporum</i> F3	39
6. Αλκοολική ζύμωση.....	40
7. Εκχύλιση ενζύμων.....	41
8. Ενζυμική υδρόλυση	41
9. Προσδιορισμός ολικών αναγωγικών σακχάρων	41
10. Προσδιορισμός συγκέντρωσης γλυκόζης με τη χρήση ειδικού εμπορικού διαγνωστικού σκευάσματος (kit)	42
11. Μέτρηση ενεργότητας ενζύμων	43
12. Μέτρηση αιθανόλης.....	44
13. Ανάλυση σύστασης στερεού υπολείμματος ζύμωσης.....	44
13.1 Ανάκτηση στερεού υπολείμματος ζύμωσης (NREL/TP-510-42618)	44
13.2 Προσδιορισμός κυτταρίνης/ημικυτταρίνης	44
13.3 Προσδιορισμός αμύλου.....	44
Γ.ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ	46
1. Παραγωγή κυτταρινολυτικών ενζύμων από το μύκητα <i>F. oxysporum</i> F3 με ζύμωση στερεάς κατάστασης.....	47
2. Επίδραση της προκατεργασίας στην παραγωγή βιοαιθανόλης	53
3. Επίδραση του εξωγενώς προστιθέμενου ενζυμικού σκευάσματος Spirizyme® Fuel	
3.1 Ενζυμική υδρόλυση	62
3.2 Αλκοολική ζύμωση.....	65
4. Επίδραση του εξωγενούς προστιθέμενου ενζυμικού σκευάσματος Cellic® CTec2	
Δ.ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ	79
Ε.ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ.....	83

Περίληψη

Δεδομένων των οικονομικών και περιβαλλοντικών συνθηκών, η ανάγκη για αξιοποίηση των βιοαποβλήτων είναι μεγάλη. Τα διατροφικά απορρίμματα, ένα απόβλητο που περιέχει υψηλές συγκεντρώσεις κυτταρίνης, ημικυτταρίνης και αμύλου, μπορούν να διατεθούν για την παραγωγή αιθανόλης. Στην παρούσα εργασία μελετήθηκαν οι παράγοντες που επηρεάζουν την παραγωγή αιθανόλης από ξηρά διατροφικά απορρίμματα. 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).

Για την παραγωγή αιθανόλης χρησιμοποιήθηκε μονοκαλλιέργεια του μύκητα *F. oxysporum* F3 αλλά και μικτή καλλιέργεια με τη ζύμη *S. Cerevisiae*. Ο μύκητας *F. oxysporum* F3 έχει τη δυνατότητα να καταναλώνει και πεντόζες εκτός από εξόζες για τη βιομετατροπή τους σε αιθανόλη, αλλά και να παράγει ένζυμα που υδρολύουν τους πολυσακχαρίτες των διατροφικών απορριμάτων σε άμεσα μεταβολίσιμα σάκχαρα.

Αρχικά εξετάστηκε η επίδραση της προκατεργασίας θερμού νερού για 3 ώρες, σε θερμοκρασίες 90° C και 100° C , παρουσία θειικού οξέος σε συγκεντρώσεις 1,2 και 3 % β/β / 100g ξηρών διατροφικών απορριμάτων. Διαπιστώθηκε ότι καθοριστικό παράγοντα έχει η τιμή της θερμοκρασίας και όχι η συγκέντρωση του οξέως, με την μέγιστη συγκέντρωση παραγόμενης αιθανόλης να φτάνει τα 20,58 g/ L (7,51 g/100 g ΔΑ ή 37,13 % της μέγιστης θεωρητικής τιμής) στις συνθήκες 100° C / 2% β/β θειικό οξύ. Η προσθήκη εξωγενούς ενζυμικού σκευάσματος γλυκοαμυλάσης σε ζύμωση με μικτή καλλιέργεια, αύξησε την τιμή της αιθανόλης στα 30,86 g/L (11,33 g/100 g ΔΑ ή 55,36 % της μέγιστης θεωρητικής τιμής).

Abstract

Given the economic and environmental conditions, the need to make use of bio-waste is urgent. Food waste, a material containing high concentrations of cellulose, hemicellulose and starch, can be used to produce ethanol. In this paper the factors that influence the production of ethanol from dry food waste, were studied. Food waste, which was used to carry out experiments in this paper contained, cellulose (10.31% w / w), hemicellulose (11.32%, w / w), protein (13.70% w / w), sucrose (0.57% w / w) and fat (12.26%, w / w).

For bioethanol production, monoculture of *F. oxysporum* F3 was used as well as mixed culture with *S. cerevisiae* yeast. The fungus *F. oxysporum* F3 has the potential to consume pentoses besides hexoses for their biotransformation into ethanol, but also to produce enzymes that hydrolyse food polysaccharides to directly metabolizable sugars.

Initially, the effect of hot water pretreatment for 3 hours was studied at temperatures of 90 ° C and 100 ° C in the presence of sulfuric acid at concentrations of 1,2 and 3% w/w per 100 g of dry food waste. It was found that the temperature rather than the concentration of the acid is decisive for ethanol production, with the maximum concentration of ethanol produced reaching 20,58 g/L (7,51 g/100 g FW or 37,13 % of the maximum theoretical value) under 100° C / 2 % w/w sulfuric acid conditions. The addition of an exogenous glucoamylase enzyme to a mixed culture fermentation increased the value of ethanol to 30.86 g/L (11,33 g/100 g FW or 55,36% of the maximum theoretical value).

A. ΘΕΩΡΗΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ

1.Εισαγωγή

Οι βιομηχανικές και κοινωνικές εξελίξεις του 20ού αιώνα έχουν διαμορφωθεί σε μεγάλο βαθμό από τη βιομηχανία πετροχημικών. Ο συνεχώς αυξανόμενος ρυθμός εξερεύνησης και εκμετάλλευσης των αποθεμάτων πετρελαίου έχει εξασφαλίσει για μεγάλο χρονικό διάστημα μια άφθονη και φθηνή πρώτη ύλη για την παραγωγή χημικών ουσιών καθώς και καυσίμων μεταφορών. Στις αρχές του 21ου αιώνα, διάφοροι παράγοντες συμβάλλουν στη δημιουργία επείγουσας ανάγκης για εναλλακτικές λύσεις σε μια οικονομία που εξαρτάται κατά κύριο λόγο από τους ορυκτούς πόρους. Την τελευταία δεκαετία ο ρυθμός ανακάλυψης νέων ορυκτών πόρων έπαψε να ταιριάζει ή να υπερβαίνει παγκόσμιο ποσοστό κατανάλωσης πετρελαίου (Greene et al., 2002). Ως αποτέλεσμα, είναι σαφές ότι η κατανάλωση πετρελαίου δεν μπορεί να συνεχιστεί επ'αόριστον με τον τρέχοντα ρυθμό της. Η συνειδητοποίηση αυτή ενισχύεται από το γεγονός ότι η συγκέντρωση του CO₂ στην ατμόσφαιρα αυξάνεται σταθερά, με έντονη επιτάχυνση από το δεύτερο μισό του 20ου αιώνα. Υπάρχει ισχυρή και αυξανόμενη ανησυχία ότι τα αυξημένα επίπεδα CO₂ επηρεάζουν το παγκόσμιο κλίμα μέσω του γνωστού «φαινομένου του θερμοκηπίου» (Khandekar et al., 2005). Οι μακροπρόθεσμες οικονομικές και περιβαλλοντικές ανησυχίες, λοιπόν, έχουν οδηγήσει τις τελευταίες δεκαετίες, σε έρευνες που σχετίζονται με ανανεώσιμες πηγές υγρών καυσίμων, με σκοπό την αντικατάσταση των ορυκτών. Τα μειονεκτήματα στις μεταφορές που προέρχονται από τα ορυκτά καύσιμα (εκπομπές αερίων θερμοκηπίου, ρύπανση, εξάντληση πόρων, μη ισορροπημένη σχέση προσφοράς- ζήτησης) μειώνονται έντονα ή και απουσιάζουν με τη χρήση βιοκαυσίμων [1,2].

2.Βιοαιθανόλη

Η βιομηχανική αιθανόλη παράγεται κυρίως πετροχημικά μέσω της καταλυόμενης με οξύ ενυδατώσεως αιθυλενίου. Η αιθανόλη που χρησιμοποιείται σε αλκοολούχα ποτά και η μεγάλη πλειοψηφία αιθανόλης για χρήση ως βιοκαύσιμο παράγεται με ζύμωση όπου ορισμένα είδη ζυμομυκήτων (π.χ. *Saccharomyces cerevisiae*) ή βακτήρια (π.χ. , *Zygomonas mobilis*) μεταβολίζουν τα σάκχαρα για να

παράγουν αιθανόλη και διοξείδιο του άνθρακα. Οι κυριότεροι λόγοι για να αναπτυχθεί η παραγωγή της βιοαιθανόλης είναι η χρήση της ως ευνοϊκού και σχεδόν ανανεώσιμου καυσίμου, μειώνοντας έτσι τις εκπομπές CO₂ και τις σχετικές κλιματικές αλλαγές, η χρήση της ως ενισχυτή οκτανίων στην αμόλυβδη βενζίνη και η χρήση της ως οξυγονωμένο μίγμα καυσίμου για καθαρότερη καύση βενζίνης, μειώνοντας έτσι τις εκπομπές ρυπογόνων ουσιών και κατά συνέπεια βελτιώνοντας την ποιότητα του ατμοσφαιρικού αέρα.

Η βιοαιθανόλη παράγεται ήδη σε εύλογη κλίμακα (περίπου 14-26 Mtn παγκοσμίως [3,4]) και είναι δυνατόν να χρησιμοποιηθεί, σε ανάμιξη με βενζίνη, στις μηχανές εσωτερικής καύσης που διαθέτουν τα σημερινά οχήματα. Η αιθανόλη χρησιμοποιείται ήδη, συνήθως σε μείγμα βενζίνης/αιθανόλης 90% / 10%. Ορισμένες μηχανές εσωτερικής καύσης μπορούν να χρησιμοποιήσουν μίγμα 85% αιθανόλης / 15% βενζίνης (E85) ή ακόμα και 95% αιθανόλη (E95). Η προσθήκη αιθανόλης αυξάνει τον αριθμό οκτανίου του καυσίμου, ενώ παράλληλα συμβάλλει στη μείωση των εκπομπών μονοξειδίου του άνθρακα, πτητικών οργανικών ενώσεων και σωματιδίων βενζίνης [5].

Περίπου το 90% της βιοαιθανόλης παράγεται από τη ζάχαρη ή τις καλλιέργειες με υψηλή περιεκτικότητα σε άμυλο, μέσω ζύμωση. Το υπόλοιπο περίπου 10% παράγεται συνθετικά [4]. Το μεγαλύτερο μέρος της παραγωγής και κατανάλωσης βρίσκεται στη Βραζιλία και τις ΗΠΑ. Περίπου το 67% της παραγωγής χρησιμοποιείται ως καύσιμα σε οχήματα, ενώ το υπόλοιπο χρησιμοποιείται στη βιομηχανία τροφίμων. Στον παρακάτω πίνακα φαίνεται η παραγωγή βιοαιθανόλης σε διάφορες χώρες από το 2014 ως το 2016.

Παγκόσμια Κατάταξη	Χώρα	2016	2015	2014
1	Η.Π.Α.	15,330	14,806	14,300
2	Βραζιλία	7,295	7,093	6,190
3	Ε.Ε.	1,377	1,387	1445
4	Κίνα	845	813	635
5	Καναδάς	436	436	510
6	Ταϊλάνδη	322	334	310
7	Αργεντινή	264	211	160
8	Ινδία	225	211	155
*	Υπόλοιπος κόσμος	490	391	865
	Παγκόσμια παραγωγή	26,094	25,682	24,570

Πίνακας 1: Παραγωγή βιοαιθανόλης σε διάφορες χώρες 2014-2016 σε million gallons/year [51].

Υπάρχει μία ποικιλία φυτικών πηγών που μπορούν να παρέχουν τα σάκχαρα για την παραγωγή βιοαιθανόλης και κατηγοριοποιούνται με βάση τη σύστασή τους σε:

(α) σακχαρούχες (όπως σακχαρότευτλο και σακχαροκάλαμο),

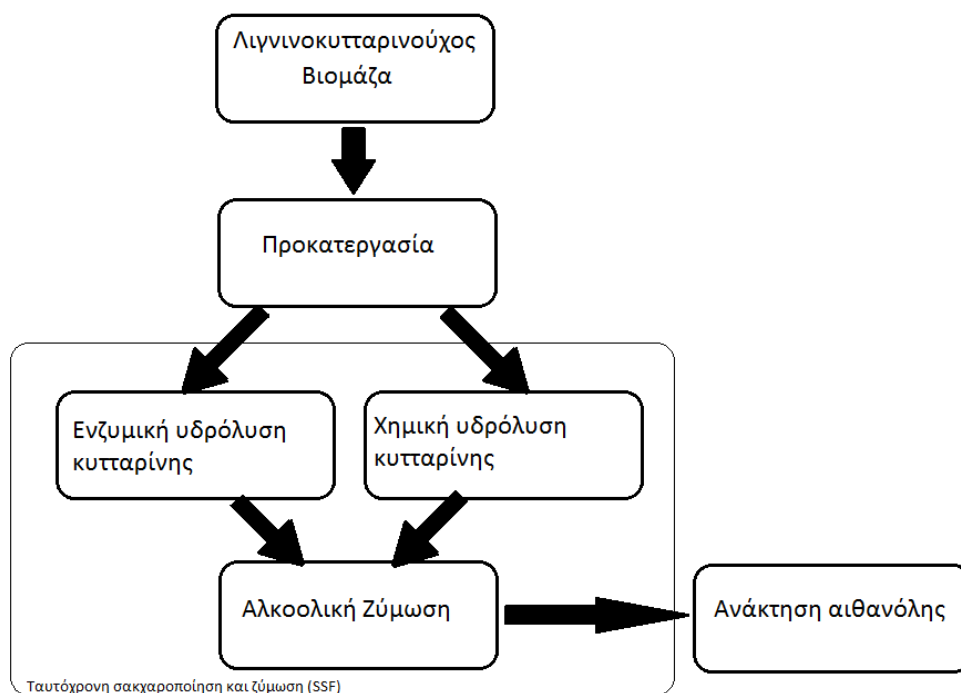
(β) αμυλούχες (όπως σίτος, αραβόσιτος και κριθάρι) και

(γ) λιγνινοκυτταρινούχες.

Οι τεχνολογίες ζύμωσης για τις σακχαρούχες και τις αμυλούχες καλλιέργειες είναι αρκετά ανεπτυγμένες, αλλά υπάρχουν όρια: οι καλλιέργειες αυτές έχουν υψηλή αξία για εφαρμογές σε τρόφιμα και η απόδοση σακχάρων ανά εκτάριο είναι πολύ χαμηλή σε σύγκριση με τις πιο διαδεδομένες μορφές των σακχάρων στη φύση: κυτταρίνη και ημικυτταρίνη. Οι διεργασίες που αφορούν την λιγνινοκυτταρινική βιομάζα ως εκ τούτου, έχουν περιθώρια για περαιτέρω ανάπτυξη : μπορεί να χρησιμοποιηθεί μεγαλύτερη ποικιλία καλλιεργειών, μεγαλύτερο μέρος αυτών των καλλιεργειών μπορεί να μετατραπεί και συνεπώς είναι δυνατές μεγαλύτερες κλίμακες και χαμηλότερο κόστος.

Η λιγνινοκυτταρινική βιομάζα μπορεί να μετατραπεί σε αιθανόλη με υδρόλυση και επακόλουθη ζύμωση. Η υδρόλυση και η ζύμωση της λιγνινοκυτταρίνης, όμως, είναι αρκετά πιο πολύπλοκη από τη ζύμωση ζάχαρης. Για τη βιομετατροπή της κυτταρίνης σε αιθανόλη οι συμβατικές μέθοδοι περιλαμβάνουν συνήθως τρία βήματα :

- την προκατεργασία της πρώτης ύλης, με σκοπό την αύξηση της επιδεκτικότητας του υλικού στο επόμενο βήμα
- την υδρόλυση του βιοπολυμερούς σε μονοσακχαρίτες και τέλος
- τη ζύμωση μονοσακχαριτών σε αιθανόλη, όπως φαίνεται στο παρακάτω Σχήμα.



Σχήμα 1: Τα κύρια στάδια παραγωγής αιθανόλης από λιγνινοκυτταρινούχο βιομάζα

Μία εναλλακτική προσέγγιση ήταν η άμεση (με ένα βήμα) διαδικασία στην οποία εκτελεί ο ίδιος μικροοργανισμός τόσο την υδρόλυση όσο και τη ζύμωση κυτταρίνης προς αιθανόλη στον ίδιο βιοαντιδραστήρα. Έχουν αναφερθεί μερικοί μικροοργανισμοί που έχουν την ικανότητα της απευθείας ζύμωσης της κυτταρίνης σε αιθανόλη. Μεταξύ των μυκήτων, στελέχη του *Fusarium oxysporum*, μπορούν να ζυμώσουν πεντόζες σε αιθανόλη με υψηλή απόδοση [6]. Η μελέτη και βελτιστοποίηση αυτής της διαδικασίας υπόσχονται υψηλά επίπεδα αιθανόλης, δείχνοντας την ικανότητα ορισμένων μυκήτων να πραγματοποιήσουν τόσο την υδρόλυση όσο και τη ζύμωση της κυτταρίνης, ημικυτταρίνης αλλά και αμύλου προς αιθανόλη [7] σε ένα στάδιο. Η παρούσα εργασία αναλήφθηκε για τη διερεύνηση της ικανότητας ενός υψηλού στελέχους που εκκρίνει κυτταρινολυτικά και αμυλολυτικά ένζυμα (F3 *F.oxysporum*) να ζυμώσει την λιγνινοκυτταρινούχο βιομάζα απευθείας σε αιθανόλη.

3.Διατροφικά απορρίματα

Μια διαφορετική και εναλλακτική λιγνινοκυτταρινούχος πηγή ως πρώτη ύλη για την παραγωγή βιοκαυσίμων θα μπορούσε να είναι η αξιοποίηση των αστικών οργανικών αποβλήτων και ιδιαίτερα των οικιακών απορριμμάτων τροφίμων

(Household Food Waste). Λαμβάνοντας υπόψη ότι η συνολική ποσότητα HFW για την ΕΕ-27 κατά τη διάρκεια του 2006 εκτιμάται σε 37,7 Mt, η οποία αντιστοιχεί σε περίπου 76 kg κατά κεφαλήν και αντιπροσωπεύει το 42% της συνολικής ποσότητας απορριμμάτων τροφίμων που παράγονται στην ΕΕ [12], είναι σαφές ότι αποτελούν πρόκληση όσον αφορά τη διάθεσή τους, καθώς και μια ελκυστική πρώτη ύλη για την παραγωγή βιοκαυσίμων. Επιπλέον, υπάρχει μια τάση αύξησης των ποσοτήτων των συνολικών απορριμμάτων τροφίμων που παράγονται (τα οποία προέρχονται τόσο από την εγχώρια, όσο και από την βιομηχανία, από την εξυπηρέτηση τροφίμων / τον κλάδο της εστίασης και από τη λιανική / χονδρική), τα οποία, σύμφωνα με την Ευρωπαϊκή Επιτροπή από 89,3 εκατ. Τόνους το 2006 προβλέπεται να φτάσουν τους 126,2 εκατ. Τόνους έως το 2020 [12]. Μια κοινή πρακτική διαχείρισης HFW είναι η διάθεση των χώρων υγειονομικής ταφής, η οποία προκαλεί σοβαρά περιβαλλοντικά προβλήματα (όπως οι εκπομπές αερίων του θερμοκηπίου) και έλλειψη θέσεων διάθεσης. Άλλες πρακτικές είναι η χρήση ως ζωοτροφές (που μπορούν να προκαλέσουν προβλήματα υγιεινής) και βελτιωτικά εδάφους-λιπάσματα (που μπορούν να προκαλέσουν σοβαρή ρύπανση στα επιφανειακά και υπόγεια ύδατα) . Εναλλακτικά, το HFW μπορεί να χρησιμοποιηθεί για την παραγωγή βιολογικών (πράσινων) χημικών και βιοενέργειας (για παράδειγμα, βιοαερίου και αιθανόλης).

Η αξιοποίηση των διατροφικών απορριμμάτων ως πρώτη ύλη αποτελεί μεγάλη πρόκληση, καθώς τόσο η συλλογή των παραγόμενων HFW από πολλαπλές θέσεις όσο και η μετασυλλεκτική επεξεργασία είναι δύσκολες διαδικασίες [13]. Η υγρασία και τα διαλυτά σάκχαρα μπορούν να κάνουν τα HFW έναν εύκολο στόχο για τους μικροοργανισμούς, οδηγώντας σε σοβαρή υποβάθμιση της αξίας τους ως πρώτη ύλη για την παραγωγή βιοαιθανόλης. Μια άλλη πρόκληση είναι η ετερογένεια που παρουσιάζει το HFW [13, 14], το οποίο επηρεάζεται ιδιαίτερα από την πηγή από την οποία προέρχονται τα απόβλητα. Οι διατροφικές συνήθειες και η εποχή της συλλογής μπορούν επίσης να επηρεάσουν τη σύνθεση του HFW. Γενικά, τα φρούτα και τα λαχανικά αντιπροσωπεύουν ένα σημαντικό μέρος των αποβλήτων [15,16]. Τέλος, ένα σημαντικό ζήτημα που πρέπει να επιλυθεί είναι η σωστή εκπαίδευση του κοινού, προκειμένου να επιτευχθεί χαμηλή παρουσία

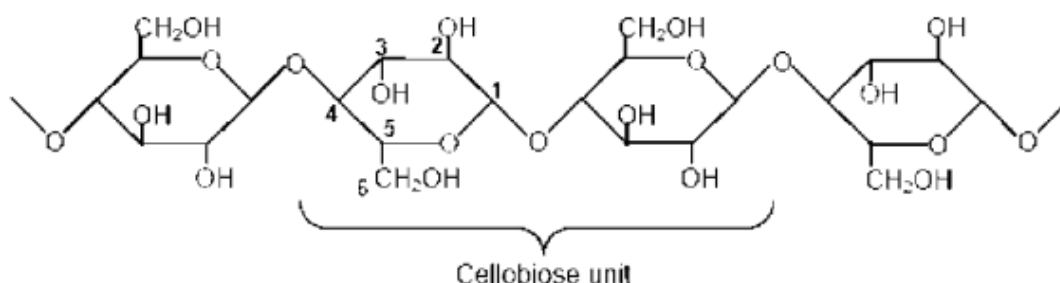
μολυσματικών ουσιών (για παράδειγμα, πλαστικών, μετάλλων κ.λπ.) κατά τη διάρκεια του διαχωρισμού των πηγών ΗΦW.

3.1 Δομή συστατικών διατροφικών απορριμμάτων

Η λιγνινοκυτταρίνη είναι το κύριο δομικό στοιχείο του τοιχώματος των φυτικών κυττάρων. Τα διατροφικά απορρίμματα αποτελούνται κυρίως από κυτταρίνη, ημικυτταρίνη, και λιγνίνη, μαζί με μικρότερες ποσότητες πηκτίνης, πρωτεΐνες, και τέφρα [8]. Η σύνθεση αυτών των συστατικών μπορεί ποικίλλουν ανάλογα την περιοχή από την οποία έγινε η συλλογή τους, αλλά και την χρονική περίοδο που συλλέχθηκαν, καθώς η διατροφικές συνήθειες τείνουν να μεταβάλλονται ανάλογα την εκάστοτε εποχή.

3.1.1 Κυτταρίνη

Η κυτταρίνη είναι το κύριο δομικό συστατικό στα κυτταρικά τοιχώματα των φυτών και βρίσκεται σε μια οργανωμένη ινώδη δομή. Η δομή της κυτταρίνης παρουσιάζεται στην Εικόνα 1.



Εικόνα 1: Απεικόνιση της αλυσίδας της κυτταρίνης [24].

Αυτό το γραμμικό πολυμερές αποτελείται από υπομονάδες D-γλυκόζης που συνδέονται μεταξύ τους με α -(1,4)-γλυκοζιδικούς δεσμούς. Η κελλοβιόζη είναι η επαναλαμβανόμενη μονάδα που δημιουργείται μέσω αυτού και αποτελεί τις αλυσίδες κυτταρίνης.

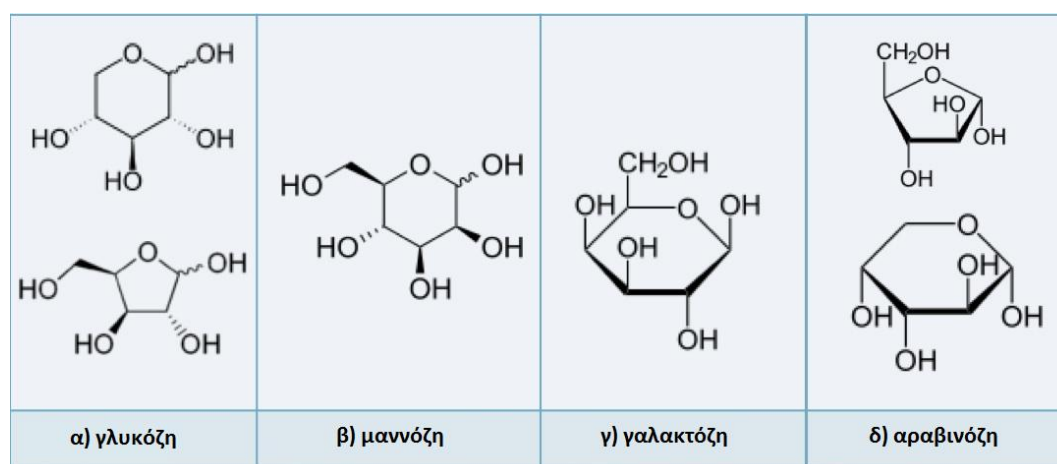
Οι μακρές αλυσίδες του πολυμερούς της κυτταρίνης συνδέονται μεταξύ τους με δεσμούς υδρογόνου και δυνάμεις van der Waals, οι οποίες προκαλούν την

συσκευασία της κυτταρίνης μικροϊνίδια. Οι ημικυτταρίνες και η λιγνίνη καλύπτουν αυτά τα μικροϊνίδια.

Η ζυμώσιμη D-γλυκόζη μπορεί να παραχθεί από την κυτταρίνη μέσω δράσης είτε οξέος είτε ενζύμων που διασπούν τους α-(1,4)-γλυκοζιδικούς δεσμούς. Η κυτταρίνη στη βιομάζα υπάρχει και στις δύο - κρυσταλλική και άμορφη - μορφές. Η κρυσταλλική κυτταρίνη περιλαμβάνει το μεγαλύτερο ποσοστό της κυτταρίνης, ενώ ένα μικρό ποσοστό των ανοργάνωτων αλυσίδων κυτταρίνης σχηματίζουν άμορφη κυτταρίνη. Η κυτταρίνη είναι πιο ευαίσθητη στην ενζυματική αποικοδόμηση στην άμορφη μορφή [9].

3.1.2 Ημικυτταρίνη

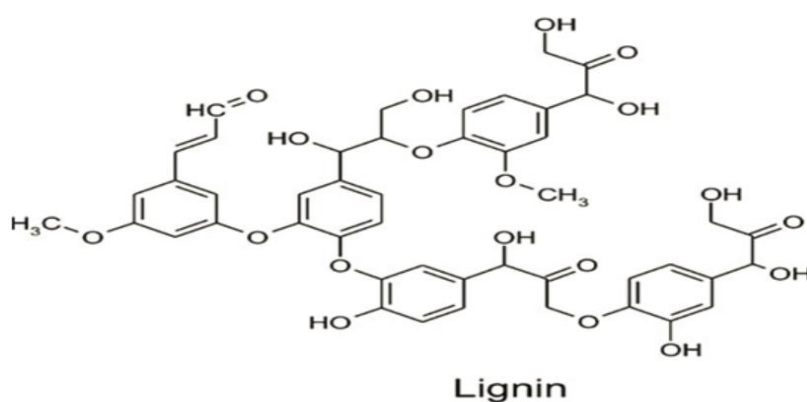
Το κύριο χαρακτηριστικό που διαφοροποιεί την ημικυτταρίνη από την κυτταρίνη είναι ότι η ημικυτταρίνη έχει διακλαδώσεις με βραχείες πλάγιες αλυσίδες που αποτελούνται από διαφορετικά σάκχαρα. Αυτοί οι μονοσακχαρίτες περιλαμβάνουν πεντόζες (ξυλόζη, ραμνόζη και αραβινόζη), εξόζες (γλυκόζη, μαννόζη και γαλακτόζη) και ουρονικά οξέα (π.χ. 4-μεθυλογλυκουρονικό, D-γλυκουρονικό και D-γαλακτουρονικό οξύ). Ο σκελετός της ημικυτταρίνης είναι είτε ομοπολυμερές είτε ετεροπολυμερές με βραχείς κλάδους συνδεδεμένους με α-(1,4)-γλυκοζιδικούς δεσμούς και περιστασιακά β- (1,3)-γλυκοζιδικούς δεσμούς [10]. Σε αντίθεση με την κυτταρίνη, τα πολυμερή που υπάρχουν στις ημικυτταρίνες είναι εύκολα υδρολύσιμα. Αυτά τα πολυμερή δεν συσσωματώνονται, ακόμα και όταν συγκρυσταλλώνονται με αλυσίδες κυτταρίνης.



Εικόνα 2: Μονοσακχαρίτες που συναντώνται στην ημικυτταρίνη

3.1.3 Λιγνίνη

Η λιγνίνη είναι μια σύνθετη, μεγάλη μοριακή δομή που περιέχει διασυνδεδεμένα πολυμερή φαινολικών μονομερών. Είναι παρούσα στο κύριο κυτταρικό τοίχωμα, προσδίδοντας δομική υποστήριξη, αδιαπερατότητα, και αντίσταση κατά μικροβιακών επιθέσεων [11]. Τρεις φαινυλοπροπιονικές αλκοόλες εμφανίζονται ως μονομερή της λιγνίνης: κονικυλική, κουμαρμηλική, και σιναπυλική αλκοόλη. Σε γενικές γραμμές, πώδη φυτά όπως τα χόρτα έχουν το χαμηλότερο περιεχόμενο της λιγνίνης, ενώ τα μαλακά ξύλα έχουν το υψηλότερο περιεχόμενο λιγνίνης.

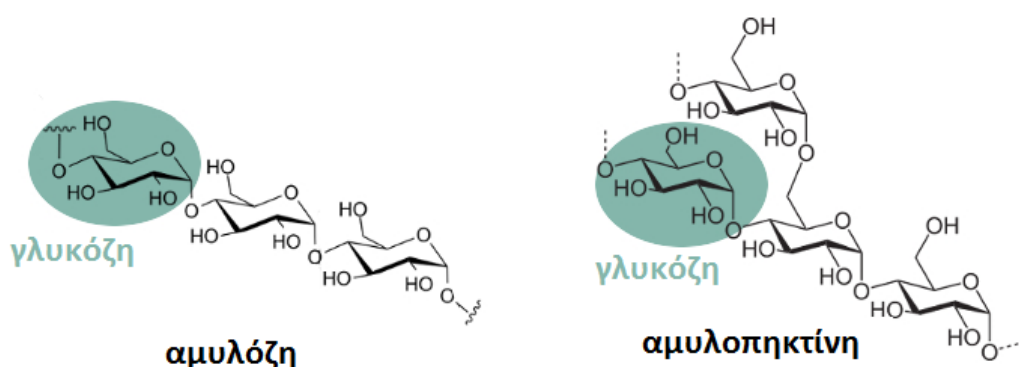


Εικόνα 3: Η δομή της λιγνίνης [52].

3.1.4 Άμυλο

Μετά την κυτταρίνη, το άμυλο είναι η πιο ευρέως διανεμημένη, φυσικά απαντώμενη οργανική ένωση και προέρχεται κυρίως από φυτά. Το άμυλο περιλαμβάνει δύο βασικά συστατικά: αμυλόζη και την αμυλοπηκτίνη. Ενώ και τα δύο συστατικά αποτελούνται από μόρια α-γλυκόζης, διαφέρουν ως προς το μοριακό βάρος και τη σύνταξη. Η αμυλόζη μπορεί να θεωρηθεί ένα γραμμικό πολυμερές της γλυκόζης, της οποίας τα μόρια συνδέονται με α-D-(1,4) γλυκοζιτικό δεσμό. Από την άλλη, η αμυλοπηκτίνη είναι ένας διακλαδωμένος πολυσακχαρίτης που αποτελείται από μία κύρια αλυσίδα μορίων γλυκόζης, που συνδέονται μεταξύ τους με α-D-(1,4) γλυκοζιτικό δεσμό και πλευρικές διακλαδώσεις συνδεδεμένες με πλευρικές διακλαδώσεις με α-D-(1,6) δεσμό. Η σχετική περιεκτικότητα αμυλόζης και αμυλοπηκτίνης στο άμυλο ποικίλλει ανάλογα με την πηγή. Η αμυλόζη γενικά

αντιστοιχεί στο 20-30% του βάρους αμύλου και έχει μέσο μήκος αλυσίδας 500-1000 μονάδες γλυκόζης. Η αμυλοπηκτίνη αντιπροσωπεύει το κύριο κλάσμα του αμύλου (70% -80%) και συνήθως έχει ένα δισδιάστατο πρότυπο κατανομής, με τις διακλαδούμενες αλυσίδες να έχουν μέσο μήκος περίπου 25 μόρια γλυκόζης. Επιπροσθέτως, η αμυλοπηκτίνη είναι διαλυτή στο νερό σε αντίθεση με την αμυλόζη[44].



Εικόνα 4: Οι Δομές της αμυλόζης και της αμυλοπηκτίνης [53].

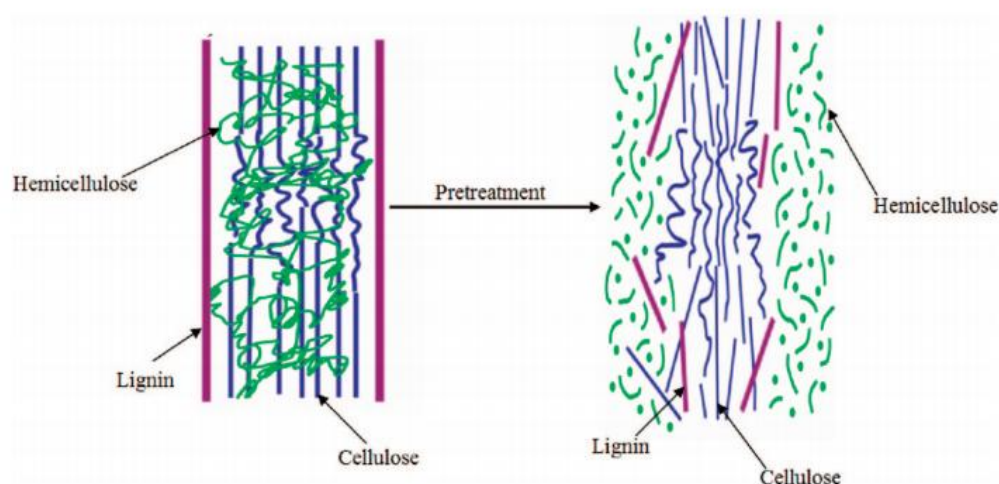
4.Παραγωγή αιθανόλης

Η δράση μικροοργανισμών και ενζύμων σε βιολογικές πηγές μπορεί να οδηγήσει στην παραγωγή κυρίως αιθανόλης και λιγότερο συχνά, προπανόλης και βουτανόλης. Αυτοί οι παράγοντες εκτελούν τη ζύμωση των σακχάρων, του αμύλου, της κυτταρίνης και της ημικυτταρίνης, με αυτή της κυτταρίνης να καθιστάται αρκετά δύσκολη [17].

Η μετατροπή περιλαμβάνει αρχικά την υδρόλυση διαφόρων συστατικών των λιγνινοκυτταρινικών υλικών και ζύμωση των σακχάρων που παράγονται μέσω αυτής σε βιοκαύσιμα, όπως αιθανόλη. Το στάδιο προεπεξεργασίας απαιτείται κυρίως για αποτελεσματική υδρόλυση της κυτταρίνης και ημικυτταρίνης στα συστατικά τους σάκχαρα. Η υδρόλυση συνήθως καταλύεται από οξέα ή κυτταρινολυτικά ένζυμα, και η ζύμωση διεξάγεται από ζύμες ή βακτήρια.

Παράγοντες που επηρεάζουν την υδρόλυση της κυτταρίνης αποτελούν το πορώδες (προσβάσιμη επιφάνεια) των υλικών βιομάζας, η κρυσταλλικότητα των ινών κυτταρίνης και το περιεχόμενο τόσο της λιγνίνης όσο και της ημικυτταρίνης [17].

Η παρουσία λιγνίνης και ημικυτταρίνης καθιστά την προσβασιμότητα στα κυτταρινολυτικά ένζυμα και τα οξέα στην κυτταρίνη πιο δύσκολη, μειώνοντας την αποτελεσματικότητα της διαδικασίας υδρόλυσης. Η προεπεξεργασία απαιτείται για να αλλάξει το μέγεθος και η δομή της βιομάζας ως χημική σύνθεσή, έτσι ώστε η υδρόλυση του υδατανθρακικού κλάσματος σε μονομερή σάκχαρα να μπορεί να επιτευχθεί γρήγορα και με μεγαλύτερες αποδόσεις. Η διαδικασία υδρόλυσης μπορεί να είναι σημαντικά βελτιωμένη με την απομάκρυνση της λιγνίνης και της ημικυτταρίνης, τη μείωση της κρυσταλλικότητας κυτταρίνης και αύξηση του πορώδους μέσω διαδικασιών προεπεξεργασίας [17].



Εικόνα 5: Ο ρόλος της προεπεξεργασίας της λιγνινοκυτταριχούχου βιομάζας [24].

Στη διαδικασία υδρόλυσης, τα σάκχαρα απελευθερώνονται με θραύση των αλυσίδων υδατανθράκων, πριν από τη ζύμωση τους για την παραγωγή αλκοόλης. Οι διαδικασίες υδρόλυσης της κυτταρίνης περιλαμβάνουν α) όξινη υδρόλυση και β) ενζυμική υδρόλυση. Σε παραδοσιακές μεθόδους που αναπτύχθηκαν το 19ο και στις αρχές του 20ου αιώνα, η υδρόλυση πραγματοποιούνταν με αντίδραση της κυτταρίνης με ένα οξύ. Το αραιωμένο οξύ μπορεί να χρησιμοποιηθεί υπό συνθήκες υψηλών θερμοκρασιών και πίεσης, ή πυκνό οξύ μπορεί να χρησιμοποιηθεί σε

χαμηλότερες θερμοκρασίες και ατμοσφαιρική πίεση. Το αποκρυσταλλοποιημένο κυτταρινικό μίγμα οξέος και σακχάρων αντιδρά παρουσία του νερού για την απελευθέρωση μεμονωμένων μορίων σακχάρων. Οι αλυσίδες κυτταρίνης μπορούν επίσης να διασπαστούν σε μεμονωμένα άτομα γλυκόζης από ένζυμα γνωστά ως κυτταρινάσες (κυτταρινολυτικά ένζυμα).

Οι κυτταρινάσες αναφέρονται σε μια κατηγορία ενζύμων που παράγονται κυρίως από μύκητες, βακτήρια και πρωτόζωα που καταλύουν την υδρόλυση της κυτταρίνης. Ωστόσο, υπάρχουν επίσης κυτταρινάσες που παράγονται από φυτά, αλλά και ζωικής προέλευσης. Η αντίδραση συμβαίνει στη θερμοκρασία του σώματος στα στομάχια των μηρυκαστικών όπως οι αγελάδες και τα πρόβατα, όπου τα ένζυμα παράγονται από τα εντερικά βακτηρίδια. Τα λιγνινοκυτταρινούχα υλικά μπορούν επίσης να υδρολυθούν ενζυματικά υπό σχετικά ήπιες συνθήκες (50 ° C και pH ~ 5), επιτρέποντας την αποτελεσματική διάσπαση της κυτταρίνης χωρίς το σχηματισμό υποπροϊόντων που θα παρεμποδίζονταν διαφορετικά την ενζυμική δραστηριότητα. Τα σάκχαρα που περιέχουν έξι άτομα άνθρακα ή εξόζες, γλυκόζη, γαλακτόζη και μαννόζη ζυμώνται εύκολα σε αιθανόλη από πολλούς οι οργανισμοί που εμφανίζονται στη φύση [18].

Ο ζυμομύκητας αρτοποιίας ή αλλιώς *Saccharomyces cerevisiae*, χρησιμοποιείται παραδοσιακά στη βιομηχανία ζυθοποιίας για την παραγωγή αιθανόλης από εξόζες. Λόγω της σύνθετης φύσης των υδατανθράκων που υπάρχουν στις λιγνινοκυτταρινούχες βιομάζες, πεντόζες, δηλαδή σάκχαρα με πέντε άτομα άνθρακα, όπως η ξυλόζη και η αραβινόζη, που προέρχονται από το τμήμα ημικυτταρίνης της λιγνοκυτταρίνης το προϊόν υδρόλυσης. Για παράδειγμα, το προϊόν υδρόλυσης του σπόρου καλαμποκιού περιέχει περίπου το 30% των συνολικών ζυμώσιμων σακχάρων ως ξυλόζη. Ως αποτέλεσμα, η ικανότητα των ζυμωτικών μικροοργανισμών να χρησιμοποιήσει ολόκληρη τη γκάμα των σακχάρων που διατίθενται από την υδρόλυση είναι ζωτικής σημασίας για την αύξηση της οικονομικής ανταγωνιστικότητας της κυτταρινικής αιθανόλης και των δυνητικά χημικών βιοαποδόσεων. Τα τελευταία χρόνια, η μεταβολική μηχανική των μικροοργανισμών που χρησιμοποιούνται στην παραγωγή αιθανόλης καυσίμου έχει δείξει σημαντική πρόοδο [19].

Μικροοργανισμοί όπως ο *Zygomonas mobilis* και το *Escherichia coli*, εκτός από το *Saccharomyces cerevisiae*, έχουν στοχευθεί μέσω της μεταβολικής μηχανικής για την παραγωγή κυτταρινικής αιθανόλης. Η ανάκτηση των βιοκαυσίμων από το ζυμό ζύμωσης επιτυγχάνεται με απόσταξη ή με συνδυασμό απόσταξης και προσρόφησης.

4.1 Μέθοδοι προκατεργασίας

4.1.1 Στόχοι προεπεξεργασίας

Τα ευεργετικά αποτελέσματα της προεπεξεργασίας των λιγνινοκυτταρινούχων υλικών έχουν αναγνωρισθεί εδώ και χρόνια. Ο στόχος της διαδικασίας προεπεξεργασίας είναι η απομάκρυνση της λιγνίνης και της ημικυτταρίνης, να μειώσουν την κρυσταλλικότητα της κυτταρίνης, και να αυξήσουν το πορώδες των λιγνινοκυτταρινούχων υλικών. Η εκάστοτε μέθοδος προεπεξεργασίας πρέπει να πληροί τις ακόλουθες απαιτήσεις:

(1) να αυξάνει το σχηματισμό σακχάρων ή την ικανότητα να σχηματίζουν τα υλικά στη συνέχεια σάκχαρα με υδρόλυση,

(2) να αποφεύγεται η υποβάθμιση ή η απώλεια υδατανθράκων,

(3) να αποφεύγεται ο σχηματισμός υποπροϊόντων που είναι ανασταλτικά για το μετέπειτα διαδικασίες υδρόλυσης και ζύμωσης, και

(4) να είναι αρκετά αποδοτική.

Οι μέθοδοι προεπεξεργασίας μπορούν να χωριστούν σε διαφορετικές κατηγορίες:

α) φυσική (άλεση, πυρόλυση),

β) φυσικοχημικές (προεπεξεργασία με ατμό / αυτοϋδρολύση, υδροθερμόλυση, υγρή οξείδωση και έκρηξη CO₂),

γ) χημικές (άλκαλι, αραιό οξύ, οξειδωτικά μέσα και οργανικοί διαλύτες),

δ) βιολογικές, ή συνδυασμός αυτών.

Οι ακόλουθες τεχνολογίες προεπεξεργασίας είναι πολλά υποσχόμενες όσον αφορά την αποδοτική προεπεξεργασία της λιγνινοκυτταρινικής βιομάζας για βιολογική μετατροπή σε καύσιμα και χημικά προϊόντα.

4.1.2 Φυσικές μέθοδοι

Μηχανικός κατακερματισμός.

Για το θρυμματισμό των λιγνινοκυτταρινικών υλικών μπορεί να εφαρμοστεί ένας συνδυασμός αποκοπής, λείανσης και / ή άλεσης για τη μείωση της κρυσταλλικότητας της κυτταρίνης. Το μέγεθος των υλικών είναι συνήθως 10-30 mm μετά την κοπή και 0,2-2 mm μετά την άλεση ή λείανση[20]. Η δονούμενη σφαίρα άλεσης βρέθηκε να είναι περισσότερο αποτελεσματική από την συμβατική άλεση με σφαιρίδια, στη μείωση της κρυσταλλικότητας της κυτταρίνης. Τα τελικά μεγέθη σωματιδίων και τα απαιτούμενα χαρακτηριστικά βιομάζας καθορίζουν την απαίτηση ισχύος για μηχανική κατεργασία των λιγνινοκυτταρινούχων υλικών [21].

Πυρόλυση

Η πυρόλυση χρησιμοποιείται επίσης για την προεπεξεργασία των λιγνινοκυτταρινικών υλικών. Η κυτταρίνη γρήγορα αποσυντίθεται σε αέρια προϊόντα και υπολειμματικό άνθρακα, όταν η βιομάζα επεξεργάζεται σε θερμοκρασίες μεγαλύτερες από 300°C.27,28 Σε χαμηλότερες τιμές θερμοκρασίας, η αποσύνθεση είναι πολύ πιο αργή, και τα προϊόντα που σχηματίζονται είναι λιγότερο ασταθή. Η ήπια όξινη υδρόλυση (1 N H₂SO₄, 97°C, 2,5 ώρες) των προϊόντων από την προκατεργασία της πυρόλυσης είχε ως αποτέλεσμα 80-85% μετατροπή της κυτταρίνης σε αναγωγικά σάκχαρα με περισσότερο από 50% γλυκόζη[22]. Η διαδικασία πυρόλυσης ενισχύεται όταν πραγματοποιείται παρουσία οξυγόνου.[23]

4.1.3 Φυσικοχημικές μέθοδοι

Έκρηξη ατμού

Η έκρηξη ατμού είναι η πιο συχνά χρησιμοποιούμενη μέθοδος για την προεπεξεργασία των λιγνινοκυτταρινικών υλικών[17]. Στη μέθοδο αυτή, η βιομάζα επεξεργάζεται με κορεσμένο ατμό υψηλής πίεσης και στη συνέχεια η πίεση ξαφνικά μειώνεται, πράγμα που κάνει τα υλικά υποβάλλονται σε εκρηκτική αποσυμπίεση. Η

έκρηξη ατμού ξεκινά τυπικά σε θερμοκρασία 160-260 ° C (πίεση, 0,69-4,83 MPa) για μερικά δευτερόλεπτα ως λίγα λεπτά πριν από την έκθεση του υλικού σε ατμοσφαιρική πίεση[20]. Το μίγμα βιομάζας / ατμού διατηρείται για ένα χρονικό διάστημα έως ότου προαχθεί η υδρόλυση της ημικυτταρίνης και η διαδικασία τερματίζεται από εκρηκτική αποσυμπίεση. Η διαδικασία προκαλεί την αποικοδόμηση της ημικυτταρίνης και το μετασχηματισμό της λιγνίνης λόγω υψηλών θερμοκρασιών, αυξάνοντας έτσι το δυναμικό της υδρόλυσης κυτταρίνης. Η ημικυτταρίνη πιστεύεται ότι υδρολύεται με οξικό και άλλα οξέα που απελευθερώνονται κατά την προεπεξεργασία με έκρηξη με ατμό.

Έκρηξη CO₂

Σε προσπάθειες ανάπτυξης βελτιωμένων τεχνικών προεπεξεργασίας λιγνινοκυτταρίνης, , αναπτύχθηκε η ιδέα του να χρησιμοποιηθεί έκρηξη υπερκρίσιμου CO₂, η οποία θα είχε χαμηλότερη τιμή θερμοκρασίας από την έκρηξη ατμού και ενδεχομένως μειωμένες δαπάνες σε σύγκριση με την έκρηξη αμμωνίας. Το υπερκρίσιμο υγρό αναφέρεται σε ένα ρευστό που είναι σε αέρια μορφή, αλλά συμπιέζεται σε θερμοκρασίες πάνω από το κρίσιμο σημείο του σε τιμές πυκνότητας παραπλήσιες του υγρού. Υπήρχε η υπόθεση ότι, επειδή η μορφή του CO₂ όταν διαλύεται σε νερό (ανθρακικό οξύ), αυξάνει το ποσοστό υδρόλυσης. Τα μόρια διοξειδίου του άνθρακα είναι συγκρίσιμου μεγέθους με αυτά του νερού και της αμμωνίας και είναι σε θέση να διεισδύσουν σε μικρούς πόρους του προς κατεργασία υλικού. Επιπλέον, η χαμηλή θερμοκρασία εμποδίζει κάθε αξιόλογη αποσύνθεση των μονοσακχαριτών από το οξύ. Μετά από μια εκρηκτική απελευθέρωση της πίεσης του διοξειδίου του άνθρακα, η διάσπαση της κυτταρινικής δομής αυξάνει την προσπελάσιμη επιφάνεια του υποστρώματος προς υδρόλυση.[24]

Υδροθερμόλυση

Η υδροθερμόλυση πρόκειται για μία υδροθερμική κατεργασία που δεν απαιτεί ραγδαία αποσυμπίεση και δεν χρησιμοποιεί κανένα καταλύτη. Πίεση εφαρμόζεται για την διατήρηση του νερού σε υγρή μορφή σε υψηλές θερμοκρασίες (160-240°C) και προκαλεί μετατροπές στη δομή του προς επεξεργασία υλικού. Ο στόχος αυτής

της προκατεργασίας είναι η διαλυτοποίηση της ημικυτταρίνης, η αύξηση της προσβασιμότητας της κυτταρίνης και η αποφυγή του σχηματισμού παρεμποδιστών. Το μίγμα που προκύπτει μετά την προκατεργασία μπορεί να φιλτραριστεί για την ανάκτηση δύο κλασμάτων: ένα στερεό κλάσμα πλούσιο σε κυτταρίνη και ένα υγρό κλάσμα πλούσιο σε σάκχαρα που προέρχονται από την ημικυτταρίνη (κυρίως ξυλόζη). Για την αποφυγή του σχηματισμού παρεμποδιστών το pH πρέπει να διατηρείται στο 4-7. Η προκατεργασία με θερμό νερό απομακρύνει μέχρι και το 80% της ημικυτταρίνης και ενισχύει την επιδεκτικότητα του υλικού σε ένζυμα. Η λιγνίνη αποπολυμερίζεται και διαλυτοποιείται μερικώς κατά την προκατεργασία αλλά η απολιγνινοποίηση μόνο με θερμό νερό δεν είναι δυνατή εξαιτίας της ανασυμπύκνωσης διαλυτών ενώσεων που προέρχονται από τη λιγνίνη. Γενικά, η προκατεργασία με θερμό νερό είναι ελκυστική εξαιτίας του χαμηλού κόστους της. Δεν απαιτείται καταλύτης και το κόστος κατασκευής και συντήρησης είναι χαμηλό αφού υπάρχει χαμηλός κίνδυνος για διάβρωση. Έχει επίσης το μεγάλο πλεονέκτημα της μειωμένης συγκέντρωσης αποικοδομήσιμων προϊόντων και αυτό οφείλεται στο ότι τα διαλυμένα προϊόντα της ημικυτταρίνης και της λιγνίνης βρίσκονται σε χαμηλή συγκέντρωση εξαιτίας των υψηλών ποσοτήτων νερού που χρησιμοποιούνται. Ωστόσο, αυτή η διεργασία απαιτεί υψηλές ποσότητες νερού και περισσότερη ενέργεια από ότι διεργασίες που όπως η προκατεργασία με εκτόνωση ατμού[25,26].

4.1.4 Χημικές μέθοδοι

Οζονόλυση

Η επεξεργασία με όζον είναι ένας τρόπος μείωσης της περιεκτικότητας λιγνίνης στην λιγνινοκυτταρινική βιομάζα. Αυτό έχει ως αποτέλεσμα την αύξηση της in vitro ικανότητας του επεξεργασμένου υλικού να μεταβολιστεί από μικροοργανισμούς προς αιθανόλη και σε αντίθεση με άλλα χημικά δεν παράγει τοξικά υπολείμματα. Το όζον χρησιμοποιείται για την αποικοδόμηση της λιγνίνης και της ημικυτταρίνης σε πολλά λιγνινοκυτταρινούχα υλικά όπως το άχυρο σιταριού[27], και πριονίδι από λεύκες[28]. Η υποβάθμιση περιορίζεται κυρίως στην λιγνίνη. Η ημικυτταρίνη επηρεάζεται ελαφρώς, ενώ η κυτταρίνη καθόλου. Η τιμή της ενζυματικής υδρόλυσης αυξήθηκε κατά ένα συντελεστή 5 μετά από 60% απομάκρυνση της

λιγνίνης από άχυρο σιταριού χρησιμοποιώντας προκατεργασία με όζον. Η απόδοση της ενζυματικής υδρόλυσης αυξήθηκε από 0% σε 57%, καθώς το ποσοστό της λιγνίνης μειώθηκε από 29% σε 8% μετά από προεπεξεργασία με οζονόλυση, πριονιδιού λεύκας[28]. Η οζονόλυση ως προεπεξεργασία λιγνινοκυτταρινούχων υλικών έχει σαν πλεονέκτημα ότι οι αντιδράσεις διεξάγονται σε θερμοκρασία δωματίου και κανονική πίεση. Επιπλέον, το γεγονός ότι το όζον μπορεί εύκολα να αποσυντεθεί χρησιμοποιώντας ένα καταλυτικό στρώμα ή η αύξηση της θερμοκρασίας σημαίνει ότι μπορούν να γίνουν οι διαδικασίες με σκοπό την ελαχιστοποίηση της ρύπανσης του περιβάλλοντος [29]. Ένα μειονέκτημα της οζονόλυσης είναι ότι απαιτείται μεγάλη ποσότητα όζοντος, το οποίο μπορεί να κάνει τη διαδικασία δαπανηρή. Τα περισσότερα πειράματα οζονισμού έχουν διεξαχθεί σε ενυδατωμένα σταθερή κλίση η οποία οδηγεί σε πιο αποτελεσματικές οξειδώσεις από τα υδατικά εναιωρήματα ή εναιωρήματα σε 45% οξικό οξύ [28].

Αλκαλική υδρόλυση

Κάποιες βάσεις μπορούν να χρησιμοποιηθούν για την προεπεξεργασία των λιγνινοκυτταρινικών υλικών και η επίδραση της αλκαλικής προεπεξεργασίας εξαρτάται από την περιεκτικότητα σε λιγνίνη του εκάστοτε υλικού. Οι μέθοδοι αλκαλικής προεπεξεργασίας χρησιμοποιούν χαμηλότερες θερμοκρασίες και πιέσεις από άλλες τεχνολογίες προκατεργασίας[18]. Η προεπεξεργασία αλκάλειως μπορεί να διεξαχθεί σε συνθήκες περιβάλλοντος, αλλά οι χρόνοι προεπεξεργασίας είναι της τάξεως των ωρών ή ημερών. Σε σύγκριση με τις μεθόδους οξέος, οι αλκαλικές διαδικασίες προκαλούν λιγότερη υποβάθμιση των σακχάρων, και πολλά από τα καυστικά άλατα μπορούν να ανακτηθούν και / ή να αναγεννηθούν. Το νάτριο, το κάλιο, ασβέστιο και υδροξείδια αμμωνίου είναι κατάλληλοι αλκαλικοί παράγοντες προεπεξεργασίας [30-33]. Ως εκ τούτου, η αλκαλική προεπεξεργασία παίζει σημαντικό ρόλο στην έκθεση της κυτταρίνης για υδρόλυση από κυτταρινολυτικά ένζυμα. Η αλκαλική προκατεργασία διασπά τους δεσμούς μεταξύ της ημικυτταρίνης και των υδρογονανθράκων της λιγνίνης. Έτσι αυξάνει την αποτελεσματικότητα της μετέπειτα ενζυμικής υδρόλυσης, ενώ παράλληλα εξαλείφονται υποκαταστάτες της ημικυτταρίνης που εμποδίζουν την πρόσβαση των ενζύμων στην κυτταρίνη και την ημικυτταρίνη.

Όξινη υδρόλυση

Πυκνά οξέα όπως το H_2SO_4 και HCl έχουν επίσης χρησιμοποιηθεί για την κεταργασία λιγνινοκυτταρινικών υλικών. Η προεπεξεργασία με όξινη υδρόλυση μπορεί να οδηγήσει σε βελτίωση της ενζυματικής υδρόλυσης της λιγνινοκυτταρινούχας βιομάζας για απελευθέρωση ζυμώσιμων σακχάρων. Αν και είναι ισχυροί παράγοντες για την υδρόλυση της κυτταρίνης, τα πυκνά οξέα είναι τοξικά, διαβρωτικά, επικίνδυνα και συνεπώς, απαιτούν αντιδραστήρες που είναι ανθεκτικοί στη διάβρωση, γεγονός που καθιστά τη διαδικασία προεπεξεργασίας πολύ δαπανηρή. Επιπροσθέτως, το πυκνό οξύ πρέπει να ανακτηθεί μετά την υδρόλυση για να καταστεί η διαδικασία οικονομικά εφικτή[34,35]. Η υδρόλυση χρησιμοποιώντας αραιά οξέα έχει αναπτυχθεί με επιτυχία για την προεπεξεργασία των λιγνινοκυτταρινικών υλικών. Το θειικό οξύ σε συγκεντρώσεις συνήθως κάτω από 4% κατά βάρος, έχει το περισσότερο ενδιαφέρον για τέτοιες μελέτες, καθώς είναι φθινό και αποτελεσματικό[18]. Η προεπεξεργασία με αραιό H_2SO_4 μπορεί να επιτύχει υψηλές ταχύτητες αντίδρασης και βελτιώνουν σημαντικά την υδρόλυση της κυτταρίνης [36]. Με την προσθήκη αραιωμένου οξέος απομακρύνεται και ανακτάται το μεγαλύτερο μέρος της ημικυτταρίνης ως διαλυμένα σάκχαρα και οι αποδόσεις γλυκόζης από την κυτταρίνη αυξάνονται με την απομάκρυνση της ημικυτταρίνης σε σχεδόν 100% [18].

4.1.5 Βιολογικές μέθοδοι

Οι περισσότερες τεχνολογίες προεπεξεργασίας απαιτούν ακριβά όργανα ή εξοπλισμό που έχουν υψηλές ενεργειακές απαιτήσεις, ανάλογα με τη διαδικασία. Ειδικότερα, οι φυσικές και θερμοχημικές διεργασίες απαιτούν άφθονη ενέργεια για τη μετατροπή της βιομάζας. Η βιολογική επεξεργασία που χρησιμοποιεί διάφορους τύπους μυκήτων σήψης, μια ασφαλής και φιλική προς το περιβάλλον μέθοδος, υποστηρίζεται όλο και περισσότερο ως μια διαδικασία που δεν απαιτεί υψηλή ενέργεια για την απομάκρυνση της λιγνίνης από μια λιγνινοκυτταρινική βιομάζα, παρά την εκτεταμένη αποικοδόμηση της λιγνίνης που έχει ως αποτέλεσμα[38]. Σε βιολογικές διεργασίες προεπεξεργασίας, οι καφέ, λευκοί και μαλακοί μύκητες

σήψης χρησιμοποιούνται για την αποικοδόμηση της λιγνίνης και της ημικυτταρίνης σε απόβλητα υλικά[37]. Οι καφέ προσβάλλουν κυρίως κυτταρίνη, ενώ οι λευκοί τόσο την κυτταρίνη όσο και την λιγνίνη. Η αποικοδόμηση της λιγνίνης με μύκητες λευκής σήψης συμβαίνει μέσω της δράσης ενζύμων αποικοδόμησης της λιγνίνης όπως οι υπεροξειδάσες και η λακκάση[39]. Αυτά τα ένζυμα ρυθμίζονται από πηγές άνθρακα και αζώτου. Οι μύκητες λευκής σήψης είναι οι πιο αποτελεσματικοί για τη βιολογική προεπεξεργασία των λιγνοκυτταρινικών υλικών.

4.2 Υδρόλυση υδατανθράκων για την παραγωγή σακχάρων

4.2.1 Ενζυμική υδρόλυση κυτταρίνης

Η ενζυμική υδρόλυση της κυτταρίνης και του αμύλου είναι μία αρκετά ελκυστική μέθοδος λόγω της χαμηλής παραγωγής παραπροϊόντων κατά την υδρολυτική διαδικασία, τις χαμηλές ενεργειακές απαιτήσεις και τις ήπιες συνθήκες λειτουργίας. Πριν την ενζυμική υδρόλυση, είναι απαραίτητο να προηγηθεί όπως προαναφέρθηκε προκατεργασία της βιομάζας, η οποία θα αυξήσει την επιδεκτικότητα του αμύλου και της κυτταρίνης στις διάφορες ενζυμικές δράσεις.

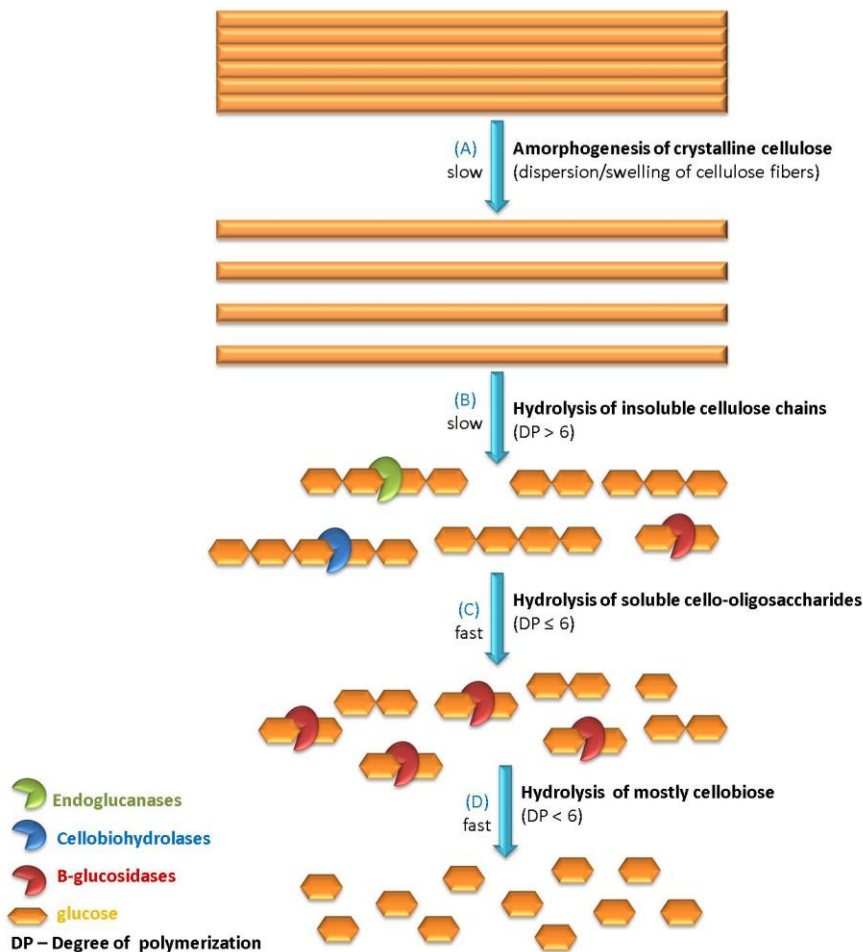
Η υδρόλυση της κυτταρίνης και της ημικυτταρίνης λαμβάνει χώρα με τη βοήθεια μιας «οικογένειας» ενζύμων, των κυτταρινασών. Τα ένζυμα αυτά αναλαμβάνουν την υδρόλυση της κυτταρίνης και της ημικυτταρίνης στα συστατικά τους μονομερή (γλυκόζη, ξυλόζη, αραβινόζη). Τρία είδη ενζύμων δρουν συνεργιστικά για την υδρόλυση της κυτταρίνης :

- Ενδογλυκανάσες ή ένδο-1,4-β-D-γλυκάνο γλυκανοϋδρολάσες: Οι ενδογλυκανάσες διασπούν το γλυκοζιτικό δεσμό σε τυχαίες θέσεις στο εσωτερικό της αλυσίδας της κυτταρίνης και σε άμορφες περιοχές (μη κρυσταλλικές, δηλαδή περιοχές που η δομή των αλυσίδων είναι πιο άτακτη). Παράγουν διαλυτούς ολιγοσακχαρίτες με διάφορα μεγέθη και δημιουργούν νέα άκρα στην κυτταρινική αλυσίδα. Είναι δραστικές έναντι άμορφης κυτταρίνης και διαλυτά παράγωγα κυτταρίνης όπως η καρβοξυμεθυλοκυτταρίνη (CMC).
- Εξωγλυκανάσες ή 1, 4-β-D- ολιγογλυκανο κελλοβιοϋδρολάσες: Είναι γνωστές και ως κελλοδεξτρινάσες, και καταλύουν την παραγωγή κελλοβιόζης από κελλοολιγοσακχαρίτες (δηλαδή διαλυτά ολιγομερή της

κυτταρίνης, όπως αυτά που παράγονται από τις ενδογλυκανάσες) αλλά δεν είναι δραστικές έναντι της άμορφης κυτταρίνης ή της καρβοξυμεθυλοκυτταρίνης.

- β-γλυκοσιδάσες ή β-D-γλυκοσιδο γλυκοϋδρολάσες: Υδρολύουν την κελλοβιόζη και τις διαλυτές κελλοδεξτρίνες παράγοντας γλυκόζη, ενώ δεν είναι δραστικές έναντι της κρυσταλλικής ή της άμορφης κυτταρίνης.

Οι ενδογλυκανάσες δρουν τυχαία έναντι της άμορφης περιοχής της αλυσίδας της κυτταρίνης ώστε να παράγουν αναγωγικά και μη αναγωγικά άκρα για τις κελλοβιοϋδρολάσες, που καταλύουν την υδρόλυση της κελλοβιόζης από αναγωγικά ή μη αναγωγικά άκρα κρυσταλλικής κυτταρίνης. Οι αλυσίδες κυτταρίνης αποικοδομούνται έτσι αποδοτικά σε διαλυτή κελλοβιόζη και σε βιολογικούς σακχαρώδεις παράγοντες από την ενδο-εξω συνεργία των ενδο- και εξωγλυκανασών. Στο τελευταίο στάδιο της ενζυματικής αποικοδόμησης της κυτταρίνης, οι βιολογικοί κελλοολιγοσακχαρίτες υδρολύονται σε γλυκόζη με της δράση της β-γλυκοσιδάσης[41,42].



Εικόνα 6: Απεικόνιση της συνεργιστικής δράσης κυτταρινασών για την υδρόλυση της κυτταρίνης [40].

4.2.2 Ενζυμική υδρόλυση ημικυτταρίνης

Για την αποτελεσματική υδρόλυση και παραγωγή σακχάρων σε ένα λιγνινοκυτταρινούχο υλικό, είναι αναγκαία η υδρόλυση και της ημικυτταρίνης.

Η ξυλάνη, το βασικό πολυμερές της ημικυτταρίνης, υδρολύεται σε ξυλο-ολιγοσακχαρίτες από ενδο-β-1,4-ξυλανάσες και στη συνέχεια οι β-ξυλοζιδάσες υδρολύουν τους ξυλο-ολιγοσακχαρίτες (κυρίως την ξυλοβιόζη) σε μόρια ξυλόζης. Άλλα ένζυμα που συνεισφέρουν στην αποικοδόμηση της ημικυτταρίνης είναι οι α-γλυκουρονιδάσες (α-glucuronidases), οι α-L-αραβινοφουρανοζιδάσες (α-L-arabinofuranosidases), οι ακετυλ-εστεράσες και οι εστεράσες του φερουλικού οξέος. Η αποικοδόμηση των γλυκομαννάνων γίνεται από β-μαννανάσες (β-mannanases) και β-μαννοζιδάσες (β-mannosidases)[40].

4.2.3 Ενζυμική υδρόλυση αμύλου

Με στόχο την αύξηση της παραγωγής σακχάρων, και κατ'επέκταση αιθανόλης, είναι απαραίτητη και η ενζυμική υδρόλυση του αμύλου που περιέχεται στη λιγνινοκυτταρινούχα βιομάζα. Αυτό επιτυγχάνεται με τη συνεργιστική δράση από δύο τύπους αμυλολυτικών ενζύμων, τις α-αμυλάσες και τις γλυκοαμυλάσες.

α-Αμυλάσες

Η α-αμυλάση έχει καταστεί ένα ένζυμο μεγάλης σημασίας λόγω της δραστηριότητάς της κατά την υδρόλυση του αμύλου, αλλά και των δραστηριοτήτων που μπορούν να πραγματοποιηθούν λόγω της υδρόλυσης. Μια τέτοια δραστηριότητα είναι και η παραγωγή βιοαιθανόλης. Η α-αμυλάση (E.C.3.2.1.1) είναι ένζυμο που καταλύει την υδρόλυση των α-(1,4)-γλυκοσιδικών δεσμών, που βρίσκονται στα τα εσωτερικά τμήματα των πολυμερικών αλυσίδων της αμυλοπηκτίνης και της αμυλόζης, για να δώσει προϊόντα όπως γλυκόζη και μαλτόζη[45].

Γλυκοαμυλάση

Η γλυκοαμυλάση (α-1,4- glucan glucanohydrolase, EC 3.2.1.3) έχει μεγάλη σημασία για τις βιομηχανίες ζύμωσης και τροφίμων για την σακχαροποίηση αμύλου και άλλων σχετικών ολιγοσακχαριτών. Η γλυκοαμυλάση, σε αντίθεση με την α-αμυλάση, δρα στα άκρα του υποστρώματος. Είναι υπεύθυνη για την διαδοχική υδρόλυση των α-1,4 γλυκοσιδικών δεσμών από τα μη αναγωγικά άκρα του αμύλου, με αποτέλεσμα την παραγωγή γλυκόζης. Σε μικρότερο βαθμό, έχει επίσης την ικανότητα να υδρολύει α-1,6 δεσμούς, που επίσης οδηγούν σε γλυκόζη ως τελικό προϊόν[46].

4.3 Ζύμωση στερεάς κατάστασης (ΖΣΚ) για την παραγωγή ενζύμων

Η ζύμωση στερεάς κατάστασης (ΖΣΚ) έχει οριστεί ως η διαδικασία ζύμωσης που περιλαμβάνει στερεό υπόστρωμα και διεξάγεται απουσία ή κοντά στην απουσία ελεύθερου νερού. Ωστόσο, το υπόστρωμα πρέπει να έχει αρκετή υγρασία για να υποστηρίξει την ανάπτυξη και το μεταβολισμό του μικροοργανισμού. Τα πιο συχνά χρησιμοποιούμενα στερεά υποστρώματα είναι οι κόκκοι δημητριακών (ρύζι, σιτάρι, κριθάρι και καλαμπόκι), οι σπόροι όσπριας, τα πίτυρα σίτου, τα και ένα ευρύ φάσμα

φυτικών και ζωικών υλικών. Οι περισσότερες από αυτές τις ενώσεις είναι πολυμερή μόρια - αδιάλυτα ή ελάχιστα διαλυτά στο νερό - αλλά τα περισσότερα είναι φθηνά και εύκολα διαθέσιμα και αντιπροσωπεύουν μια συμπυκνωμένη πηγή θρεπτικών ουσιών για μικροβιακή ανάπτυξη. Το στερεό υπόστρωμα θα μπορούσε να είναι είτε η πηγή των θρεπτικών ουσιών είτε απλά ένα υποστήριγμα εμποτισμένο από τα κατάλληλα θρεπτικά συστατικά που επιτρέπει την ανάπτυξη των μικροοργανισμών [47]. Το δυναμικό της ΖΣΚ έγκειται στο να φέρει τον καλλιεργημένο μικροοργανισμό σε κοντινή απόσταση από το υπόστρωμα και την επίτευξη της υψηλότερης συγκέντρωσης υποστρώματος για τη ζύμωση. Η ΖΣΚ προσομοιάζει το φυσικό περιβάλλον των μικροοργανισμών και ως εκ τούτου προτιμάται η ανάπτυξη μικροοργανισμών και η παραγωγή χρήσιμων προϊόντων προστιθέμενης αξίας. Ακόμη και οι θαλάσσιοι μικροοργανισμοί δεν προτιμούν την «κολύμβηση» σε ελεύθερο νερό, δεδομένου ότι πάνω από το 98% των απομονώσεων από το θαλάσσιο περιβάλλον έχουν ληφθεί από τις υποθαλάσσιες επιφάνειες των στερεών υποστρωμάτων που απαντώνται σε θαλάσσια ενδιαιτήματα [48,49].

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

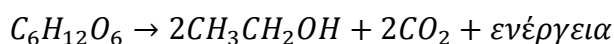
- Επιτυγχάνονται μεγαλύτερες ή ίσες αποδόσεις συγκριτικά με τη βυθισμένη ζύμωση
- Το υπόστρωμα είναι συνήθως απλό και οικονομικό υλικό
- Βακτηριακή μόλυνση σπάνια συμβαίνει με ζυμώσεις με μύκητες
- Εφόσον χρησιμοποιούνται μικροί όγκοι υποστρωμάτων και νερού για την παραγωγή του προϊόντος, τα προβλήματα ρύπανσης μειώνονται σημαντικά.
- Ο ζυμωτήρας δεν χρειάζεται να είναι τόσο μεγάλος όσο αυτός που απαιτείται για μια διαδικασία βυθισμένης ζύμωσης.
- Οι συνθήκες υπό τις οποίες αναπτύσσονται μικροοργανισμοί, ιδίως μύκητες, είναι παρόμοιες με εκείνες της φύσης.
- Όταν το στερεό υλικό δεν αιωρείται σε υγρό, ο αερισμός είναι ευκολότερος.
- Μπορεί να πραγματοποιηθεί με μικρούς όγκους υποστρώματος, μειώνοντας το λειτουργικό κόστος των αντιδραστήρων. (Pérez- Guerra, *et al.*, 2000).

Η ζύμωση στερεάς κατάστασης παρουσιάζει και κάποια μειονεκτήματα όπως:

- Η παραγωγή θερμότητας που παρατηρείται ακόμη και σε μικρές ζυμώσεις μόλις του 1 kg. Η υπερβολική θερμότητα πρέπει να ελέγχεται, διαφορετικά η θερμοκρασία γίνεται τόσο υψηλή που καταστρέφει το επιθυμητό μικροβιακό προϊόν ή να σταματά εντελώς την ανάπτυξη και τη ζύμωση.
- Μερικές φορές το υπόστρωμα πρέπει να υποβληθεί σε προεπεξεργασία
- Η απαιτούμενη αρχική ποσότητα εμβολίου μπορεί να είναι αρκετά υψηλή.
- Σε μερικές περιπτώσεις, δεν μπορεί κανείς να αποκτήσει το επιθυμητό προϊόν με ζύμωση στερεού υποστρώματος, ή παράγεται σε χαμηλές αποδόσεις ή σε μείγματα με άλλα, ανεπιθύμητα, προϊόντα.
- Η στερεά φύση των υποστρωμάτων δημιουργεί προβλήματα στον έλεγχο παραμέτρων της διεργασίας (pH, περιεχόμενη υγρασία, συγκέντρωση οξυγόνου και βιομάζας)
- οι χρόνοι καλλιέργειας είναι μεγαλύτεροι από αυτούς της βυθιζόμενης ζύμωσης (Kumar, *et al.*, 1989).

4.4 Αλκοολική ζύμωση

Η αλκοολική ζύμωση είναι η διαδικασία κατά την οποία απλά σάκχαρα μετατρέπονται σε αιθανόλη και διοξείδιο του άνθρακα, υπό αναερόβιες συνθήκες (απουσία οξυγόνου). Η παραγωγή αιθανόλης με ζύμωση μπορεί να αποδοθεί συνοπτικά με την παρακάτω εξίσωση :



4.4.1 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).

4.4.2 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).

4.4.3 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).

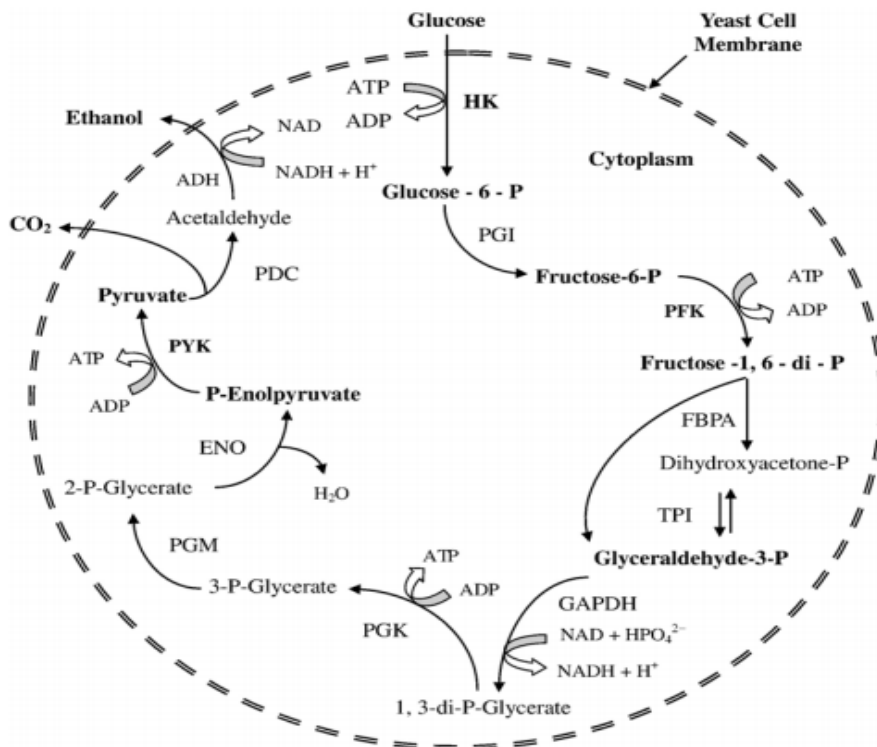
4.5 Μικροοργανισμοί για την παραγωγή βιοαιθανόλης

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 *Zygomonas mobilis* (προκαρυωτικοί).

4.5.1 *Saccharomyces cerevisiae*

Η ζύμη *Saccharomyces cerevisiae* είναι συνήθως η πρώτη επιλογή για τη βιομηχανική παραγωγή αιθανόλης, λόγω της ικανότητας ζύμωσης, της υψηλής αντοχής στην αιθανόλη και σε άλλους αναστολείς (είτε σχηματιζόμενους κατά την προεπεξεργασία των πρώτων υλών είτε κατά την διάρκεια της ζύμωσης) και της ικανότητας να αναπτύσσεται ταχέως υπό τις αναερόβιες συνθήκες από τις οποίες χαρακτηρίζονται τα δοχεία μεγάλης κλίμακας ζύμωσης. Το κύριο μεταβολικό μονοπάτι που εμπλέκεται στη ζύμωση αιθανόλης είναι η γλυκόλυση (Embden-Meyerhof-Parnas ή μονοπάτι EMP), μέσω του οποίου ένα μόριο γλυκόζης μεταβολίζεται και παράγονται δύο μόρια πυροσταφυλικού οξέος (Madigan et al., 2000), όπως απεικονίζεται στην Εικόνα 7. Τα δύο μόρια πυροσταφυλικού οξέως στη συνέχεια, αποκαρβοξυλιώνονται, ώστε να σχηματιστούν δύο μόρια ακεταλδεΐδης και CO₂. Τέλος, ο σχηματισμός αιθανόλης ολοκληρώνεται με την προσθήκη πρωτονίου στις αλδεΐδες από το NADH, που παράγεται κατά τη διάρκεια της γλυκόλυσης και μετατρέπεται ξανά σε NAD⁺ [50].



Εικόνα 7: Μια επισκόπηση της γλυκόλυσης. Ένα μόριο γλυκόζης οξειδώνεται σε δύο μόρια πυροσταφυλικού οξέος. Το πυροσταφυλικό μπορεί στη συνέχεια να αποκαρβοξυλιωθεί για να σχηματίσει ακεταλδεΐδη, η οποία πρωτονιόνεται και σχηματίζει αιθανόλη [54].

4.5.2 *Fusarium oxysporum*

Η ικανότητα του μύκητα *Fusarium oxysporum* να ζυμώνει σάκχαρα είναι γνωστή για περίπου 70 χρόνια. Ο *F. oxysporum* μπορεί να ζυμώσει τη γλυκόζη προς αιθανόλη και CO₂ δίνοντας απόδοση προϊόντος παρόμοια με εκείνη των ζυμών. Συγκεκριμένα το στέλεχος *Fusarium oxysporum* F3, διαθέτει την ικανότητα ζύμωσης όχι μόνο της γλυκόζης και της ξυλόζης, αλλά και της κελλοβιόζης και της κυτταρίνης. Ο μύκητας *F. oxysporum* διαθέτει την εξαιρετική ικανότητα βιομετατροπής της κυτταρίνης και της ξυλάνης απευθείας στην αιθανόλη μέσω των διαδοχικών σταδίων της υδρόλυσης των πολυσακχαριτών και της ζύμωσης των προκύπτοντων ολιγοσακχαριτών (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).

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) .

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. Πρώτη ύλη – Χημικά αντιδραστήρια

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. Η σύσταση των διατροφικών απορριμμάτων περιγράφεται στον παρακάτω πίνακα.

Πίνακας 2: Σύσταση διατροφικών απορριμμάτων που χρησιμοποιήθηκαν στην παρούσα εργασία.

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

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

Χρησιμοποιήθηκαν το εμπορικό σκεύασμα Cellic® CTec2 της εταιρείας Novozymes (Δανία), το οποίο αποτελεί μίγμα κυτταρινασών και ξυλανάσης, και το σκεύασμα γλυκομυλάσης Spirizyme .

3. Προκατεργασία

Η δοθείσα πρώτη ύλη προκατεργάστηκε υδροθερμικά παρουσία αραιού διαλύματος θειικού οξέος. Σε κωνικές φιάλες, τύπου Erlenmeyer, όγκου 250ml, τοποθετούνταν 30 g ξηρών διατροφικών απορριμμάτων τα οποία προκατεργάζονταν παρουσία θειικού 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. Μικροοργανισμοί

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

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

- **Προκαλλιέργεια**

Η σύσταση του θρεπτικού μέσου προκαλλιέργειας ήταν (g/L) (Christakopoulos *et al.*, 1999):

KH ₂ PO ₄	(NH ₄) ₂ PO ₄	NaH ₂ PO ₄ ·2H ₂ O	Na ₂ HPO ₄ ·2H ₂ O	MgSO ₄ ·7H ₂ O	CaCl ₂ ·2H ₂ O	γλυκόζη
1.0	10.0	15.6	1.52	0.3	0.3	20.0

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.

- 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 ανάπτυξη του μύκητα σε στερεή καλλιέργεια, γνωστού και ως Toyama's mineral solution ήταν (g/L) :

(NH ₄) ₂ SO ₄	KH ₂ PO ₄	MgSO ₄ ·7H ₂ O	CaCl ₂ ·2H ₂ O
6	1.8	0.3	0.3

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 και η επώαση πραγματοποιήθηκε στους 30°C για 9 ημέρες. Δείγματα λαμβάνονταν σε τακτά χρονικά διαστήματα για τον προσδιορισμό της ενεργότητας των κυτταρινολυτικών και ημικυτταρινολυτικών ενζύμων. Όλα τα πειράματα πραγματοποιήθηκαν εις διπλούν.

6. Αλκοολική ζύμωση

Στην παρούσα εργασία μελετήθηκαν αποτελέσματα ζύμωσης μονοκαλλιέργειας του μύκητα *F. Oxysporum* F3 καθώς και μικτής καλλιέργειας ζύμης *Saccharomyces cerevisiae* και *F. Oxysporum* F3.

Μετά την προκατεργασία των διατροφικών απορριμμάτων ακολουθεί ρύθμιση του pH στην τιμή 5.5 με προσθήκη διαλύματος NaOH 10 N. Στη συνέχεια, γίνεται προσθήκη της αερόβιας καλλιέργειας του μύκητα *F. oxysporum* F3, ο οποίος έχει αναπτυχθεί για 6 μέρες σε στερεά κατάσταση. Οι κωνικές φιάλες τοποθετούνται σε θερμοστατούμενο επωαστήριο 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 το εμπορικό σκευάσμα γλυκοαμυλάσης Spirizyme έτσι ώστε το εξωγενώς προστιθέμενο ένζυμο να αντιστοιχεί σε 20, 40, 60 και 80 U/g αμύλου, ενώ σε άλλες καλλιέργειες προστέθηκε εξωγενής γλυκοαμυλάση συγκέντρωσης 40 και 60 U/g αμύλου καθώς και η ζύμη αρτοποιίας (15mg/g στερεού). Οι υπόλοιπες συνθήκες διατηρήθηκαν σταθερές όπως αναφέρεται παραπάνω. Επίσης μελετήθηκε η

επίδραση του σκευάσματος Cellic® CTec2 σε συγκέντρωση 4 FPU/g κυτταρίνης σε συνδυασμό με τη γλυκοαμυλάση Spiritzyme συγκέντρωσης 40 U/g αμύλου με την προσθήκη ζύμης αρτοποιίας.

Δείγματα λαμβάνονταν σε τακτά χρονικά διαστήματα, φυγοκεντρούνταν και αναλύονταν ως προς τα ολικά αναγωγικά σάκχαρα, τη γλυκόζη και την παραγόμενη αιθανόλη. Όλα τα πειράματα πραγματοποιήθηκαν εις διπλούν.

7. Εκχύλιση ενζύμων

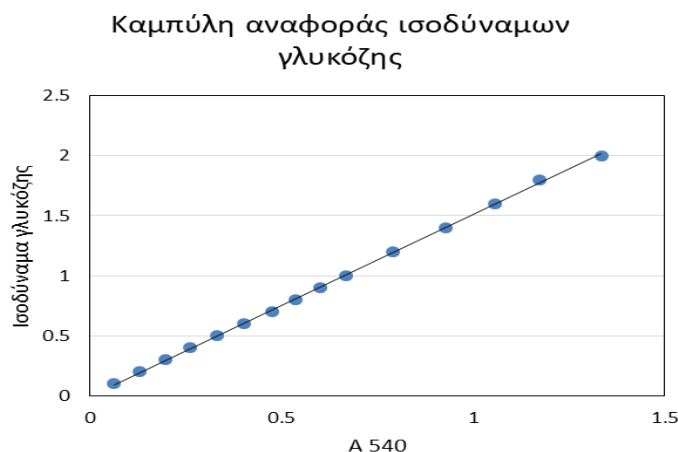
Για την εκχύλιση των ενζύμων από το στερεό υπόστρωμα, προστέθηκε 10πλάσιος από το βάρος του στερεού όγκος ($3\text{g} \times 10 = 30\text{ml}$) ρυθμιστικού διαλύματος κιτρικών/φωσφορικών 50 mM, pH 6.0 και οι φιάλες τοποθετήθηκαν σε περιστροφικό αναδευτήρα για 1 ώρα, σε θερμοκρασία 30°C. Ακολούθησε φυγοκέντρηση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

8. Ενζυμική υδρόλυση

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 γλυκοαμυλάσης Spiritzyme έτσι ώστε το εξωγενώς προστιθέμενο ένζυμο να αντιστοιχεί σε 0, 20, 40, 60 και 80 U/g αμύλου. 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, 18, 41, 69, 95 και 114 h) ύστερα από φυγοκέντρηση, μετρήθηκαν τα ολικά αναγωγικά σάκχαρα και η γλυκόζη. Όλα τα πειράματα πραγματοποιήθηκαν εις διπλούν.

9. Προσδιορισμός ολικών αναγωγικών σακχάρων

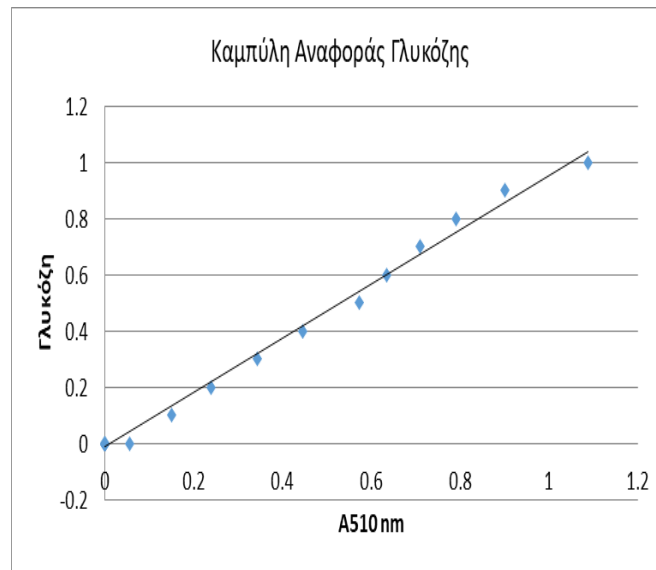
Ο προσδιορισμός των αναγωγικών σακχάρων πραγματοποιείται με τη φωτομετρική μέθοδο του 3,5-δινιτροσαλικυλικού οξέος (ή 2-υδρόξυ-3,5-δινιτροβενζοϊκό οξύ) (Miller, 1959). Στο **Διάγραμμα 1**, παρουσιάζεται η καμπύλη αναφοράς των αναγωγικών σακχάρων σε ισοδύναμα γλυκόζης. Η εξίσωση της καμπύλης είναι ίση με $y=1,5115 \cdot \text{ABS}_{540} - 0.0021$ ($R^2 = 0,9996$).



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

10. 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 $y=1,0159 \cdot ABS_{510} - 0,0473$ ($R^2=0,9925$).



Διάγραμμα 2 : Καμπύλη αναφοράς γλυκόζης

11. Μέτρηση ενεργότητας ενζύμων

Ως μονάδα ενζυμικής ενεργότητας (U) ορίζεται η ποσότητα του ενζύμου που απαιτείται για την απελευθέρωση ή υδρόλυση 1 μmol προϊόντος ή υποστρώματος αντίστοιχα στην μονάδα του χρόνου σε συγκεκριμένες συνθήκες θερμοκρασίας και pH (T=50 °C και pH 5.0). Η ενζυμική απόδοση εκφράστηκε σε U / g υποστρώματος.

Η ολική ενεργότητα κυτταρινασών (Filter Paper Activity) μετρήθηκε με επώαση των ενζύμων σε 50 mg χαρτί Filter Paper Whatman No1. Τα απελευθερωθέντα σάκχαρα μετρήθηκαν με τη μέθοδο του δινιτροσαλικυλικού οξέος (DNS) (Miller 1959).

Η ενεργότητα της εξωγλυκανάσης μετρήθηκε με επώαση του ενζύμου σε αιώρημα 2% (β/ο) μικροκρυσταλλικής κυτταρίνης Avicel® (Sigma). Τα απελευθερωθέντα σάκχαρα μετρήθηκαν, επίσης, με τη μέθοδο του δινιτροσαλικυλικού οξέος (DNS) (Miller 1959).

Η ενεργότητα της ενδογλυκανάσης προσδιορίστηκε με επώαση του ενζύμου σε 2% (β/ο) καρβοξυμεθυλοκυτταρίνη (CMC) χαμηλού ιξώδους. Τα απελευθερωθέντα σάκχαρα μετρήθηκαν με τη μέθοδο του δινιτροσαλικυλικού οξέος (DNS) (Miller 1959).

Η ενεργότητα της β-γλυκοζιδάσης προσδιορίστηκε με επώαση του ενζύμου σε 1mM 4-νιτροφαινυλ-β-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).

12. Μέτρηση αιθανόλης

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.

13. Ανάλυση σύστασης στερεού υπολείμματος ζύμωσης

13.1 Ανάκτηση στερεού υπολείμματος ζύμωσης (NREL/TP-510-42618)

Μετά το πέρας της ζύμωσης πραγματοποιήθηκε διήθηση υπό κενό, σε προζυγισμένο ηθμό. Το στερεό υπόλειμμα εκπλύθηκε δύο φορές και ο ηθμός τοποθετήθηκε στο φούρνο ξήρανσης για 16 ώρες σε θερμοκρασία 106 °C. Μετά το πέρας των 16 ωρών, μεταφέρθηκε σε ξηραντήρα (με silica gel) για τουλάχιστον 30 λεπτά προκειμένου να αποκτήσει θερμοκρασία περιβάλλοντος χωρίς να επαναπροσλάβει επιπλέον υγρασία. Τέλος, καταγράφηκε το βάρος ηθμού μαζί με το ξηρό πλέον δείγμα, και υπολογίστηκε η ανάκτηση του στερεού.

13.2 Προσδιορισμός κυτταρίνης/ημικυτταρίνης

Η ανάλυση του στερεού υπολείμματος της ζύμωσης ως προς την κυτταρίνη έγινε σύμφωνα με το πρωτόκολλο του NREL (NREL/TP-510-42618). Συνοπτικά, περιλάμβανε την όξινη υδρόλυση 300 mg ξηρού στερεού υπολείμματος με 3 mL διαλύματος 72% (β/β) θειικού οξέος για 60 λεπτά στους 30°C, έπειτα αραιώση με 84 mL απιονισμένο νερό και επώαση σε κλίβανο αποστείρωσης στους 121°C για 60 λεπτά. Ακολουθεί η εξουδετέρωση των διαλυμάτων με CaCO₃ και φυγοκέντρηση για 10 min στις 1000 rpm. Το διήθημα που συγκεντρώνεται οδηγείται προς ανάλυση με χρήση του kit για προσδιορισμό της συγκέντρωσης της γλυκόζης. (NREL/TP-510-42618).

13.3 Προσδιορισμός αμύλου

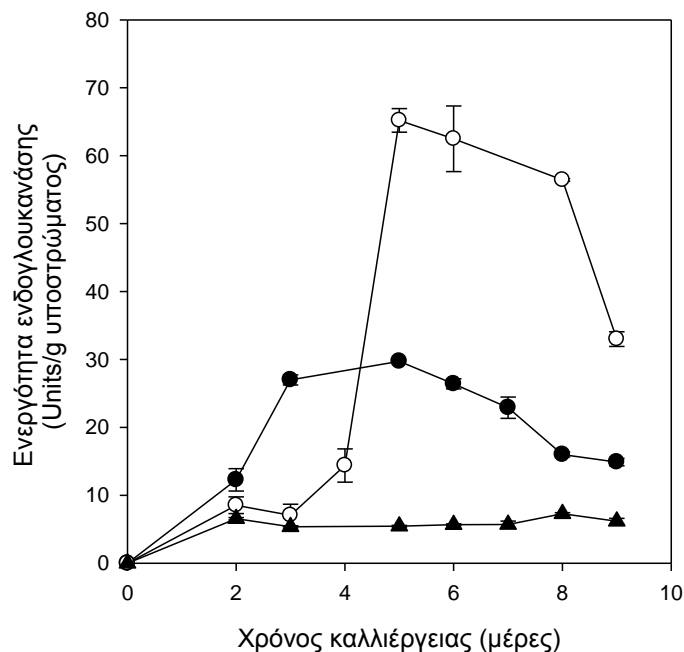
Ζυγίζονται 100 mg στερεού υπολείμματος και τοποθετούνται σε ειδικό δοκιμαστικό σωλήνα. Προστίθενται 5ml EtOH περιεκτικότητας 80% ο/ο, και το μίγμα αναδεύεται σε vortex. Ακολουθεί επώαση σε υδατόλουτρο στους 80-85°C για 5min. Γίνεται μετάγγιση σε falcon, προσθήκη 5ml EtOH 80% ο/ο και φυγοκέντρηση στις 3000rpm για 10min. Απομακρύνεται το υπερκείμενο και στο παραμένον στερεό προστίθενται 10 ml EtOH 80% (ο/ο) και μετά από ανάδευση επαναλαμβάνεται το βήμα της φυγοκέντρησης. Με τον τρόπο αυτό απομακρύνεται όλη η ελεύθερη γλυκόζη, αφού η αιθανόλη διαλυτοποιεί τα ελεύθερα σάκχαρα. Έπειτα, προστίθενται 3 ml

σκευάσματος α-αμυλάσης της εταιρίας Megazyme (1,600 U/mL σε αντιδραστήριο Ceralpha, αραιωμένο 1:30 σε ρυθμιστικό διάλυμα pH 5.0) και το μίγμα επωάζεται σε βραστό νερό για 6 min με ανάδευση ανα 2 min. Ακολουθεί προσθήκη 0.1 ml αμυλογλυκοζιδάσης (Megazyme, 330 U/ml σε διαλυτό άμυλο) και το μίγμα επωάζεται τους 50° C για 30min με ενδιάμεση ανάδευση (ανά 10min). Το περιεχόμενο αδειάζεται σε ογκομετρικό κύλινδρο των 100 ml και γίνεται ογκομέτρηση μέχρι τα 100 ml. Τέλος, έπειτα από ανάδευση και φυγοκέντρηση, μετράται η γλυκόζη που απελευθερώθηκε με χρήση kit.(AOAC Method 996.11).

Γ.ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

1. Παραγωγή κυτταρινολυτικών ενζύμων από το μύκητα *F. oxysporum* F3 με ζύμωση στερεάς κατάστασης.

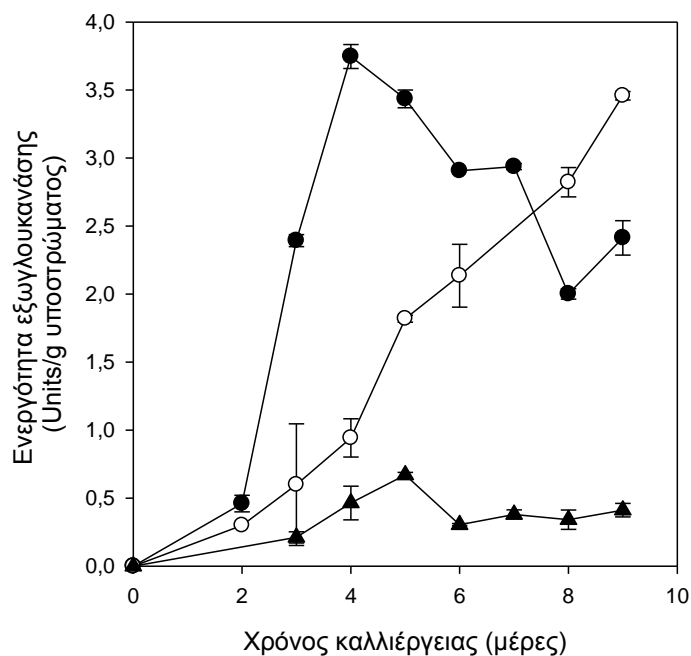
Στο πρώτο μέρος των πειραμάτων, μελετήθηκε η παραγωγή κυτταρινολυτικών ενζύμων (ενδογλυκανάση, εξωγλυκανάση και β-γλυκοζιδάση) από το *Fusarium oxysporum* F3. Στόχος της διεργασίας είναι η in situ παραγωγή συστήματος ενζύμων ικανών να υδρολύσουν τους πολυσακχαρίτες στόχους των διατροφικών απορριμμάτων, δηλ. κυτταρίνη, άμυλο και ημικυτταρίνη. Συνεπώς, εξετάστηκε η παραγωγή των ενζύμων με χρήση υποστρωμάτων χαμηλής αξίας: α) άχυρο σίτου (wheat straw), β) άξονας σπάδικα αραβοσίτου (corn cobs) και γ) πίτουρο σίτου (wheat bran). Ακολουθούν τα αποτελέσματα της παραγωγής των κυτταρινολυτικών και ημικυτταρινολυτικών ενζύμων, υπό μορφή πινάκων και διαγραμμάτων, καθώς και ο σχολιασμός και τα συμπεράσματα αυτών.



Διάγραμμα 3: Χρονική μεταβολή της παραγόμενης ενδογλυκανάσης από το μύκητα *F. oxysporum* F3, χρησιμοποιώντας ως πηγή άνθρακα άχυρο σίτου (●), πίτουρο σίτου (○) και σπάδικα αραβοσίτου (▲).

Πίνακας 3: Αναλυτική παρουσίαση της μεταβολής της ενεργότητας της ενδογλουκανάσης ανά ημέρα καλλιέργειας του μύκητα *Fusarium oxysporum* F3, στα υποστρώματα που χρησιμοποιήθηκαν (άχυρο σίτου, πίτουρο σίτου και σπάδικας αραβοσίτου).

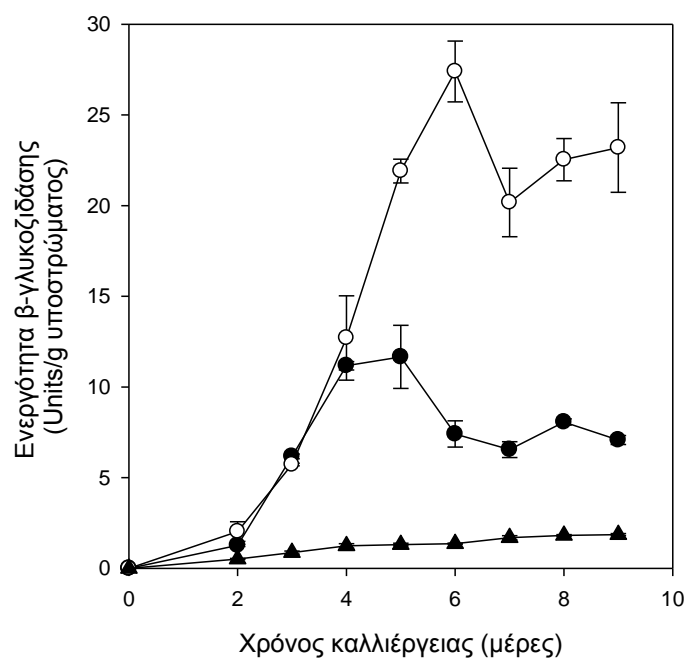
Χρόνος καλλιέργειας (d)	Άχυρο σίτου	Πίτουρο σίτου	Σπάδικας αραβοσίτου
2	12,26 ± 1,65	8,53 ± 1,23	6,55 ± 0,87
3	26,99 ± 0,74	7,06 ± 1,61	5,36 ± 0,16
4	19,58 ± 0,33	14,38 ± 2,45	7,98 ± 0,16
5	29,73 ± 0,00	65,20 ± 9,74	5,44 ± 0,12
6	26,4 ± 0,74	62,49 ± 4,83	5,68 ± 0,12
7	22,90 ± 1,57	43,28 ± 5,37	5,71 ± 0,49
8	16,00 ± 0,37	56,44 ± 0,19	7,28 ± 0,16
9	14,89 ± 0,54	33,00 ± 1,07	6,17 ± 0,74



Διάγραμμα 4: Χρονική μεταβολή της παραγόμενης ενδογλουκανάσης από το μύκητα *F. oxysporum* F3, χρησιμοποιώντας ως πηγή άνθρακα άχυρο σίτου (●), πίτουρο σίτου (○) και σπάδικα αραβοσίτου (▲).

Πίνακας 4: Αναλυτική παρουσίαση της μεταβολής της ενεργότητας της εξωγλουκανάσης ανά ημέρα καλλιέργειας του μύκητα *Fusarium oxysporum* F3, στα υποστρώματα που χρησιμοποιήθηκαν (άχυρο σίτου, πίτουρο σίτου και σπάδικας αραβοσίτου).

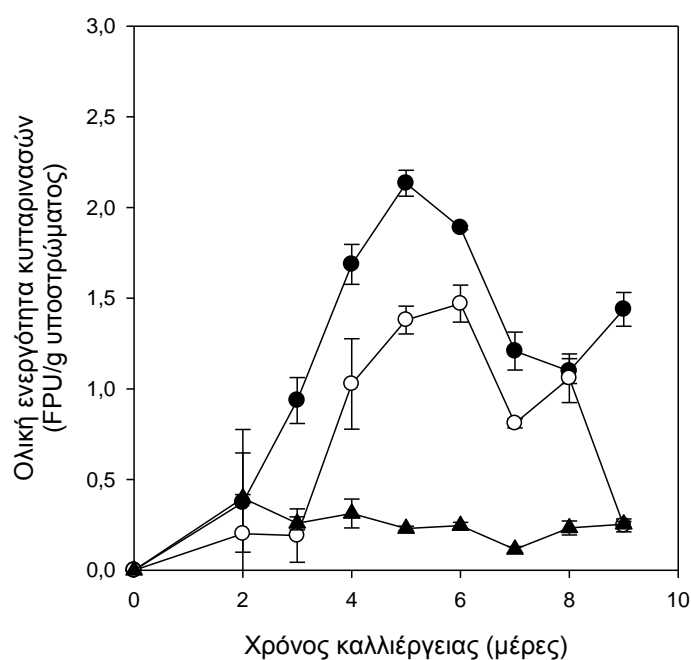
Χρόνος καλλιέργειας (d)	Άχυρο σίτου	Πίτουρο σίτου	Σπάδικας αραβοσίτου
2	0,46 ± 0,06	0	0,92 ± 0,15
3	2,39 ± 0,04	0,94 ± 0,45	0,21 ± 0,04
4	3,75 ± 0,09	0,60 ± 0,14	0,46 ± 0,12
5	3,43 ± 0,07	1,82 ± 0,03	0,67 ± 0,02
6	2,91 ± 0,00	2,14 ± 0,83	0,30 ± 0,01
7	2,94 ± 0,02	0,88 ± 0,31	0,38 ± 0,03
8	2,00 ± 0,04	2,82 ± 0,91	0,34 ± 0,07
9	2,41 ± 0,13	3,46 ± 0,03	0,41 ± 0,05



Διάγραμμα 5: Χρονική μεταβολή της παραγόμενης β-γλυκοζιδάσης από το μύκητα *F. oxysporum* F3, χρησιμοποιώντας ως πηγή άνθρακα άχυρο σίτου (●), πίτουρο σίτου (○) και σπάδικα αραβοσίτου (▲).

Πίνακας 5: Αναλυτική παρουσίαση της μεταβολής της ενεργότητας της β-γλυκοζιδάσης ανά ημέρα καλλιέργειας του μύκητα *Fusarium oxysporum* F3, στα υποστρώματα που χρησιμοποιήθηκαν (άχυρο σίτου, πίτουρο σίτου και σπάδικας αραβοσίτου).

Χρόνος καλλιέργειας (d)	Άχυρο σίτου	Πίτουρο σίτου	Σπάδικας αραβοσίτου
2	1,27 ± 0,06	2,02 ± 0,54	0,52 ± 0,03
3	6,17 ± 0,13	5,72 ± 0,07	0,87 ± 0,09
4	11,17 ± 0,23	12,71 ± 2,32	1,24 ± 0,12
5	11,66 ± 1,74	21,91 ± 0,65	1,31 ± 0,07
6	7,41 ± 0,73	17,39 ± 3,68	1,36 ± 0,03
7	6,55 ± 0,44	20,17 ± 1,89	1,69 ± 0,12
8	8,07 ± 0,17	22,53 ± 1,16	1,81 ± 0,05
9	7,07 ± 0,25	23,20 ± 2,47	1,86 ± 0,05



Διάγραμμα 6: Χρονική μεταβολή της παραγόμενης ολικής ενεργότητας κυτταρινασών από το μύκητα *F. oxysporum* F3, χρησιμοποιώντας ως πηγή άνθρακα άχυρο σίτου (●), πίτουρο σίτου (○) και σπάδικα αραβοσίτου (▲).

Πίνακας 6: Αναλυτική παρουσίαση της μεταβολής της ολικής ενεργότητας των κυτταρινασών ανά ημέρα καλλιέργειας του μύκητα *Fusarium oxysporum* F3, στα

υποστρώματα που χρησιμοποιήθηκαν (άχυρο σίτου, πίτουρο σίτου και σπάδικας αραβοσίτου).

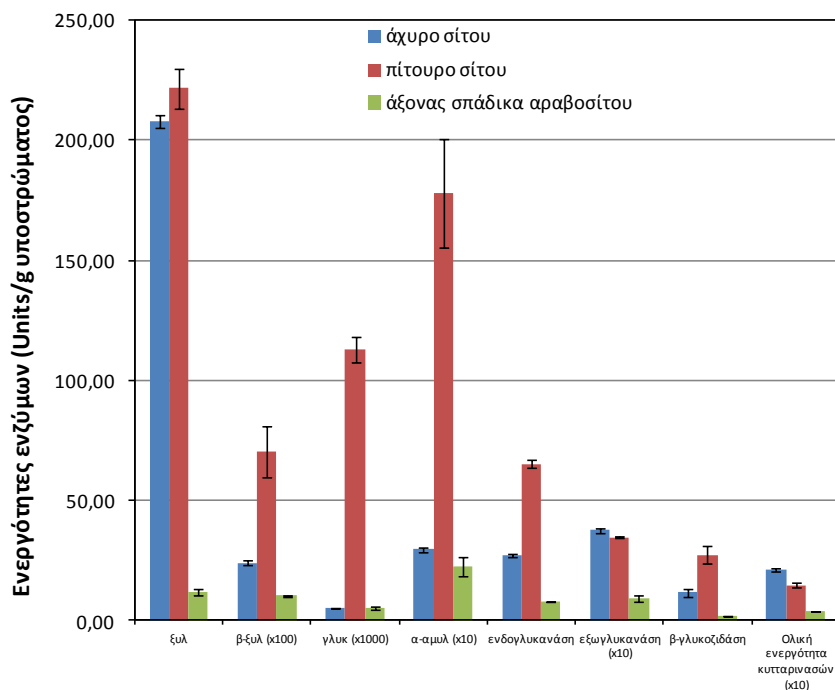
Χρόνος καλλιέργειας (d)	Άχυρο σίτου	Πίτουρο σίτου	Σπάδικας αραβοσίτου
2	0,37 ± 0,27	0,20 ± 0,58	0,40 ± 0,02
3	0,94 ± 0,13	0,19 ± 0,15	0,26 ± 0,04
4	1,69 ± 0,11	1,03 ± 0,55	0,31 ± 0,08
5	2,13 ± 0,07	1,38 ± 0,08	0,23 ± 0,01
6	1,89 ± 0,01	1,47 ± 0,10	0,25 ± 0,02
7	1,21 ± 0,10	0,81 ± 0,03	0,11 ± 0,02
8	1,10 ± 0,07	1,06 ± 0,13	0,23 ± 0,04
9	1,44 ± 0,09	0,25 ± 0,04	0,25 ± 0,02

Κατά την καλλιέργεια του μύκητα *Fusarium oxysporum* F3 σε υπόστρωμα άχυρο σίτου, η μέγιστη τιμή ενεργότητας της ενδογλυκανάσης (26,99 U/g υποστρώματος) παρατηρήθηκε την 3^η μέρα, όπως και αυτή της εξωγλυκανάσης (3,75 U/g υποστρώματος). Την 4^η μέρα καλλιέργειας η ενεργότητα του ενζύμου β-γλυκοζιδάση καθώς και η ολική ενεργότητα κυτταρινασών έλαβαν τη μέγιστη τιμή τους (11,66 U/g υποστρώματος και 2,13 U/g υποστρώματος αντίστοιχα).

Όταν ως πηγή άνθρακα στην ζύμωση στερεάς κατάστασης του μύκητα *Fusarium oxysporum* F3 χρησιμοποιήθηκε σπάδικας αραβοσίτου, οι τιμές των ενεργοτήτων των κυτταρινολυτικών ενζύμων ήταν σχετικά χαμηλές. Για την ενδογλυκανάση, η μέγιστη τιμή ήταν 7,98 U/g υποστρώματος, την 4^η μέρα καλλιέργειας, για την εξωγλυκανάση 0,92 U/g υποστρώματος, την 2^η μέρα καλλιέργειας, για τη β-γλυκοζιδάση 1,86 U/g υποστρώματος την 9^η μέρα καλλιέργειας, ενώ η μέγιστη τιμή ολικής ενεργότητας κυτταρινασών ήταν 0,40 U/g υποστρώματος και παρατηρήθηκε την 2^η μέρα καλλιέργειας.

Οι υψηλότερες τιμές ενεργότητας της ενδογλυκανάσης (65,20 U/g υποστρώματος, 4^η μέρα καλλιέργειας) και της β-γλυκοζιδάσης (23,20 U/g υποστρώματος, 9^η μέρα καλλιέργειας) παρατηρήθηκαν όταν ως πηγή άνθρακα στη ΖΣΚ χρησιμοποιήθηκε το πίτουρο σίτου. Οι μέγιστες τιμές ενεργότητας της εξωγλυκανάσης ήταν 3,46 U/g υποστρώματος την 9^η μέρα καλλιέργειας και της ολικής ενεργότητας κυτταρινασών 1,47 U/g υποστρώματος την 6^η μέρα καλλιέργειας κατά την ανάπτυξη του μύκητα σε πίτουρο σίτου.

Στο **Διάγραμμα 7** και στον Πίνακα 7 παρουσιάζονται οι μέγιστες τιμές των ενεργοτήτων των κυτταρινολυτικών ενζύμων καθώς και ημικυτταρινολυτικών και αμυλολυτικών ενζύμων (τα αποτελέσματα των ημικυτταρινολυτικών και αμυλολυτικών ενζύμων ελήφθησαν από τη Διπλωματική Εργασία του Άγγελου-Θεόδωρου Γεντίκη) και που επιτεύχθηκαν στα διαφορετικά υποστρώματα.



Διάγραμμα 7: Συγκριτική απεικόνιση των ενεργοτήτων των ενζύμων ξυλανάση (ξυλ), β-ξυλοζιδάση (β-ξυλ), γλυκοαμυλάση (γλυκ), α-αμυλάση (α-αμυλ), ενδογλυκανάση, εξωγλυκανάση, β-γλυκοζιδάση και ολική ενεργότητα κυτταρινασών στα διαφορετικά υποστρώματα (άχυρο σίτου, πίτουρο σίτου, άξονας σπάδικα αραβοσίτου).

Πίνακας 7: Οι μέγιστες ενεργότητες ενζύμων που επιτυγχάνονται ανά υπόστρωμα
Ενεργότητα (Units/g πηγής άνθρακα)

Ένζυμα	Άχυρο σίτου	Πίτουρο σίτου	Άξονας σπάδικα αραβοσίτου
ενδογλυκανάση	26,99 ± 0,74	65,20 ± 1,74	7,98 ± 0,16
εξωγλυκανάση	3,75 ± 0,09	3,46 ± 0,03	0,92 ± 0,15
β-γλυκοζιδάση	11,66 ± 1,74	27,39 ± 3,68	1,86 ± 0,05
ολική ενεργότητα κυτταρινασών	2,13 ± 0,07	1,47 ± 0,10	0,40 ± 0,02
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

Οι υψηλότερες τιμές ενεργότητας, για όλα τα εξεταζόμενα ένζυμα, εμφανίζονται, όταν χρησιμοποιείται ως υπόστρωμα το πίτουρο σίτου. Η ύπαρξη σημαντικής ποσότητας αμύλου στο πίτουρο σίτου (Πίνακας 8) επάγει τη σύνθεση των αμυλολυτικών ενζύμων σε σχέση με τα άλλα δύο υποστρώματα (Πίνακας 8).

Πίνακας 8. Σύσταση λιγνινοκυτταρινούχων υποστρωμάτων

	Κυτταρίνη	Ημικυτταρίνη	Άμυλο
Πίτουρο σίτου	7,39 ± 0,75	21,10 ± 2.03	14,63 ± 0,04
Άχυρο σίτου¹	39,73	25,77	Δ.Α. ³
Άξονας σπάδικα αραβόσιτου²	35,9	32,7	Δ.Α. ³

¹G. A. Helal, Bioconversion of Straw Into Improved Fodder: Mycoprotein Production and Cellulolytic Activity of Rice Straw Decomposing Fungi. *Mycobiology*. 2005 Jun;33(2):90-96.

² Du Ruoyu, Su Rongxin, Zhang Mingjia, Qi Wei, He Zhimin, Cellulase Recycling after High-Solids Simultaneous Saccharification and Fermentation of Combined Pretreated Corncob, *Frontiers in Energy Research*, 2 (2014), DOI=10.3389/fenrg.2014.00024

³ Δ.Α. Δεν αναφέρεται

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

2. Επίδραση της προκατεργασίας στην παραγωγή βιοαιθανόλης

Πραγματοποιήθηκε μελέτη της επίδρασης διαφόρων συνθηκών προκατεργασίας στην παραγωγή βιοαιθανόλης. Ο μύκητας *F. oxysporum* F3 αναπτύχθηκε αερόβια σε ΖΣΚ χρησιμοποιώντας πίτουρο σίτου ως πηγή. Οι ενεργότητες των κυτταρινολυτικών, ημικυτταρινολυτικών και αμυλολυτικών ενζύμων (τα αποτελέσματα των ημικυτταρινολυτικών και αμυλολυτικών ενζύμων ελήφθησαν από τη Διπλωματική Εργασία του Άγγελου-Θεόδωρου Γεντίκη) που παρήχθησαν παρουσιάζονται στον Πίνακα 7.

Πίνακας 9: 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	2.14
β-Γλυκοζιδάση	27.39
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 (οC), διατηρώντας το χρόνο προκατεργασίας στις 3 ώρες.

Πίνακας 10: 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 βιοαιαθανόλης χρησιμοποιήθηκε μονοκαλλιέργεια του μύκητα *F. oxysporum* F3. 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).

Με βάση τη σύσταση των ξηρών διατροφικών απορριμμάτων (Πίνακας 2) και τη σύσταση του υπολείμματος της ζύμωσης στερεάς κατάστασης (Πίνακας 11) η μέγιστη θεωρητική απόδοση αιθανόλης από τη πλήρη βιομετατροπή των σακχαρόζη, άμυλο, κυτταρίνη και ημικυτταρίνη παρουσιάζεται στον Πίνακα 12.

Πίνακας 11. Σύσταση στερεού υπολείμματος ζύμωσης στερεάς κατάστασης. Ανάκτηση στερεού: 71.90 ± 6.98%.

Συστατικό	(%, β/β, ξηρή βάση)*
Άμυλο	21,53 ± 0,52
Κυτταρίνη	δ.α.
Ημικυτταρίνη	38,95 ± 2,35

* g/100 g στερεού υπολείμματος

Πίνακας 12. Θεωρητική απόδοση αιθανόλης με βάση το περιεχόμενο των διατροφικών απορριμμάτων σε σακχαρόζη και πολυσακχαρίτες.

Συστατικό	Αιθανόλη (g/100 g ξηρών διατροφικών απορριμμάτων)
Σακχαρόζη ¹	0.25
Άμυλο ²	6.63
Κυτταρίνη ²	5.31
Ημικυτταρίνη ³	8.03
Σύνολο	20.24

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

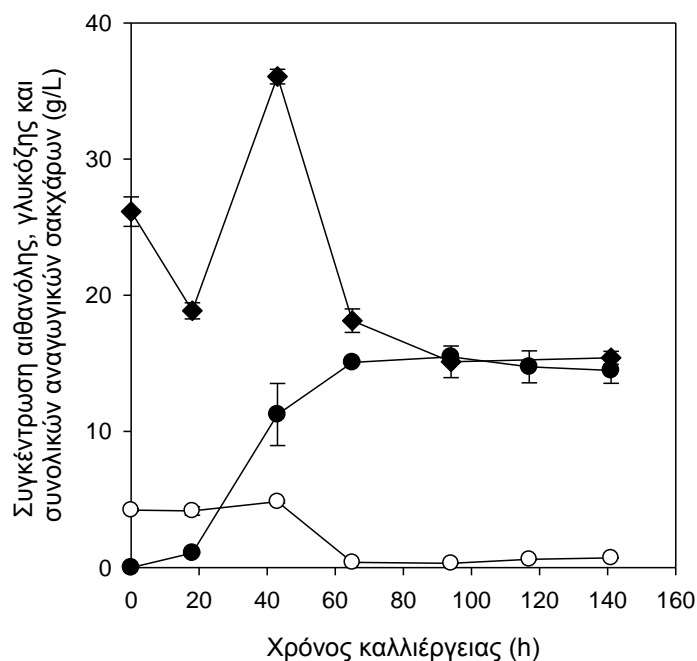
² Ο συντελεστής μετατροπής κυτταρίνης και αμύλου σε γλυκόζη είναι 1.11 και ο θεωρητικός συντελεστής μετατροπής της γλυκόζης σε αιθανόλη είναι $Y_{\text{αιθανόλης/γλυκόζη}}=0.511$

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

Το συνολικό ενζυμικό φορτίο κατά την αλκοολική ζύμωση παρουσιάζεται στον Πίνακα 13.

Πίνακας 13: Ολικό ενζυμικό φορτίο κυτταρινολυτικών και αμυλολυτικών ενζύμων

Ολικό κυτταρινολυτικό φορτίο (FPU/g κυτταρίνης ΔΑ)	Ολικό φορτίο αμυλασών (U/g αμύλου ΔΑ)	
	α-αμυλάση	Γλυκοαμυλάση
1.47	10.45	0.11



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

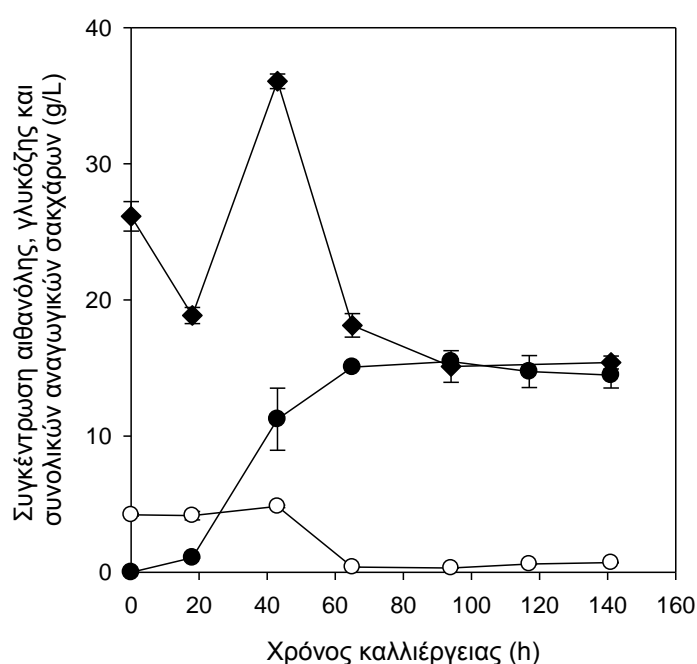
Πίνακας 14. Βιομετατροπή προκατεργασμένων ξηρών διατροφικών απορριμμάτων, με μονοκαλλιέργεια του μύκητα *F. oxysporum* F3, αναπτυχθέντος αερόβια, σε ΖΣΚ και πηγή άνθρακα πίτουρο σίτου. Συνθήκες προκατεργασίας διατροφικών απορριμμάτων: θερμοκρασία 90°C, χρόνος προκατεργασίας 3h, συγκέντρωση θειικού οξέος 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	4,06 ± 0,01	29,12 ± 0,0
18	0,75 ± 0,35	0,27 ± 0,11	0,23 ± 0,09	5,61 ± 0,27	19,35 ± 1,08
43	12,79 ± 1,42	4,67 ± 0,52	3,91 ± 0,43	4,56 ± 0,09	34,42 ± 2,10
65	14,44 ± 0,09	5,27 ± 0,03	4,41 ± 0,03	0,33 ± 0,0	17,14 ± 1,62
94	16,54 ± 0,69	6,04 ± 0,25	5,05 ± 0,21	0,36 ± 0,0	16,16 ± 0,38
117	17,01 ± 1,08	6,21 ± 0,39	5,19 ± 0,33	0,72 ± 0,0	-
141	16,95 ± 0,98	6,19 ± 0,36	5,17 ± 0,30	0,81 ± 0,0	15,26 ± 1,10

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 μονοκαλλιέργεια του μύκητα *F. oxysporum* F3 αναπτυχθέντος αερόβια σε ΖΣΚ και πηγή άνθρακα πίτυρο σίτου. Συνθήκες προκατεργασίας διατροφικών απορριμμάτων: θερμοκρασία 90°C, χρόνος προκατεργασίας ? h, συγκέντρωση θειικού οξέος 3% β/β.

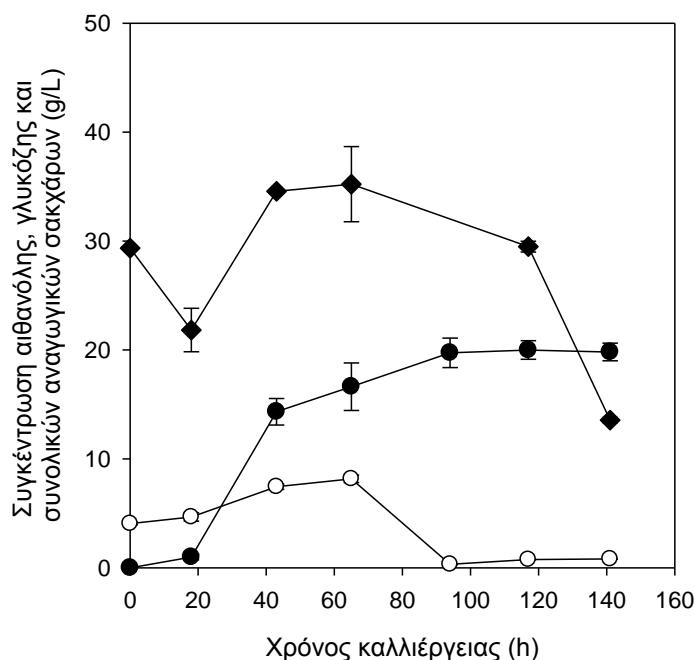
Πίνακας 15. Βιομετατροπή προκατεργασμένων ξηρών διατροφικών απορριμμάτων, με μονοκαλλιέργεια του μύκητα *F. oxysporum* F3, αναπτυχθέντος αερόβια, σε ΖΣΚ και πηγή άνθρακα πίτυρο σίτου. Συνθήκες προκατεργασίας διατροφικών απορριμμάτων: θερμοκρασία 90°C, χρόνος προκατεργασίας 3h, συγκέντρωση θειικού οξέος 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	4,22 ± 0,09	26,14 ± 1,08
18	1,07 ± 0,05	0,39 ± 0,02	0,36 ± 0,02	4,16 ± 0,31	18,86 ± 0,59
43	11,24 ± 2,28	4,11 ± 0,83	3,73 ± 0,76	4,84 ± 0,09	36,06 ± 0,54
65	15,06 ± 0,11	5,50 ± 0,04	5,00 ± 0,04	0,38 ± 0,01	18,13 ± 0,86
94	15,48 ± 0,20	5,65 ± 0,07	5,14 ± 0,07	0,31 ± 0,01	15,11 ± 1,16
117	14,74 ± 1,18	5,38 ± 0,43	4,89 ± 0,39	0,60 ± 0,05	-

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

² Απόδοση εκφρασμένη σε g αιθανόλης/100g 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 μονοκαλλιέργεια του μύκητα *F. oxysporum* F3 αναπτυχθέντος αερόβια σε ΖΣΚ και πηγή άνθρακα πίτυρο σίτου. Συνθήκες προκατεργασίας διατροφικών απορριμμάτων: θερμοκρασία 100°C, χρόνος προκατεργασίας 3 h, συγκέντρωση θειικού οξέος 1% β/β.

Πίνακας 16. Βιομετατροπή προκατεργασμένων ξηρών διατροφικών απορριμμάτων, με μονοκαλλιέργεια του μύκητα *F. oxysporum* F3, αναπτυχθέντος αερόβια, σε ΖΣΚ και πηγή άνθρακα πίτυρο σίτου. Συνθήκες προκατεργασίας διατροφικών απορριμμάτων: θερμοκρασία 100°C, χρόνος προκατεργασίας 3h, συγκέντρωση θειικού οξέος 1% β/β.

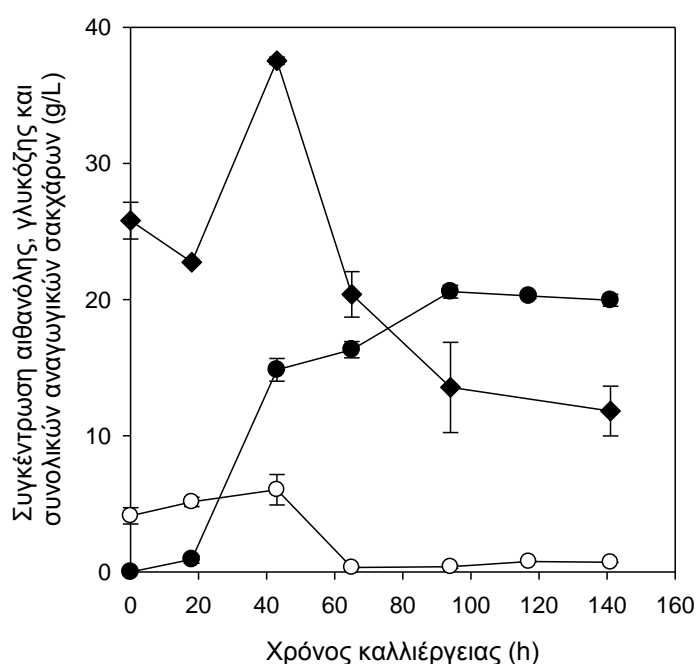
Χρόνος ζύμωσης (h)	Αιθανόλη (g/L)	Απόδοση ¹	Απόδοση ²	Γλυκόζη (g/L)	TRS ³ (g/L)
0	0	0	0	4,06 ± 0,11	29,35 ± 0,11
18	0,99 ± 0,26	0,36 ± 0,09	0,33 ± 0,09	4,67 ± 0,38	21,83 ± 2,00
43	14,33 ± 1,22	5,23 ± 0,45	4,76 ± 0,41	7,44 ± 0,24	34,75 ± 0,16
65	16,63 ± 2,17	6,07 ± 0,79	5,52 ± 0,72	8,17 ± 0,34	35,22 ± 3,45

94	19,73 ± 1,35	7,21 ± 0,49	6,55 ± 0,45	0,32 ± 0,05	14,08 ± 0,30
117	20,00 ± 0,85	7,30 ± 0,31	6,64 ± 0,28	0,76 ± 0,04	29,49 ± 0,50
141	19,81 ± 0,81	7,23 ± 0,30	6,58 ± 0,27	0,82 ± 0,02	13,55 ± 0,24

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

² Απόδοση εκφρασμένη σε g αιθανόλης/100g 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 μονοκαλλιέργεια του μύκητα *F. oxysporum* F3 αναπτυχθέντος αερόβια σε ΖΣΚ και πηγή άνθρακα πίτουρο σίτου. Συνθήκες προκατεργασίας διατροφικών απορριμμάτων: θερμοκρασία 100°C, χρόνος προκατεργασίας 3 h, συγκέντρωση θειικού οξέος 2% β/β.

Πίνακας 17. Βιομετατροπή προκατεργασμένων ξηρών διατροφικών απορριμμάτων, με μονοκαλλιέργεια του μύκητα *F. oxysporum* F3, αναπτυχθέντος αερόβια, σε ΖΣΚ και πηγή άνθρακα πίτουρο σίτου. Συνθήκες προκατεργασίας διατροφικών απορριμμάτων: θερμοκρασία 100°C, χρόνος προκατεργασίας 3h, συγκέντρωση θειικού οξέος 2% β/β.

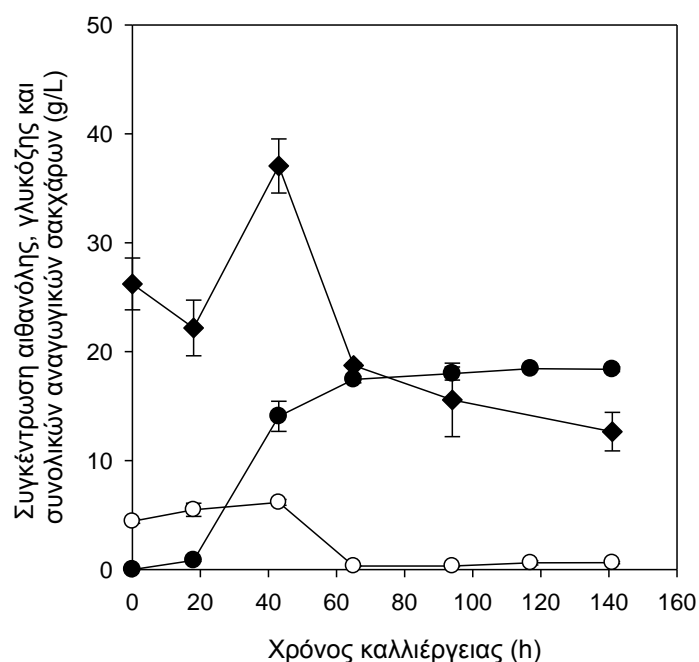
Χρόνος ζύμωσης (h)	Αιθανόλη (g/L)	Απόδοση ¹	Απόδοση ²	Γλυκόζη (g/L)	TRS ³ (g/L)
0	0	0	0	4,11 ± 0,60	25,8 ± 1,35
18	0,92 ± 0,28	0,33 ± 0,10	0,30 ± 0,09	5,14 ± 0,34	22,75 ± 0,16

43	14,84 ± 0,84	5,42 ± 0,31	4,93 ± 0,28	6,03 ± 1,12	37,55 ± 0,27
65	16,32 ± 0,59	5,96 ± 0,22	5,42 ± 0,20	0,32 ± 0,01	20,38 ± 1,67
94	20,58 ± 0,47	7,51 ± 0,17	6,83 ± 0,16	0,38 ± 0,12	13,55 ± 3,32
117	20,27 ± 0,18	7,40 ± 0,07	6,73 ± 0,06	0,76 ± 0,04	25,41 ± 6,26
141	19,95 ± 0,44	7,29 ± 0,16	6,62 ± 0,15	0,71 ± 0,00	11,81 ± 1,83

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

² Απόδοση εκφρασμένη σε g αιθανόλης/100g 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 μονοκαλλιέργεια του μύκητα *F. oxysporum* F3 αναπτυχθέντος αερόβια σε ΖΣΚ και πηγή άνθρακα πίτουρο σίτου. Συνθήκες προκατεργασίας διατροφικών απορριμμάτων: θερμοκρασία 100°C, χρόνος προκατεργασίας 3 h, συγκέντρωση θειικού οξέος 2% β/β.

Πίνακας 18. Βιομετατροπή προκατεργασμένων ξηρών διατροφικών απορριμμάτων, με μονοκαλλιέργεια του μύκητα *F. oxysporum* F3, αναπτυχθέντος αερόβια, σε ΖΣΚ και πηγή άνθρακα πίτουρο σίτου. 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	0	0	4,43 ± 0,19	26,22 ± 2,37
18	0,84 ± 0,10	0,31 ± 0,03	0,28 ± 0,03	5,48 ± 0,61	22,17 ± 7,55
43	14,06 ± 1,38	5,13 ± 0,50	4,67 ± 0,46	6,16 ± 0,27	37,05 ± 2,48
65	17,44 ± 0,30	6,37 ± 0,11	5,79 ± 0,10	0,31 ± 0,03	18,74 ± 0,22
94	17,99 ± 0,60	6,57 ± 0,22	5,97 ± 0,20	0,32 ± 0,05	15,57 ± 3,37
117	18,44 ± 0,11	6,73 ± 0,04	6,12 ± 0,04	0,61 ± 0,19	30,77 ± 1,14
141	18,39 ± 0,22	6,71 ± 0,08	6,10 ± 0,07	0,62 ± 0,10	12,65 ± 1,77

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

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

³ TRS: Total Reducing Sugars (ολικά αναγωγικά σάκχαρα)

Σε όλες τις εξετασθείσες περιπτώσεις τις πρώτες 18 ώρες καλλιέργειας παρατηρήθηκε χαμηλός ρυθμός παραγωγής αιθανόλης. Μέγιστος ρυθμός παραγωγής αιθανόλης παρατηρήθηκε στο διάστημα 18-43 ωρών. Δεν ανιχνεύτηκε γλυκόζη μετά το πέρας της ζύμωσης.

Οι μέγιστες επιτευχθείσες τιμές αιθανόλης συναρτήσει της έντασης της προκατεργασίας παρουσιάζονται στον Πίνακα 19.

Πίνακας 19: Μέγιστες τιμές αιθανόλης συναρτήσει της έντασης της προκατεργασίας κατά τη βιομετατροπή ξηρών διατροφικών απορριμμάτων με μονοκαλλιέργεια του μύκητα *F. oxysporum* F3

Προκατεργασία Θερμοκρασία (°C)/C _{H2SO4} (% β/β)	Αιθανόλη (g/L)	Απόδοση ¹ (g/100 g προκ. FW)	Απόδοση ² (g/100 g FW+WB)	Ποσοστό επί της μέγιστης θεωρητικής (%) ³
90/1	17,01 ± 1,02	6,21 ± 0,39	5,19 ± 0,33	30,69 ± 1,95
90/3	15,48 ± 0,20	5,65 ± 0,07	5,14 ± 0,07	27,92 ± 0,36
100/1	20,00 ± 0,85	7,30 ± 0,31	6,64 ± 0,28	36,08 ± 1,65
100/2	20,58 ± 0,47	7,51 ± 0,17	6,83 ± 0,16	37,13 ± 0,85
100/3	18,44 ± 0,11	6,73 ± 0,04	6,12 ± 0,04	33,26 ± 0,20

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

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

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

Η 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 παρουσίασε μία ελαφρά μείωση με αύξηση του οξέος. Αύξηση της θερμοκρασίας στους 100°C οδηγεί σε αύξηση της παραγόμενης αιθανόλης στα 20.58 g/L (7.51 g /100 g ξηρών ΔΑ, ή 37.13% της μέγιστης θεωρητικής απόδοσης) για συγκέντρωση οξέος 2% (β/β). Θα πρέπει να σημειωθεί ότι όπως και στην περίπτωση των 90°C η παραγόμενη αιθανόλη στη μέγιστη

συγκέντρωση του οξέος παρουσίασε μία ελαφρά μείωση. Επιλέχτηκε η προκατεργασία σε θερμοκρασία 100οC παρουσία 2 g H₂SO₄/100 g ξηρών ΔΑ για 3 h για τα επόμενα πειράματα.

3. Επίδραση του εξωγενώς προστιθέμενου ενζυμικού σκευάσματος Spirizyme® Fuel

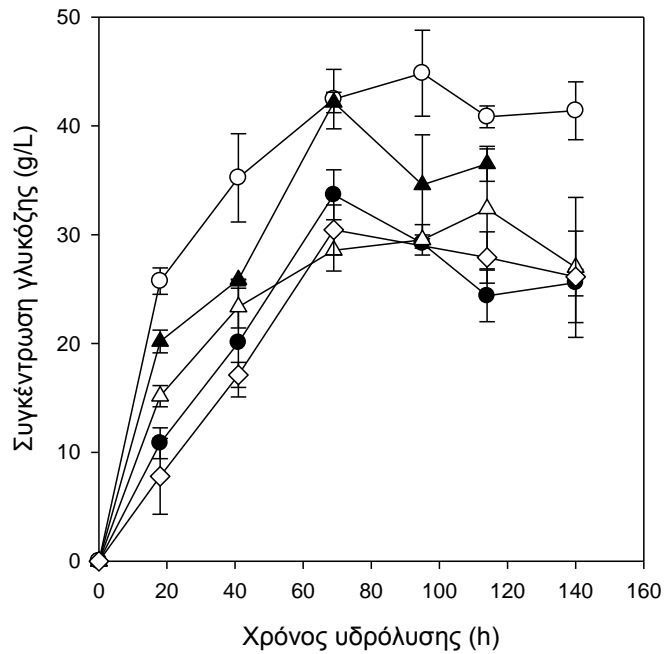
Με στόχο τη βελτίωση των αποδόσεων μελετήθηκε η επίδραση της προσθήκης του αμυλολυτικού σκευάσματος Spirizyme® Fuel (εμπορικό σκεύασμα γλυκοαμυλάσης της εταιρείας Novozymes). Εξετάστηκε η επίδραση της προσθήκης 0, 20, 40, 60 και 80 Units/g αμύλου ΔΑ Spirizyme® Fuel. Ανά συνθήκη το συνολικό ενζυμικό φορτίο (το φορτίο που προέρχεται από το αερόβιο στάδιο της ανάπτυξης του μύκητα *F. oxysporum* F3 + το φορτίο που προστίθεται εξωγενώς) παρουσιάζεται στον Πίνακα 20.

Πίνακας 20: Ολικό ενζυμικό φορτίο κυτταρινολυτικών και αμυλολυτικών ενζύμων

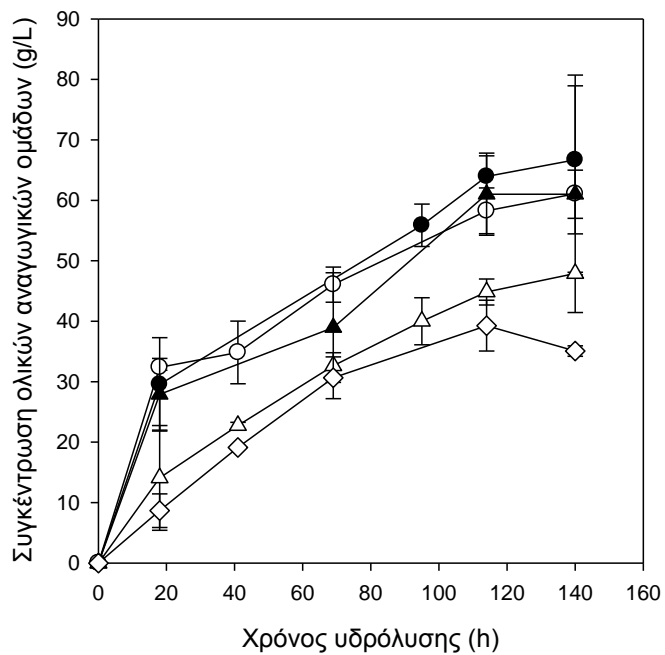
Προστιθέμενο φορτίο από Spirizyme® Fuel	Ολικό κυτταρινολυτικό φορτίο (FPU/g κυτταρίνης ΔΑ)	Ολικό φορτίο αμυλασών (U/g αμύλου ΔΑ)	
		α-αμυλάση	Γλυκοαμυλάση
0	1.47	10.45	0.11
20	1.47	10.45	20.11
40	1.47	10.45	40.11
60	1.47	10.45	60.11
80	1.47	10.45	80.11

3.1 Ενζυμική υδρόλυση

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



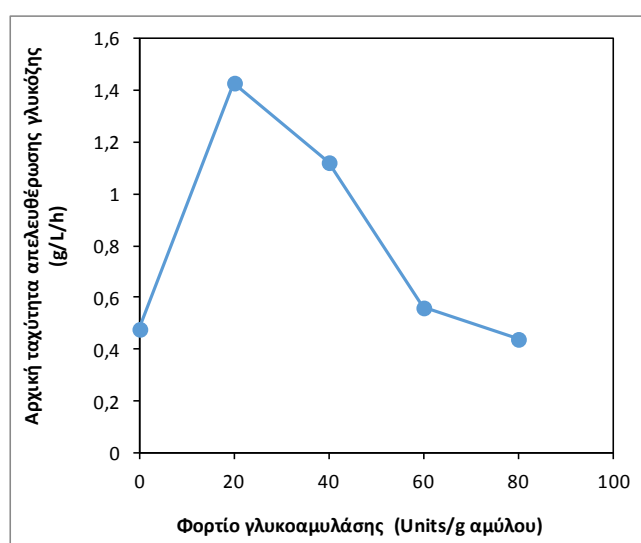
Διάγραμμα 13: Χρονική μεταβολή συγκέντρωσης (g/L) γλυκόζης κατά την υδρόλυση προκατεργασμένων ξηρών διατροφικών απορριμμάτων, από το ενζυμικό σύστημα του μύκητα *F. oxysporum* F3, αναπτυχθέντος αερόβια, σε ΖΣΚ και πηγή άνθρακα πίτουρο σίτου (●), που έχει ενισχυθεί με προσθήκη 20 (○), 40 (▲), 60 (△) και 80 (◇) Units/g αμύλου γλυκοαμυλάσης Spirizyme® Fuel.



Διάγραμμα 14 : Χρονική μεταβολή συγκέντρωσης (g/L) συνολικών αναγωγικών ομάδων κατά την υδρόλυση προκατεργασμένων ξηρών διατροφικών απορριμμάτων, από το ενζυμικό σύστημα του μύκητα *F. oxysporum* F3, αναπτυχθέντος αερόβια, σε ΖΣΚ και πηγή άνθρακα πίτουρο σίτου (●), που έχει

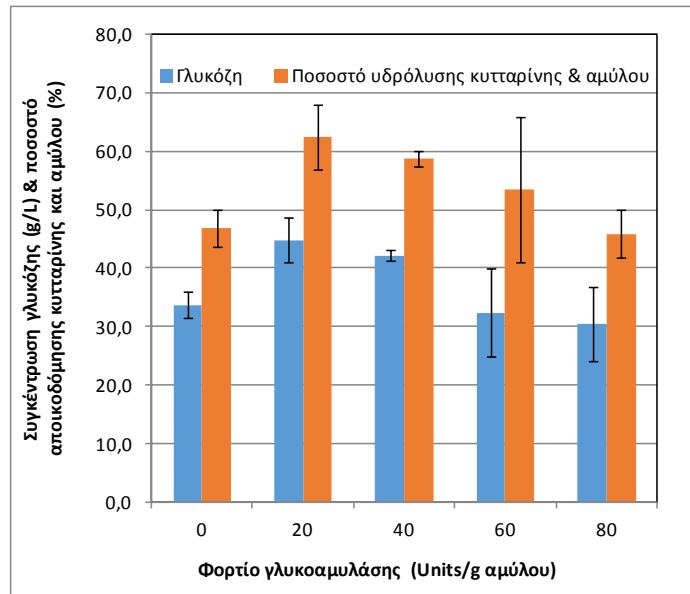
ενισχυθεί με προσθήκη 20 (○), 40 (▲), 60 (△) και 80 (◇) Units/g αμύλου γλυκοαμυλάσης Spirizyme® Fuel.

Σε όλες τις περιπτώσεις που εξετάστηκαν, παρατηρήθηκε αύξηση της συγκέντρωσης της γλυκόζης από τις πρώτες ώρες της υδρόλυσης, ενώ συνεχίστηκε με σχετικά σταθερό ρυθμό έως περίπου τις 69 h. Από το σημείο αυτό και έπειτα δεν παρατηρούνται σημαντικές μεταβολές στη συγκέντρωση της γλυκόζης. Θα πρέπει να σημειωθεί ότι η αρχική ταχύτητα απελευθέρωσης γλυκόζης (που έχει υπολογιστεί από το γραμμικό τμήμα του διαγράμματος 12) (Διάγραμμα 12) εμφανίζει μέγιστη τιμή για φορτίο γλυκοαμυλάσης 20 Units/g αμύλου. Αύξηση του φορτίου γλυκοαμυλάσης οδηγεί σε μείωση της ταχύτητας απελευθέρωσης της γλυκόζης.



Διάγραμμα 15: Αρχικές ταχύτητες απελευθέρωσης γλυκόζης συναρτήσει του φορτίου γλυκοαμυλάσης.

Η μέγιστη παραχθείσα γλυκόζη καθώς και το θεωρητικό ποσοστό υδρόλυσης κυτταρίνης και αμύλου των διατροφικών απορριμμάτων συναρτήσει του προστιθέμενου ενζυμικού σκευάσματος παρουσιάζονται στο Διάγραμμα 15.

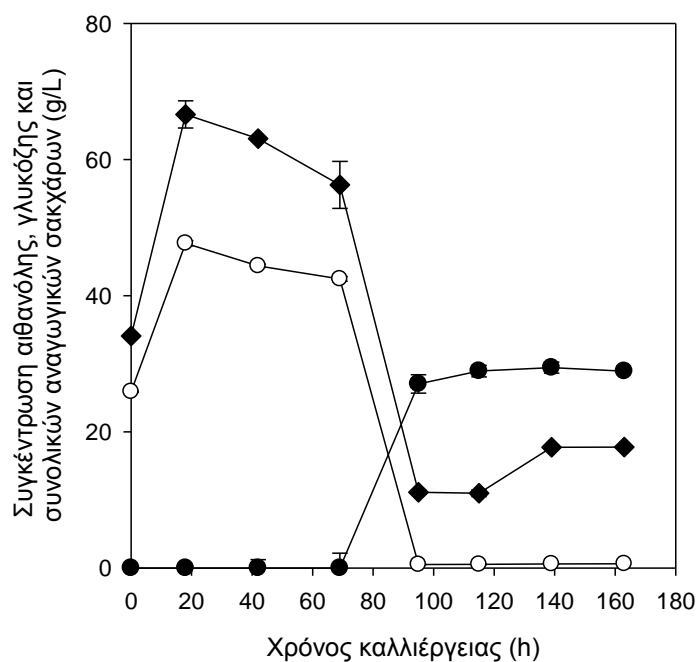


Διάγραμμα 16: Παραχθείσα γλυκόζη και θεωρητικό ποσοστό υδρόλυσης κυτταρίνης και αμύλου.

Η προσθήκη 20 Units/g αμύλου γλυκοαμύλασης οδηγεί σε αύξηση του ποσοστού υδρόλυσης κυτταρίνης και αμύλου (Διάγραμμα 16) κατά 25% περίπου. Προσθήκη μεγαλύτερων ποσοτήτων γλυκοαμύλασης δεν βελτιώνει το αποτέλεσμα.

3.2 Αλκοολική ζύμωση

Στη συνέχεια ακολουθούν σε μορφή διαγραμμάτων και πινάκων τα αποτελέσματα της επίδρασης του εξωγενώς προστιθέμενου σκευάσματος γλυκοαμύλασης Spirizyme® Fuel στο στάδιο της βιομετατροπής των διατροφικών απορριμμάτων σε αιθανόλη.



Διάγραμμα 17. Χρονική μεταβολή συγκέντρωσης (g/L) αιθανόλης (●), γλυκόζης (○) και ολικών αναγωγικών σακχάρων (◆) κατά τη βιομετατροπή προκατεργασμένων ξηρών διατροφικών απορριμμάτων με μονοκαλλιέργεια του μύκητα *F. oxysporum* F3 αναπτυχθέντος αερόβια σε ΖΣΚ και πηγή άνθρακα πίτυρο σίτου και προσθήκη γλυκοαμυλάσης (Spirizyme® Fuel) 20 Units/g αμύλου. Συνθήκες προκατεργασίας διατροφικών απορριμμάτων: θερμοκρασία 100°C, χρόνος προκατεργασίας 3 h, συγκέντρωση θειικού οξέος 2% β/β.

Πίνακας 21. Βιομετατροπή προκατεργασμένων ξηρών διατροφικών απορριμμάτων, με μονοκαλλιέργεια του μύκητα *F. oxysporum* F3, αναπτυχθέντος αερόβια, σε ΖΣΚ και πηγή άνθρακα πίτυρο σίτου με προσθήκη γλυκοαμυλάσης (Spirizyme® Fuel) 20 Units/g αμύλου. Συνθήκες προκατεργασίας διατροφικών απορριμμάτων: θερμοκρασία 100°C, χρόνος προκατεργασίας 3 h, συγκέντρωση θειικού οξέος 2% β/β.

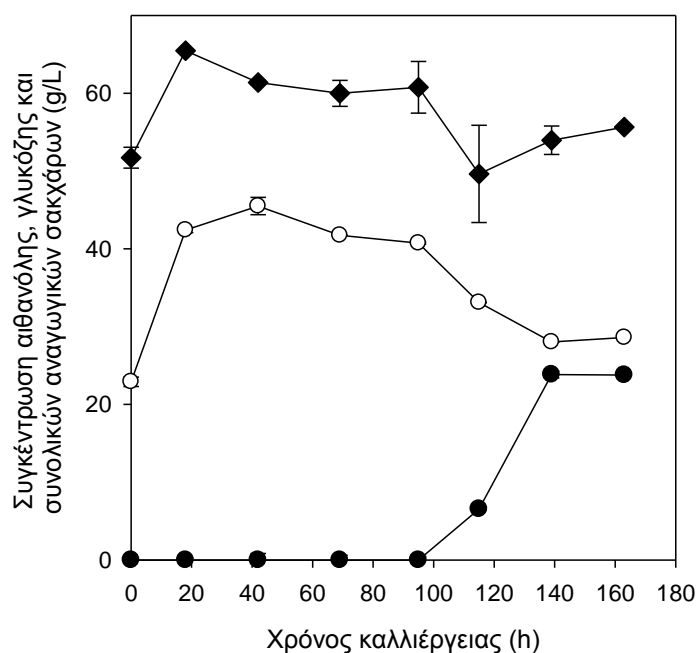
Χρόνος ζύμωσης (h)	Αιθανόλη (g/L)	Απόδοση ¹	Απόδοση ²	Γλυκόζη (g/L)	TRS ³ (g/L)
0	0,00	0,00	0,00	25,90	34,09
18	0,00	0,00	0,00	47,69	66,63
42	0,00	0,00	0,00	44,38	63,08
69	0,00	0,00	0,00	42,46	56,27
95	27,05	9,91	9,01	0,50	11,13
115	28,93	10,60	9,64	0,53	10,98
139	29,44	10,78	9,80	0,59	17,74

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)

Τυπική απόκλιση μετρήσεων \pm 5%



Διάγραμμα 18. Χρονική μεταβολή συγκέντρωσης (g/L) αιθανόλης (●), γλυκόζης (○) και ολικών αναγωγικών σακχάρων (◆) κατά τη βιομετατροπή προκατεργασμένων ξηρών διατροφικών απορριμμάτων με μονοκαλλιέργεια του μύκητα *F. oxysporum* F3 αναπτυχθέντος αερόβια σε ΖΣΚ και πηγή άνθρακα πίτυρο σίτου και προσθήκη γλυκοαμυλάσης (Spirizyme® Fuel) 40 Units/g αμύλου. Συνθήκες προκατεργασίας διατροφικών απορριμμάτων: θερμοκρασία 100°C, χρόνος προκατεργασίας 3 h, συγκέντρωση θειικού οξέος 2% β/β.

Πίνακας 22. Βιομετατροπή προκατεργασμένων ξηρών διατροφικών απορριμμάτων, με μονοκαλλιέργεια του μύκητα *F. oxysporum* F3, αναπτυχθέντος αερόβια, σε ΖΣΚ και πηγή άνθρακα πίτυρο σίτου με προσθήκη γλυκοαμυλάσης (Spirizyme® Fuel) 40 Units/g αμύλου. Συνθήκες προκατεργασίας διατροφικών απορριμμάτων: θερμοκρασία 100°C, χρόνος προκατεργασίας 3 h, συγκέντρωση θειικού οξέος 2% β/β.

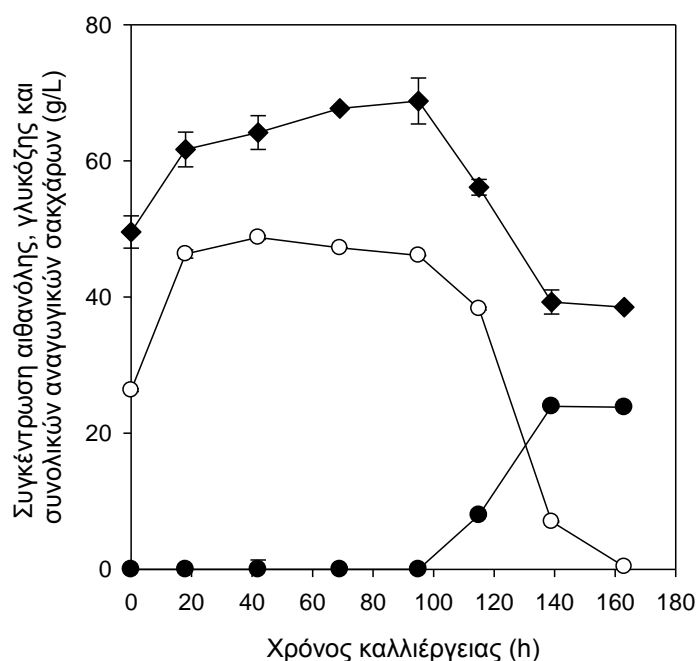
Χρόνος ζύμωσης (h)	Αιθανόλη (g/L)	Απόδοση ¹	Απόδοση ²	Γλυκόζη (g/L)	TRS ³ (g/L)
0	0,00	0,00	0,00	22,90	51,71
18	0,00	0,00	0,00	42,41	65,47
42	0,00	0,00	0,00	45,50	61,38
69	0,00	0,00	0,00	41,74	59,98
95	0,00	0,00	0,00	40,73	60,76
115	6,56	2,40	2,18	33,11	49,63
139	23,84	8,73	7,94	28,03	53,96
163	23,79	8,71	7,92	28,59	55,66

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)

Τυπική απόκλιση μετρήσεων \pm 5%



Διάγραμμα 19. Χρονική μεταβολή συγκέντρωσης (g/L) αιθανόλης (●), γλυκόζης (○) και ολικών αναγωγικών σακχάρων (◆) κατά τη βιομετατροπή προκατεργασμένων ξηρών διατροφικών απορριμμάτων με μονοκαλλιέργεια του μύκητα *F. oxysporum* F3 αναπτυχθέντος αερόβια σε ΖΣΚ και πηγή άνθρακα πίτυρο σίτου και προσθήκη γλυκοαμυλάσης (Spizzyme® Fuel) 60 Units/g αμύλου. Συνθήκες προκατεργασίας διατροφικών απορριμμάτων: θερμοκρασία 100°C, χρόνος προκατεργασίας 3 h, συγκέντρωση θειικού οξέος 2% β/β.

Πίνακας 23. Βιομετατροπή προκατεργασμένων ξηρών διατροφικών απορριμμάτων, με μονοκαλλιέργεια του μύκητα *F. oxysporum* F3, αναπτυχθέντος αερόβια, σε ΖΣΚ και πηγή άνθρακα πίτουρο σίτου με προσθήκη γλυκοαμυλάσης (Spirizyme® Fuel) 60 Units/g αμύλου. *Συνθήκες προκατεργασίας διατροφικών απορριμμάτων:* θερμοκρασία 100°C, χρόνος προκατεργασίας 3 h, συγκέντρωση θειικού οξέος 2% β/β.

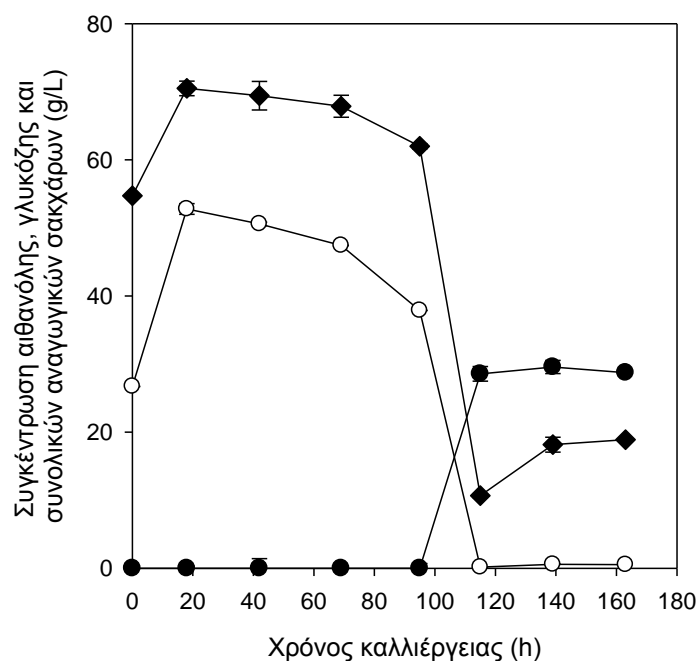
Χρόνος ζύμωσης (h)	Αιθανόλη (g/L)	Απόδοση ¹	Απόδοση ²	Γλυκόζη (g/L)	TRS ³ (g/L)
0	0,00	0,00	0,00	26,31	49,55
18	0,00	0,00	0,00	46,32	61,69
42	0,00	0,00	0,00	48,75	64,16
69	0,00	0,00	0,00	47,23	67,71
95	0,00	0,00	0,00	46,11	68,80
115	7,95	2,92	2,65	38,29	56,12
139	23,95	8,79	7,99	37,94	39,23
163	23,80	8,74	7,94	0,38	38,50

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)

Τυπική απόκλιση μετρήσεων \pm 5%



Διάγραμμα 20. Χρονική μεταβολή συγκέντρωσης (g/L) αιθανόλης (●), γλυκόζης (○) και ολικών αναγωγικών σακχάρων (◆) κατά τη βιομετατροπή προκατεργασμένων

ξηρών διατροφικών απορριμμάτων με μονοκαλλιέργεια του μύκητα *F. oxysporum* F3 αναπτυχθέντος αερόβια σε ΖΣΚ και πηγή άνθρακα πίτυρο σίτου και προσθήκη γλυκοαμυλάσης (Spirizyme® Fuel) 80 Units/g αμύλου. Συνθήκες προκατεργασίας διατροφικών απορριμμάτων: θερμοκρασία 100°C, χρόνος προκατεργασίας 3 h, συγκέντρωση θειικού οξέος 2% β/β.

Πίνακας 24. Βιομετατροπή προκατεργασμένων ξηρών διατροφικών απορριμμάτων, με μονοκαλλιέργεια του μύκητα *F. oxysporum* F3, αναπτυχθέντος αερόβια, σε ΖΣΚ και πηγή άνθρακα πίτυρο σίτου με προσθήκη γλυκοαμυλάσης (Spirizyme® Fuel) 80 Units/g αμύλου. Συνθήκες προκατεργασίας διατροφικών απορριμμάτων: θερμοκρασία 100°C, χρόνος προκατεργασίας 3 h, συγκέντρωση θειικού οξέος 2% β/β.

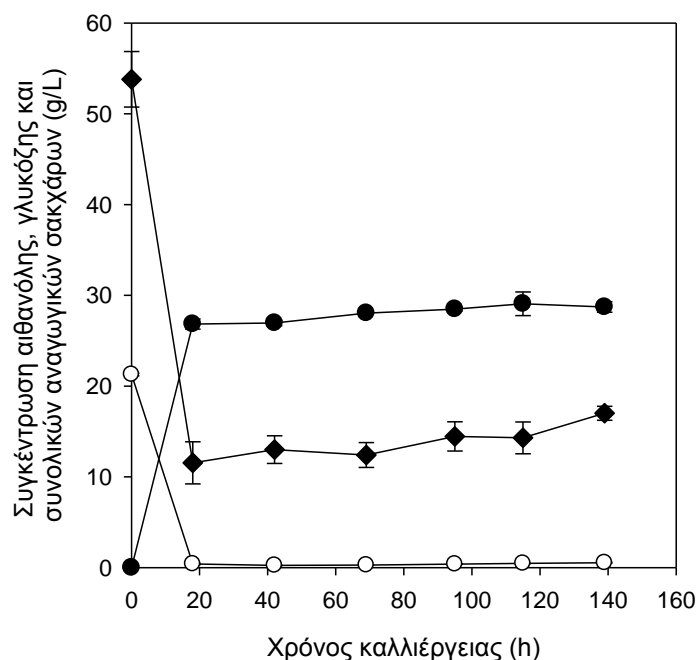
Χρόνος ζύμωσης (h)	Αιθανόλη (g/L)	Απόδοση ¹	Απόδοση ²	Γλυκόζη (g/L)	TRS ³ (g/L)
0	0,00	0,00	0,00	26,71	54,73
18	0,00	0,00	0,00	52,77	70,50
42	0,00	0,00	0,00	50,58	69,42
69	0,00	0,00	0,00	47,43	67,87
95	0,00	0,00	0,00	37,88	61,99
115	28,56	10,50	9,55	0,18	10,67
139	29,57	10,87	9,88	0,58	18,16
163	28,74	10,56	9,60	0,53	18,88

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)

Τυπική απόκλιση μετρήσεων ± 5%



Διάγραμμα 21. Χρονική μεταβολή συγκέντρωσης (g/L) αιθανόλης (●), γλυκόζης (○) και ολικών αναγωγικών σακχάρων (◆) κατά τη βιομετατροπή προκατεργασμένων ξηρών διατροφικών απορριμμάτων με συγκαλλιέργεια του μύκητα *F. oxysporum* F3 (αναπτυχθέντος αερόβια σε ΖΣΚ και πηγή άνθρακα πίτυρο σίτου) με τη ζύμη *S. cerevisiae* και προσθήκη γλυκοαμυλάσης (Spirizyme® Fuel) 40 Units/g αμύλου. *Συνθήκες προκατεργασίας διατροφικών απορριμμάτων:* θερμοκρασία 100°C, χρόνος προκατεργασίας 3 h, συγκέντρωση θειικού οξέος 2% β/β.

Πίνακας 25. Βιομετατροπή προκατεργασμένων ξηρών διατροφικών απορριμμάτων, με συγκαλλιέργεια του μύκητα *F. oxysporum* F3 (αναπτυχθέντος αερόβια σε ΖΣΚ και πηγή άνθρακα πίτυρο σίτου) με τη ζύμη *S. cerevisiae* με προσθήκη γλυκοαμυλάσης (Spirizyme® Fuel) 40 Units/g αμύλου. *Συνθήκες προκατεργασίας διατροφικών απορριμμάτων:* θερμοκρασία 100°C, χρόνος προκατεργασίας 3 h, συγκέντρωση θειικού οξέος 2% β/β.

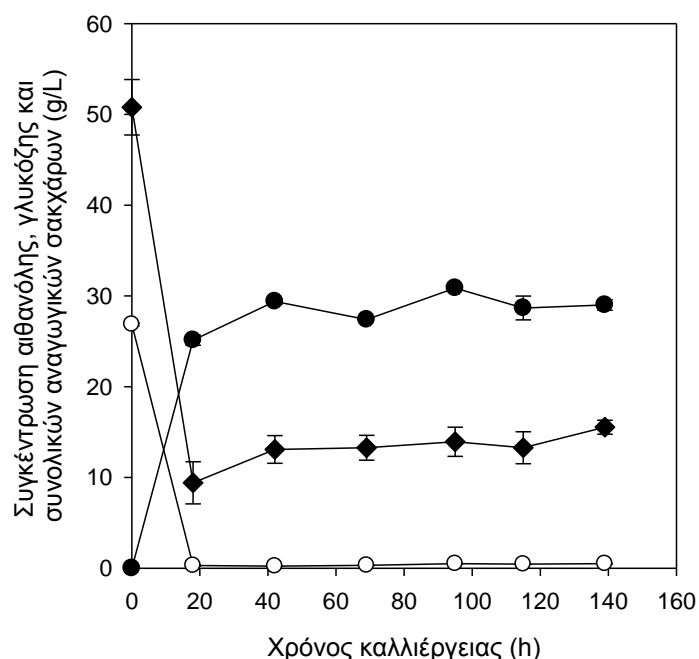
Χρόνος ζύμωσης (h)	Αιθανόλη (g/L)	Απόδοση ¹	Απόδοση ²	Γλυκόζη (g/L)	TRS ³ (g/L)
0	0,00	0,00	0,00	21,28	53,80
18	26,84	9,83	8,94	0,40	11,54
42	26,96	9,88	8,98	0,24	13,00
69	28,04	10,27	9,34	0,29	12,41
95	28,48	10,43	9,48	0,38	14,45
115	29,07	10,65	9,68	0,46	14,30
139	28,71	10,52	9,56	0,54	17,01

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)

Τυπική απόκλιση μετρήσεων \pm 5%



Διάγραμμα 22. Χρονική μεταβολή συγκέντρωσης (g/L) αιθανόλης (●), γλυκόζης (○) και ολικών αναγωγικών σακχάρων (◆) κατά τη βιομετατροπή προκατεργασμένων ξηρών διατροφικών απορριμμάτων με συγκαλλιέργεια του μύκητα *F. oxysporum* F3 (αναπτυχθέντος αερόβια σε ΖΣΚ και πηγή άνθρακα πίτυρο σίτου) με τη ζύμη *S. cerevisiae* και προσθήκη γλυκοαμυλάσης (Spirizyme® Fuel) 60 Units/g αμύλου. Συνθήκες προκατεργασίας διατροφικών απορριμμάτων: θερμοκρασία 100°C, χρόνος προκατεργασίας 3 h, συγκέντρωση θειικού οξέος 2% β/β.

Πίνακας 26. Βιομετατροπή προκατεργασμένων ξηρών διατροφικών απορριμμάτων, με συγκαλλιέργεια του μύκητα *F. oxysporum* F3 (αναπτυχθέντος αερόβια σε ΖΣΚ και πηγή άνθρακα πίτυρο σίτου) με τη ζύμη *S. cerevisiae* με προσθήκη γλυκοαμυλάσης (Spirizyme® Fuel) 60 Units/g αμύλου. Συνθήκες προκατεργασίας διατροφικών απορριμμάτων: θερμοκρασία 100°C, χρόνος προκατεργασίας 3 h, 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	26,86	50,79
18	25,12	9,22	8,38	0,29	9,41

42	29,39	10,79	9,80	0,23	13,08
69	27,39	10,05	9,14	0,31	13,27
95	30,86	11,33	10,30	0,50	13,93
115	28,67	10,52	9,56	0,46	13,27
139	29,00	10,64	9,68	0,49	15,53

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)

Τυπική απόκλιση μετρήσεων \pm 5%

Οι μέγιστες επιτευχθείσες τιμές αιθανόλης συναρτήσει του προστιθέμενου ενζυμικού σκευάσματος παρουσιάζονται στον Πίνακα 27.

Πίνακας 27: Μέγιστες τιμές αιθανόλης συναρτήσει του είδους καλλιέργειας (μονοκαλλιέργεια ή συγκαλλιέργεια) και του φορτίου της γλυκοαμυλάσης (Spirizyme® Fuel).

Συνθήκες	Αιθανόλη (g/L)	Παραγωγικότητα (g/L/h)	Απόδοση ¹ (g/100 g προκ. FW)	Απόδοση ² (g/100 g FW+WB)	Ποσοστό επί της μέγιστης θεωρητικής (%) ³
F3/0	20,58	0,22	7,51	6,83	37,13
F3/20	29,44	0,28	10,78	9,80	53,29
F3/40	23,84	0,17	8,73	7,94	43,15
F3/60	23,95	0,17	8,79	7,99	43,42
F3/80	29,57	0,21	10,87	9,88	53,71
F3 + yeast/40	29,99	1,51	10,99	9,99	54,29
F3 + yeast/60	30,86	1,39	11,33	10,30	55,36

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, του αμύλου ($Y_{\text{αιθανόλης/σακχάρου}}=0.511$) και της ημικυτταρίνης ($Y_{\text{αιθανόλης/σακχάρου}}=0.51$).

Τυπική απόκλιση μετρήσεων \pm 5%

Η αύξηση του ενζυμικού φορτίου της γλυκοαμυλάσης από 0,11 σε 20,11 ή 80,11 Units/g αμύλου στις ίδιες συνθήκες προκατεργασίας αυξάνει την παραγωγή αιθανόλης κατά περίπου 31 %, από 20,58 g/L σε 29,44 g/L και 29,57 g/L αιθανόλης

αντίστοιχα . Στην περίπτωση προσθήκης 40 και 60 Units/g αμύλου η παραγωγή αιθανόλης ήταν μικρότερη κατά περίπου 6 g/L από τα παραπάνω, 23,84 και 23,95 g/L αιθανόλης αντίστοιχα. Η υψηλή συγκέντρωση της γλυκόζης όμως και στις 2 αυτές συνθήκες, δηλώνει ότι υπήρχαν σάκχαρα που δεν καταναλώθηκαν από τον μύκητα, δικαιολογώντας έτσι τη διαφορά στην παραγωγή αιθανόλης.

Με την προσθήκη ζύμης *S. Cerevisiae* καθώς και 40 και 60 Units/g αμύλου γλυκοαμύλασης, η παραγωγή αιθανόλης, σε σχέση με τη μέγιστη τιμή με χρήση μονοκαλλιέργεια του μύκητα *F. oxysporum* F3, δε διαφέρει σημαντικά. Παρόλα αυτά, η παραγωγικότητα της διαδικασίας παρουσιάζει σημαντική αύξηση από 0,21 g/L/h στην περίπτωση της προσθήκης 80 Units/g αμύλου γλυκοαμύλασης σε 1,51 g/L/h με την προσθήκη ζύμης σε συνθήκες 60 Units/g αμύλου γλυκοαμύλασης. Η ζύμη έχει την ικανότητα να καταναλώνει ταχύτατα σάκχαρα, τα οποία λειτουργούν ως παρεμποδιστές στην περαιτέρω ενζυμική υδρόλυση. Επίσης, έτσι δίνεται στο μύκητα η ευκαιρία να καταναλώσει πεντόζες, τις οποίες η ζύμη δεν μπορεί να μεταβολίσει προς αιθανόλη.

Μετά το πέρας των ζυμώνσεων, πραγματοποιήθηκε ανάλυση της σύστασης του στερεού υπολείμματος με εφαρμογή των μεθόδων που περιγράφησαν στις Μεθόδους και Υλικά, τα αποτελέσματα της οποίας παρατίθενται στους παρακάτω πίνακες.

Πίνακας 28. Σύσταση στερεού υπολείμματος βιομετατροπής διατροφικών απορριμάτων, από μονοκαλλιέργεια του μύκητα *F. oxysporum* F3. **Ανάκτηση στερεού: 61.07 ± 0.69%.**

Συστατικό	(%, β/β, ξηρή βάση)*
Άμυλο	2,93 ± 0,58
Κυτταρίνη	14,53 ± 0,26
Ημικυτταρίνη	28,48 ± 0,02

* g/100 g στερεού υπολείμματος

Πίνακας 29. Σύσταση στερεού υπολείμματος βιομετατροπής διατροφικών απορριμάτων από συγκαλλιέργεια του μύκητα *F. oxysporum* F3 με τη ζύμη *S. cerevisiae* με προσθήκη γλυκοαμύλασης (Spirizyme® Fuel) 40 Units/g αμύλου. **Ανάκτηση στερεού: 59,17 ± 3,58%.**

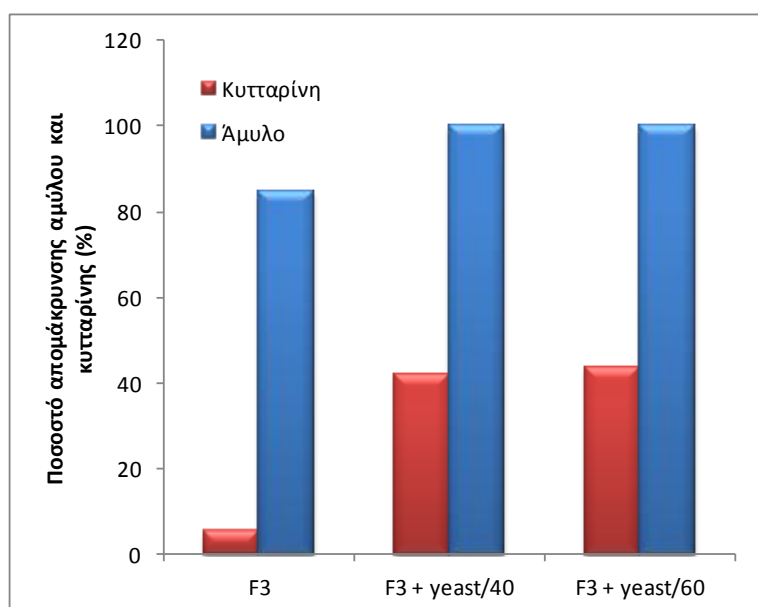
Συστατικό	(%, β/β, ξηρή βάση)*
Άμυλο	0,00
Κυτταρίνη	9,25 ± 0,02
Ημικυτταρίνη	24,35 ± 2,28

* g/100 g στερεού υπολείμματος

Πίνακας 30. Σύσταση στερεού υπολείμματος βιομετατροπής διατροφικών απορριμμάτων από συγκαλλιέργεια του μύκητα *F. oxysporum* F3 με τη ζύμη *S. cerevisiae* με προσθήκη γλυκοαμυλάσης (Spirizyme® Fuel) 60 Units/g αμύλου. **Ανάκτηση στερεού: 59,23 ± 0,42%.**

Συστατικό	(%, β/β, ξηρή βάση)*
Άμυλο	0,00
Κυτταρίνη	8,93 ± 0,41
Ημικυτταρίνη	22,64 ± 4,06

* g/100 g στερεού υπολείμματος

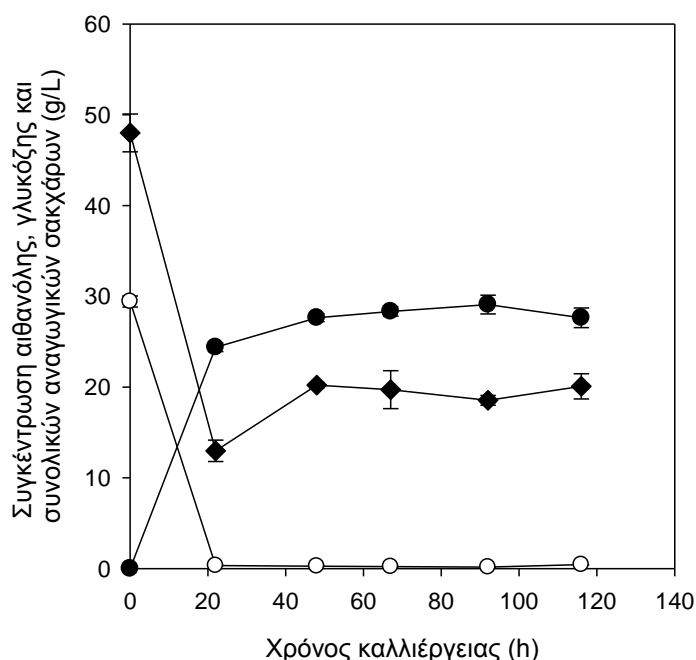


Διάγραμμα 23: Ποσοστό απομάκρυνσης αμύλου και κυτταρίνης κατά τη βιομετατροπή διατροφικών απορριμμάτων από μονοκαλλιέργεια ή συγκαλλιέργεια του μύκητα *F. oxysporum* F3 με τη ζύμη *S. cerevisiae* με προσθήκη ή όχι γλυκοαμυλάσης (Spirizyme® Fuel).

4. Επίδραση του εξωγενούς προστιθέμενου ενζυμικού σκευάσματος Cellic® CTec 2.

Στη συνέχεια της πειραματικής διαδικασίας, πραγματοποιήθηκε αλκοολική ζύμωση με τις ίδιες συνθήκες προκατεργασίας των διατροφικών απορριμμάτων, την προσθήκη της ζύμης *S. cerevisiae*, σκευάσματος γλυκοαμυλάσης, *Spirizyme*, σε ποσότητα που αντιστοιχεί σε 40 U/g αμύλου καθώς και του σκευάσματος κυτταρινολυτικών ενζύμων Cellic® CTec 2 της εταιρίας Novozyme σε ποσότητα τέτοια ώστε η ενεργότητα των κυτταρινασών να είναι 4 FPU/g κυτταρίνης.

Ακολουθούν με μορφή διαγραμμάτων και πινάκων τα αποτελέσματα της παραπάνω διαδικασίας.



Διάγραμμα 24: Χρονική μεταβολή συγκέντρωσης (g/L) αιθανόλης (●), γλυκόζης (○) και ολικών αναγωγικών σακχάρων (◆) κατά τη βιομετατροπή προκατεργασμένων ξηρών διατροφικών απορριμμάτων με συγκαλλιέργεια του μύκητα *F. oxysporum* F3 (αναπτυχθέντος αερόβια σε ΖΣΚ και πηγή άνθρακα πίτυρο σίτου) με τη ζύμη *S. cerevisiae*, προσθήκη γλυκοαμυλάσης (Spirizyme® Fuel) 40 Units/g αμύλου και Cellic® Cteq 2, σε τέτοια ποσότητα ώστε να αντιστοιχεί σε 4 FPU/g κυτταρίνης. *Συνθήκες προκατεργασίας διατροφικών απορριμμάτων:* θερμοκρασία 100°C, χρόνος προκατεργασίας 3 h, συγκέντρωση θειικού οξέος 2% β/β.

Πίνακας 31: Αναλυτική παρουσίαση συγκεντρώσεων (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 πίτυρο σίτου με τη ζύμη *S. cerevisiae* και προσθήκη γλυκοαμυλάσης (Spirizyme® Fuel) 40 Units/g αμύλου και Cellic® Cteq 2, σε τέτοια ποσότητα ώστε να αντιστοιχεί σε 4 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	29,43 ± 0,61	48,00 ± 2,08
22	24,38 ± 0,47	8,91 ± 0,17	8,10 ± 0,16	0,34 ± 0,01	12,97 ± 1,18
48	27,63 ± 0,43	10,10 ± 0,16	9,18 ± 0,14	0,27 ± 0,00	20,21 ± 0,28

67	28,32 ± 0,50	10,35 ± 0,18	9,41 ± 0,17	0,22 ± 0,03	19,71 ± 2,10
92	29,08 ± 1,04	10,63 ± 0,38	9,66 ± 0,34	0,16 ± 0,01	18,54 ± 0,54
116	27,63 ± 1,08	10,09 ± 0,4	9,18 ± 0,36	0,43 ± 0,01	20,08 ± 1,39

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

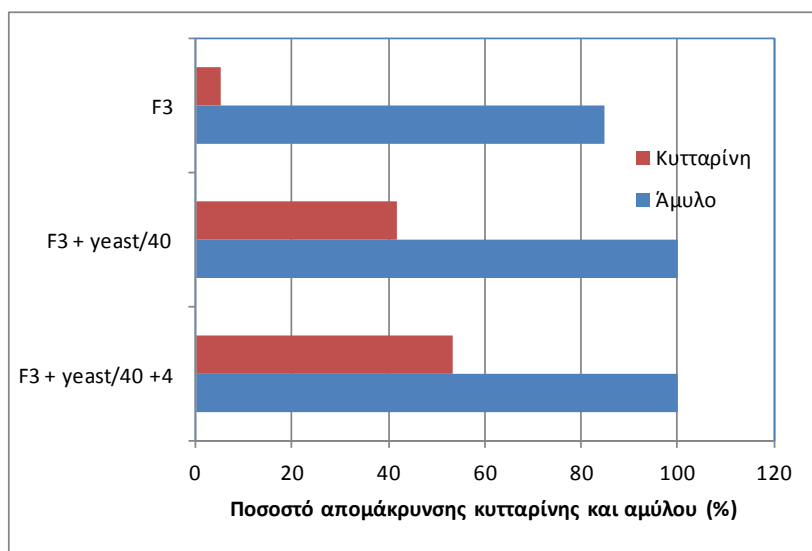
² Απόδοση εκφρασμένη σε g αιθανόλης/100g συνολικών στερεών (FW + WB)

³ TRS: Total Reducing Sugars (ολικά αναγωγικά σάκχαρα)

Πίνακας 32. Σύσταση στερεού υπολείμματος βιομετατροπής διατροφικών απορριμμάτων από συγκαλλιέργεια του μύκητα *F. oxysporum* F3 με τη ζύμη *S. cerevisiae* με προσθήκη γλυκοαμυλάσης (Spirizyme® Fuel) 40 Units/g αμύλου και Cellic® Cteq 2, σε τέτοια ποσότητα ώστε να αντιστοιχεί σε 4 FPU/g κυτταρίνης. **Ανάκτηση στερεού: 48,69 ± 3.19%.**

Συστατικό	(%, β/β, ξηρή βάση)*
Άμυλο	0,00
Κυτταρίνη	8,97 ± 0,20
Ημικυτταρίνη	25,45 ± 1,22

* g/100 g στερεού υπολείμματος



Διάγραμμα 25: Ποσοστό απομάκρυνσης αμύλου και κυτταρίνης κατά τη βιομετατροπή διατροφικών απορριμμάτων από συγκαλλιέργεια του μύκητα *F. oxysporum* F3 με τη ζύμη *S. cerevisiae* με προσθήκη (Spirizyme® Fuel) 40 Units/g αμύλου και Cellic® Cteq 2, σε τέτοια ποσότητα ώστε να αντιστοιχεί σε 4 FPU/g κυτταρίνης.

Παρόλο που η προσθήκη του εξωγενώς προστιθέμενου ενζύμου, Cellic® Cteq 2 και ζύμης *S. cerevisiae*, αυξάνει την παραγωγή αιθανόλης σε σχέση με τη χρήση

μονοκαλλιέργειας *F. oxysporum* F3 κατά περίπου 30% , δεν παρουσιάζει σημαντικώς διαφορετικά αποτελέσματα με την προσθήκη μόνο σκευάσματος γλυκοαμυλάσης, καθώς η μέγιστη παραχθείσα αιθανόλη ήταν 29,08 g/L. Όμως, η δράση των προστιθέμενων κυτταρινολυτικών ενζύμων φαίνεται στο ποσοστό απομάκρυνσης της κυτταρίνης, όπου, στις ίδιες συνθήκες χωρίς την προσθήκη Cellic® Cteq 2, ήταν περίπου 42 %, ενώ με προσθήκη του το ποσοστό ήταν περίπου 54 %. Αξίζει να σημειωθεί ότι στις συνθήκες χωρίς εξωγενώς προστιθέμενα ένζυμα και ζύμη το ποσοστό απομάκρυνσης κυτταρίνης ήταν μικρότερο του 10 %.

Δ.ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ

Σκοπός της παρούσας διπλωματικής εργασίας ήταν η μελέτη των παραμέτρων που επηρεάζουν την παραγωγή αιθανόλης από ξηρά διατροφικά απορρίμματα, μία πρώτη ύλη με υψηλή περιεκτικότητα σε κυτταρίνη, ημικυτταρίνη και άμυλο. Για τη βιομετατροπή του κλάσματος της κυτταρίνης, του αμύλου και της ημικυτταρίνης σε αιθανόλη είναι απαραίτητη η υδρόλυση τους σε σάκχαρα με τη βοήθεια κυτταρινολυτικών, ημικυτταρινολυτικών και αμυλολυτικών ενζύμων. Με τη χρήση αιθανολοπαραγωγών μικροοργανισμών είναι δυνατή η ζύμωση των σακχάρων αυτών σε αιθανόλη. Ο μύκητας *Fusarium oxysporum* F3, έχει τη δυνατότητα να μεταβολίζει εκτός από τις εξόζες, που προκύπτουν από την υδρόλυση της κυτταρίνης και του αμύλου, και τις πεντόζες από την ημικυτταρίνη, τις οποίες η ζύμη *S. Cerevisiae* δεν μπορεί να καταναλώσει. Επίσης, ο *F. oxysporum* F3 μπορεί 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 τόσο με μονοκαλλιέργεια του μύκητα *F. oxysporum* F3 όσο και 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 κυτταρινολυτικών ενζύμων σε ΖΣΚ από το μύκητα *F. oxysporum* F3 χρησιμοποιώντας ως πηγές άνθρακα άχυρο σίτου, πίτυρο σίτου και άξονα σπάδικα αραβόσιτου. Οι μέγιστες ενεργότητες ενδογλυκανάσης και β-γλυκοζιδάσης, που παρατηρήθηκαν, κατά την ανάπτυξη σε υπόστρωμα πίτυρο σίτου, ήταν 65,2 και 23,20 U/g υποστρώματος αντίστοιχα, ενώ εξωγλυκανάσης και ολική ενεργότητα κυτταρινασών 3,46 και 1,47 U/g υποστρώματος.

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 μικροβιακή καλλιέργεια του μύκητα *F.*

oxysporum F3 εφαρμόζοντας τη διεργασία Ταυτόχρονης Σακχαροποίησης και Ζύμωσης. Οι μέγιστες παραχθείσες ενεργότητες από το αερόβιο στάδιο ανάπτυξης του μύκητα αντιστοιχούν σε ενζυμικά φορτία ίσα με 1.47 FPU/g κυτταρίνης, 16.67 Units α-αμυλάσης/g αμύλου, 0.11 Units γλυκοαμυλάσης/g αμύλου, 197.70 Units ξυλανάσης/g ημικυτταρίνης και 0.62 Units β-ξυλοζιδάσης/g ημικυτταρίνης. 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 διατροφικών απορριμμάτων) διατηρώντας τη θερμοκρασία προκατεργασίας στους 90°C δεν βελτιώνει την παραγόμενη αιθανόλη η οποία κυμάνθηκε στα 15-18 g/L. Αύξηση της θερμοκρασίας στους 100°C οδηγεί σε αύξηση της παραγόμενης αιθανόλης στα 20,58 g/L (7,51 g /100 g ξηρών ΔΑ, ή 37,13% της μέγιστης θεωρητικής απόδοσης)

Προκειμένου να αυξηθεί παραγόμενη αιθανόλη στη βέλτιστη προκατεργασία (100°C, 2% (β/β) θειικό οξύ για 3 h) μελετήθηκε η επίδραση εξωγενώς προστιθέμενου αμυλολυτικού σκευάσματος στο στάδιο της βιομετατροπής με δεδομένο ότι η ενεργότητα της γλυκοαμυλάσης από το αερόβιο στάδιο ανάπτυξης του μύκητα είναι πολύ χαμηλή. Η προσθήκη φορτίου 20-80 U/ g αμύλου οδηγεί σε αύξηση της παραγόμενης αιθανόλης. Η προσθήκη 80 U/g αμύλου αυξάνει τη συγκέντρωση της αιθανόλης στα 29.57 g/L, τιμή που αντιστοιχεί στο 53,71 % της μέγιστης θεωρητικής απόδοσης. Με την προσθήκη της ζύμης *S. Cerevisiae* και γλυκοαμυλάσης 60 U/g αμύλου, η συγκέντρωση αυξάνεται ελαφρά (30,86 g/L , 55,36 % της μέγιστης θεωρητικής απόδοσης), αλλά η παραγωγικότητα αυξάνεται σημαντικά από 0,21 σε 1,51 g/L/h, αφού η ζύμωση έχει ξεκινήσει μέχρι τις 18 ώρες, σε αντίθεση με τη χρήση μονοκαλλιέργειας *F. oxysporum* F3, όπου η ζύμωση ξεκινά στις 95 ώρες. Η προσθήκη 4 FPU/g κυτταρίνης εξωγενούς σκευάσματος, Cellic® Cteq 2 συνδυαστικά με 40 U/g αμύλου γλυκοαμυλάσης, δεν μεταβάλλει ουσιαστικά την παραγωγή αιθανόλης συγκριτικά με την καλλιέργεια που περιέχει μόνο γλυκοαμυλάση 40 U/g αμύλου, με μέγιστη τιμή παραχθείσας αιθανόλης 29,08 g/L.

Πίνακας 32: Τιμές παραγόμενης αιθανόλης από διατροφικά απορρίμματα, που συναντώνται στη βιβλιογραφία.

Μικρο/σμός	Διεργασία	Ένζυμα	ΕΤΟΗ (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,	32,2	16,0	Uncu & Cekmecelioglu,

		κυτταρινάσες, β-γλυκοζιδάση	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 , Γλυκοαμυλάση	30,86	11,27	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

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 30) 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.

E. ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

1. Rogner HH. Energy resources. In: Goldemberg J, Baker JW, Khatib H, Ba-N'Daw S, Popescu A, Viray FL, editors. World Energy Assessment; energy and the challenge of sustainability. New York NY USA: United Nations Development Programme UNDP; 2000. p. 135–71 (Chapter 5).
2. Williams RH, Larson ED, Katofsky RE and Chen J. Methanol and hydrogen from biomass for transportation, with comparisons to methanol and hydrogen from natural gas and coal, PU/CEES Report 292. Princeton University/ Center for Energy and Environmental Studies. Princeton, NJ, USA. 1995. 47pp.
3. Turkenburg WC. Renewable energy technologies. In: Goldemberg J, Baker JW, Khatib H, Ba-N'Daw S, Popescu A, Viray FL, editors. World Energy Assessment; energy and the challenge of sustainability. New York NY, USA: United Nations Development Programme UNDP; 2000. p. 219–72 (Chapter 7).
4. Taherzadeh MJ. Ethanol from lignocellulose: Physiological effects of inhibitors and fermentation strategies (PhD thesis). Chalmers University of Technology, Department of Chemical Reaction Engineering. Gothenburg Sweden. 1999. 56pp.
5. Lynd LR. Overview and evaluation of fuel ethanol from cellulosic biomass: technology, economics, the environment, and policy. Annual Reviews, Energy Environment 1996;21:403–65.
6. Enari, T. M. and Suihko, M. L., in Symposium of Fundamental and Applied Aspects of Ethanol Production by Yeasts and Other Microorganisms, 1982, CRC Critical Reviews in Biotechnology
7. Desphande, V., Sulbha, K., Mishra, C., and Rao, M. Enzyme Microb. Technol. 1986, 8, 149-152
8. Jorgensen, H.; Kristensen, J. B.; Felby, C. Enzymatic conversion of lignocellulose into fermentable sugars: Challenges and opportunities. Biofuels, Bioprod. Bioref. 2007, 1, 119–134.
9. Beguin, P.; Aubert, J. P. The biological degradation of cellulose. FEMS Microbiol. Rev. 1994, 13, 25–58.
10. Kuhad, R. C.; Singh, A.; Eriksson, K. E. Microorganisms and enzymes involved in degradation of plant fiber cell walls. Adv. Biochem. Eng./Biotechnol. 1997, 57, 45–125.
11. Perez, J.; Dorado, J. M.; Rubia, T. D.; Martinez, J. Biodegradation and biological treatment of cellulose, hemicellulose and lignin: An overview. Int. Microbiol. 2002, 5, 53–63.
12. European Communities: EC preparatory study on food waste in the EU27.
13. Lin CSK, Pfaltzgraff LA, Herrero-Davila L, Mubofu EB, Abderrahim S, Clark JH, Koutinas AA, Kopsahelis N, Stamatelatos K, Dickson F, Thankappan S, Mohamed Z, Brocklesby R, Luque R: Food waste as a valuable resource for the production of chemicals, materials and fuels. Current situation and global perspective. *Energy Environ Sci* 2013, 6: 426-464. 10.1039/c2ee23440h
14. Uncu ON, Cekmecelioglu D: Cost-effective approach to ethanol production and optimization by response surface methodology. *Waste Manage* 2011, 31: 636-643. 10.1016/j.wasman.2010.12.007
15. Jensen JW, Felby C, Jørgensen H, Rønsch GØ, Nørholm ND: Enzymatic processing of municipal solid waste. *Waste Manage* 2010, 30: 2497-2503. 10.1016/j.wasman.2010.07.009

16. Moon HC, Song IS, Kim JC, Shirai Y, Lee DH, Kim JK, Chung SO, Kim DH, Oh KK, Cho YS: Enzymatic hydrolysis of food waste and ethanol fermentation. *Int J Energy Res* 2009, 33: 164-172. 10.1002/er.1432
17. McMillan, J. D. Pretreatment of lignocellulosic biomass. In *Enzymatic Conversion of Biomass for Fuels Production*; Himmel, M. E., Baker, J. O., Overend, R. P., Eds.; American Chemical Society: Washington, DC, 1994; pp 292-324.
18. Mosier, N. S.; Wyman, C.; Dale, B.; Elander, R.; Lee, Y. Y.; Holtzapple, M.; Ladisch, M. R. Features of promising technologies for pretreatment of lignocellulosic biomass. *Bioresour. Technol.* 2005, 96, 673– 686
19. Jeffries, T. W.; Jin, Y. S. Metabolic engineering for improved fermentation of pentoses by yeasts. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 2004, 63, 495–509.
20. Sun, Y.; Cheng, J. Hydrolysis of lignocellulosic materials for ethanol production: A review. *Bioresour. Technol.* 2002, 83, 1–11.
21. Cadoche, L.; Lopez, G. D. Assessment of size reduction as a preliminary step in the production of ethanol from lignocellulosic wastes. *Biol. Wastes* 1989, 30, 153–157.
22. Fan, L. T.; Gharpuray, M. M.; Lee, Y.-H. *Cellulose Hydrolysis; Biotechnology Monographs; Springer: Berlin; Vol. 3, p 57.*
23. Zwart, R. W. R.; Boerrigter, H.; Van der Drift, A. The impact of biomass pretreatment on the feasibility of overseas biomass conversion to fischer-tropsch products. *Energy Fuels* 2006, 20 (5)), 2192–2197.
24. Parveen Kumar, Diane M. Barrett, Michael J. Delwiche, Pieter Stroeve. Methods for Pretreatment of Lignocellulosic Biomass for Efficient Hydrolysis and Biofuel Production. *Ind. Eng. Chem. Res.* 2009, 48, 3713–3729
25. Alvira P., Tomás-Pejo E., M. Ballesteros, M.J. Negro (2009). Pretreatment Technologies for an Efficient Bioethanol Production Process based on Enzymatic Hydrolysis: A Review, *Biosource Technology*, 101(13), 4851-4861.
26. Eklund, R., Galbe, M., Zacchi, G. (1995). The influence of SO₂ and H₂SO₄ impregnation of willow prior to steam pretreatment, *Bioresource Technology*, 52(3), 225-229.
27. Ben-Ghedalia, D.; Miron, J. The effect of combined chemical and enzyme treatment on the saccharification and in vitro digestion rate of wheat straw. *Biotechnol. Bioeng.* 1981, 23, 823–831.
28. Vidal, P. F.; Molinier, J. Ozonolysis of lignin: Improvement of in vitro digestibility of poplar sawdust. *Biomass* 1988, 16, 1–17.
29. Quesada, J.; Rubio, M.; Gomez, D. Ozonation of Lignin Rich Solid Fractions from Corn Stalks. *J. Wood Chem. Technol.* 1999, 19, 115–137.
30. Elshafei, A. M.; Vega, J. L.; Klasson, K. T.; Clausen, E. C.; Gaddy, J. L. The saccharification of corn stover by cellulase from *Penicillium funiculosum*. *Bioresour. Technol.* 1991, 35, 73–80.
31. Soto, M. L.; Dominguez, H.; Nunez, M. J.; Lema, J. M. Enzymatic saccharification of alkali-treated sunflower hulls. *Bioresour. Technol.* 1994, 49, 53–59.
32. Fox, D. J.; Gray, P. P.; Dunn, N. W.; Warwick, L. M. Comparison of alkali and steam (acid) pretreatments of lignocellulosic materials to increase enzymic susceptibility: Evaluation under optimized pretreatment conditions. *J. Chem. Tech. Biotech.* 1989, 44, 135–146.
33. MacDonald, D. G.; Bakhshi, N. N.; Mathews, J. F.; Roychowdhury, A.; Bajpai, P.; Moo-Young, M. Alkali treatment of corn stover to improve sugar production by enzymatic hydrolysis. *Biotechnol. Bioeng.* 1983, 25, 2067–2076.
34. Sun, Y.; Cheng, J. Hydrolysis of lignocellulosic materials for ethanol production: A review. *Bioresour. Technol.* 2002, 83, 1–11.

35. Sivers, M. V.; Zacchi, G. A techno-economical comparison of three processes for the production of ethanol from pine. *Bioresour. Technol.* 1995, 51, 43–52.
36. Esteghlalian, A.; Hashimoto, A. G.; Fenske, J. J.; Penner, M. H. Modeling and optimization of the dilute-sulfuric-acid pretreatment of corn stover, poplar and switchgrass. *Bioresour. Technol.* 1997, 59, 129–136.
37. Galbe, M.; Zacchi, G. Pretreatment of lignocellulosic materials for efficient bioethanol production. *Adv. Biochem. Eng./Biotechnol.* 2007, 108, 41–65.
38. Okano, K.; Kitagaw, M.; Sasaki, Y.; Watanabe, T. Conversion of Japanese red cedar (*Cryptomeria japonica*) into a feed for ruminants by white-rot basidiomycetes. *Animal Feed Sci. Technol.* 2005, 120, 235–243.
39. Lee, J.-W.; Gwak, K.-S.; Park, J.-Y.; Park, M.-J.; Choi, D.-H.; Kwon, M.; Choi, I.-G. Biological pretreatment of softwood *Pinus densiflora* by three white rot fungi. *J. Microbiol.* 2007, 45 (6), 485–491
40. Biotechnology for biofuels, 2018 “Access to cellulose limits the efficiency of enzymatic hydrolysis: the role of amorphogenesis”, <https://biotechnologyforbiofuels.biomedcentral.com/articles/10.1186/1754-6834-3-4>, τελευταία πρόσβαση, 15/1/2018)
41. Henrissat, B., H. Driguez, C. Viet, and M. Schuelein. 1985. Synergism of cellulases from *Trichoderma reesei* in the degradation of cellulose. *Bio/Technology* 3:722–726.
42. Teeri, T. T. 1997. Crystalline cellulose degradation: new insight into the function of cellobiohydrolases. *Trends Biotechnol.* 15:160–167.
43. Sanjib Kumar Karmee (2016). Liquid biofuels from food waste: Current trends, prospect and limitation. *Renewable and Sustainable Energy Reviews* 53, 945–953.
44. Διαλέξεις εφαρμοσμένης βιοτεχνολογίας, Δημοκρίτειο Πανεπιστήμιο Θράκης https://eclass.duth.gr/modules/document/file.php/ALEX01115/Applied%20Biotechnology_lecture%205.pdf, τελευταία πρόσβαση, 16/1/2018)
45. Doreen Steffien, Ines Aabel, Martin Bertau (2014), Enzymatic hydrolysis of pre-treated lignocellulose with *Penicillium verruculosum* cellulases. *Journal of Molecular Catalysis B: enzymatic* Volume 103, Pages 29-35.
46. Mertens J.A., Skory C.D. Isolation and characterization of a second glucoamylase gene without a starch binding domain from *Rhizopus oryzae*. *Enzy. Microbia. Technol.* 2006;40:874–880
47. A. Pandey, Solid-state fermentation, *Biochem. Eng. J.* 13 (2003) 81–84.
48. A. Kelecom, Secondary metabolites from marine microorganisms, *An. Acad. Bras. Cienc.* 74 (2002) 151–170.
49. U. Hölker, M. Höfer, J. Lenz, *Biotechnological advantages of laboratory-scale solid-state fermentation with fungi*, *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 64 (2004) 175–186
50. Ingledew WM. Alcohol production by *Saccharomyces cerevisiae*: a yeast primer, in the alcohol textbook. 3rd ed. UK: Nottingham University Press; 1999.
51. *Renewable Fuels Association*. "[Renewable Fuels Association Industry Statistics](#)". *Renewable Fuels Association*. Retrieved 2017-04-23.
52. Rangaswami, G and PT Bagyaraja. *Agricultural Microbiology*. 2nd. Prentice Hall of India, 1993
53. «*Infinite Polyiodide Chains in the Pyrroloperylene-Iodine Complex: Insights into the Starch-Iodine and Perylene-Iodine Complexes*», Sheri Madhu, Hayden A. Evans, Vicky V. T. Doan-Nguyen, John G. Labram, Guang Wu, Michael L. Chabiny, Ram Seshadri, Fred Wudl, *Angew. Chem. Int. Ed.* 2016, 55, 8032–8035
54. Research review paper «*Ethanol fermentation technologies from sugar and starch feedstocks*», F.W. Bai, W.A. Anderson, M. Moo-Young, November 2006