

Εθνικό Μετσόβιο Πολυτεχνείο

Σχολή Χημικών Μηχανικών

Τομέας Ι

Μονάδα Περιβαλλοντικής Επιστήμης και Τεχνολογίας



Διερεύνηση αξιοποίησης μιγμάτων βιοαποβλήτων από διάφορες πηγές προς την παραγωγή αλκοόλης

Διπλωματική Εργασία

Γραμματικός Χρήστος

Επιβλέπουσα Καθηγήτρια

Αικατερίνη Χαραλάμους

Αθήνα

Ιούλιος 2020

Πρόλογος

Το παρόν σύγγραμμα αποτελεί τη διπλωματική μου εργασία που είναι απαραίτητη για την ολοκλήρωση των σπουδών μου και εκπονήθηκε στη Μονάδα Περιβαλλοντικής Επιστήμης και Τεχνολογίας της Σχολής Χημικών Μηχανικών του Εθνικού Μετσόβιου Πολυτεχνείου κατά το ακαδημαϊκό έτος 2019-2020.

Αρχικά, θα ήθελα να ευχαριστήσω την υπεύθυνη της διπλωματικής μου εργασίας, Καθηγήτρια του Ε.Μ.Π., κα. Αικατερίνη Χαραλάμπους για την ανάθεση του θέματος και της δυνατότητας που μου έδωσε να ασχοληθώ με αυτό το πολύ ενδιαφέρον θέμα.

Η επιτυχής ολοκλήρωση αυτής της διπλωματικής θα ήταν αδύνατη χωρίς τη συνεισφορά των Δρ. Σοφία Μάη και Δρ. Έλλη Μπαραμπούτη. Θα ήθελα να τις ευχαριστήσω θερμά για τη συνεχή και πολύτιμη καθοδήγησή τους, τη βοήθεια και στην υποστήριξη που μου προσέφεραν, καθώς και για την άριστη συνεργασία μας κατά τη διάρκεια εκπόνησης της εργασίας, που ήταν καταλυτική για την ολοκλήρωσή της.

Κλείνοντας, ευχαριστώ το προσωπικό του εργαστηρίου και κυρίως τη Βασιλεία Στούμπου για την υποστήριξη και την πολύτιμη βοήθεια της, από την πρώτη κιόλας ημέρα της συνεργασίας μας, καθώς επίσης και τη Δρ Jelica Novaković, για όλη τη βοήθεια που μου παρείχε κατά τη διάρκεια των πειραματικών αναλύσεων.

Περίληψη

Η εν λόγω διπλωματική εργασία πραγματεύεται την αξιολόγηση μιγμάτων αποτελούμενων από εξαντλημένους κόκκους καφέ εσπρέσο και εξαντλημένους σπόρους κριθαριού ως πρώτη ύλη για την παραγωγή βιοκαυσίμων, και συγκεκριμένα βιοαιθανόλης 2^{ης} γενιάς.

Σκοπός της εργασίας ήταν η μελέτη διαφορετικών μεθόδων επεξεργασίας της πρώτης ύλης για την επίτευξη της υψηλότερης απόδοσης σε αιθανόλη μετά την διεργασία της ζύμωσης. Ανάμεσα στις 4 διαφορετικές σειρές πειραματικών δοκιμών, διερευνήθηκε η επίδραση που έχουν οι διαφορετικές αναλογίες μιγμάτων εξαντλημένων κόκκων καφέ (SCG) και εξαντλημένων σπόρων κριθαριού (BSG) στην τελική απόδοση της διεργασίας, ενώ ελέγχθηκε και συγκρίθηκε η χρήση δύο διαφορετικών κυτταρινολυτικών ενζύμων, ένα εμπορικό και ένα μη εμπορικό, το Cellic CTec2 (Novozymes, Denmark) και το NS-22177. Επιπλέον, μελετήθηκε η όξινη και η αλκαλική υδρόλυση της πρώτης ύλης με H₂SO₄ και NaOH ως προς την αποικοδομητική τους ικανότητα, αντίστοιχα, καθώς επίσης και ο βέλτιστος χρόνος προ-επεξεργασίας και ενζυμικής υδρόλυσης. Οι πρώτες 3 σειρές πειραματικών δοκιμών έλαβαν χώρα σε μικρή εργαστηριακή κλίμακα όπου η ποσότητα των δειγμάτων SCG/BSG ήταν της τάξης των 5-10gr. Η 4^η σειρά πειραματικών δοκιμών πραγματοποιήθηκε αξιοποιώντας τα αποτελέσματα των προηγούμενων σειρών, σε μεσαία εργαστηριακή κλίμακα, όπου η ποσότητα των δειγμάτων SCG/BSG ήταν της τάξης των 200-300g.

Από τις μετρήσεις και τα αποτελέσματα των πειραματικών δοκιμών, βρέθηκε πως η μέγιστη απόδοση σε αιθανόλη αγγίζει το 84.69% και επιτυγχάνεται υπό συνθήκες που περιλαμβάνουν ξεχωριστή προ-επεξεργασία των πρώτων υλών BSG και SCG, και ακολούθως ανάμιξη, ενζυμική υδρόλυση και ζύμωση. Η προ-επεξεργασία πραγματοποιείται με NaOH 0.5M σε αναλογία 10mL/g πρώτης ύλης για το SCG και H₂SO₄ 0.25M σε αναλογία 10 mL/g πρώτης ύλης για το BSG και διαρκεί για 16 ώρες, υπό ανάδευση, στους 50 °C. Αφού αναμειχθούν, ακολουθεί ενζυμική υδρόλυση για 5 ώρες με Cellic CTec2 σε αναλογία 800 μL/g αρχικής κυτταρίνης στους 50 °C. Η διεργασία ολοκληρώνεται με ζύμωση στους 30 °C για 24 ώρες με την βοήθεια της μαγιάς *Saccharomyces cerevisiae* η οποία προστίθεται σε αναλογία 2% κατά βάρος.

Συμπερασματικά, η αξιοποίηση μιγμάτων αποτελούμενων από εξαντλημένους σπόρους κριθαριού και εξαντλημένους κόκκους καφέ, σε αναλογία 1:1, προς την κατεύθυνση της παραγωγής βιοαιθανόλης είναι τεχνικά εφικτή με ικανοποιητικές αποδόσεις.

Λέξεις – κλειδιά: Βιοαιθανόλη, εξαντλημένοι κόκκοι καφέ, εξαντλημένοι σπόροι κριθαριού, σακχαροποίηση Cellic CTec2, προ-επεξεργασία με αραιό οξύ, προ-επεξεργασία με αραιή βάση, *Saccharomyces cerevisiae*

Abstract

The goal of this diploma thesis was to address and evaluate the ethanol yield of mixtures consisting of spent coffee grounds and brewer's spent grains.

The aim of the study was to conduct and evaluate several kinds of methods regarding processing of the raw material in order to achieve the highest ethanol yield after the end of the fermentation step. Among the 5 different series of experimental tests, the effect of using different proportions of SCG and BSG as mixtures was investigated in terms of highest ethanol yield. Furthermore, the use of 2 cellulolytic enzymes was tested and compared, a commercial and a non-commercial one, Cellic CTec2 and NS 22177 respectively. Similarly, during the early steps of raw material pre-treatment, both acidic and alkaline hydrolysis were performed at different operational conditions so that the optimal lignin and polysaccharide degradation was observed. The first 3 series of experiments were performed on small laboratory scale using samples of 5 – 10 g SCG and BSG. The last, 4th series of experimental tests was performed on a larger laboratory scale using samples of 200 – 300 g feedstock.

After conducting the experiments and evaluating the results, the highest ethanol yield was found as high as 84.69% and it was achieved under the following conditions: The raw materials, BSG and SCG, were subjected to separate pre-treatment and then were mixed to form a mixture of BSG/SCG 1:1. An acidic solution of H₂SO₄ 0.25M was used for BSG with a ratio of 10mL per g of initial cellulose of the material, while an alkaline solution of NaOH 0.5M was used for the pre-treatment of SCG at same ratio. Both pretreatments took place simultaneously and whole process lasted for 16 hours at 50 °C temperature. The following step concerns the enzymatic hydrolysis of the mixture with 800 µL Cellic CTec2 per g of initial cellulose. This process was performed for 5 hours at 50 °C, under the effect of stirring. The total process was completed by ethanolic fermentation by the yeast *Saccharomyces cerevisiae*, at a ratio of 2% w/w for 24 hours at 30 °C.

Conclusively, through this diploma thesis, the valorization of mixtures consisting of brewer's spent grains and spent coffee grounds, at a ratio of 1:1, towards ethanol production, through the process of fermentation, proved to be technically feasible with satisfactory efficiencies.

Key words: Bioethanol, brewers spent grains, Cellic CTec2, dilute acid pretreatment, dilute alkaline pretreatment, fermentation, saccharification, *Saccharomyces cerevisiae*, spent coffee grounds.

Περιεχόμενα

Πρόλογος	ii
Περίληψη	iii
Abstract.....	v
Περιεχόμενα	vi
Ευρετήριο πινάκων	ix
Ευρετήριο εικόνων	xi
Ευρετήριο σχημάτων	xii
Ευρετήριο διαγραμμάτων	xiii
1 Εισαγωγή.....	1
2 Θεωρητικό Μέρος.....	3
2.1 Ο καφές.....	3
2.1.1 Γενικά	3
2.1.2 Ιστορία του Καφέ.....	3
2.1.3 Εξαντλημένοι Κόκκοι Καφέ	4
2.1.3.1 Αντιοξειδωτική δράση των SCG	9
2.1.3.2 Ανάκτηση ελαίων και παραγωγή Βιοντίζελ.....	11
2.1.3.3 Ανάκτηση σακχάρων και παραγωγή Βιοαιθανόλης.....	14
2.1.3.4 Προσοφητικές ιδιότητες των SCG.....	16
2.1.3.5 Παραγωγή βιο-ενέργειας από SCG.....	18
2.1.3.6 Εφαρμογές στην γεωργία	20
2.2 Το κριθάρι	22
2.2.1 Γενικά	22
2.2.2 Ιστορία και προέλευση του κριθαριού.....	23
2.2.3 Διαδικασία παραγωγής μύρας	24
2.2.4 Εξαντλημένοι Σπόροι Κριθαριού	27
2.2.4.1 Χημική σύσταση των BSG	29
2.2.4.2 Στοιχειακή σύνθεση των BSG	33
2.2.4.4.1 Χρήση των BSG σε τρόφιμα και ζωοτροφές.....	36

2.2.4.4.2 Επεξεργασία των BSG και παραγωγή ενέργειας	39
2.2.4.4.3 Παραγωγή χημικών προϊόντων από BSG	42
2.3 Παραγωγή βιοαιθανόλης 2ης γενιάς.....	46
2.3.1 Βιοαιθανόλη.....	46
2.3.2 Πηγές βιομάζας για παραγωγή βιοαιθανόλης	49
2.3.3 Στάδια παραγωγής βιοαιθανόλης 2 ^{ης} γενιάς.....	53
2.3.3.1.1 Φυσικές μέθοδοι	54
2.3.3.1.2 Χημικές μέθοδοι	55
2.3.3.2.1 Όξινη υδρόλυση.....	58
2.3.3.2.2 Ενζυμική υδρόλυση	60
3 Πειραματικό Μέρος.....	64
3.1 Πειραματική διάταξη	64
3.1.1 Περιγραφή πειραματικής διάταξης μεσαίας κλίμακας.....	65
3.1.2 Περιγραφή συστήματος θέρμανσης.....	66
3.1.3 Φιλτροσακούλα διαχωρισμού στερεής/υγρής φάσης.....	66
3.2 Περιγραφή πειραματικής διαδικασίας.....	67
3.2.1 Προκατεργασία μιγμάτων SCG και BSG.....	68
3.2.2 Αλκαλική και όξινη προ-επεξεργασία μιγμάτων SCG και BSG	69
3.2.3 Ενζυμική υδρόλυση μιγμάτων SCG και BSG	70
3.2.4 Ζύμωση μιγμάτων SCG και BSG.....	71
3.3 Μέθοδοι ανάλυσης.....	72
3.3.1 Προσδιορισμός υγρασίας (H)	73
3.3.2 Προσδιορισμός ολικών στερεών (TS)	74
3.3.3 Προσδιορισμός ολικών πτητικών στερεών (VS).....	75
3.3.4 Προσδιορισμός ολικού οργανικού άνθρακα (TOC) για στερεά δείγματα	76
3.3.5 Προσδιορισμός ολικού οργανικού άνθρακα (TOC) και ολικού αζώτου (TN) για υγρά δείγματα	78
3.3.6 Προσδιορισμός ολικών υδατοδιαλυτών στερεών (WS).....	79
3.3.7 Προσδιορισμός ολικών αναγωγικών σακχάρων (TRS)	79
3.3.8 Προσδιορισμός ελεύθερης γλυκόζης	81
3.3.9 Προσδιορισμός κυτταρίνης	84
3.3.10 Προσδιορισμός ημικυτταρίνης	86
3.3.11 Προσδιορισμός λιγνίνης	87

3.3.12 Προσδιορισμός ολικού αμύλου.....	88
3.3.13 Προσδιορισμός λιπών και ελαίων	91
3.3.14 Προσδιορισμός πτητικών λιπαρών οξέων (VFAs)	92
3.3.15 Προσδιορισμός φαινόλων	92
3.3.16 Προσδιορισμός αιθανόλης	93
4 Πειραματικές δοκιμές και Αποτελέσματα.....	94
4.1 Χαρακτηριστικά πρώτης ύλης.....	94
4.2 Πρωτογενή πειραματικά αποτελέσματα.....	95
4.2.1 Πρώτη σειρά πειραματικών δοκιμών.....	95
4.2.2 Δεύτερη σειρά πειραματικών δοκιμών	99
4.2.3 Τρίτη σειρά πειραματικών δοκιμών	101
4.2.4 Τέταρτη σειρά πειραμάτων	104
4.3 Δευτερογενή πειραματικά αποτελέσματα.....	106
4.3.1 Απόδοση υδρολυτικών διεργασιών	106
4.3.2 Αποτελέσματα προσδιορισμού αιθανόλης.....	117
5 Συμπεράσματα.....	127
Βιβλιογραφικές πηγές	130

Ευρετήριο πινάκων

Πίνακας 1: Χημική σύνθεση των εξαντλημένων κόκκων καφέ, SCG [8, p. 35777].....	7
Πίνακας 2: Στοιχειακή ανάλυση των SCG και υπολογισμός της ανώτερης θερμογόνου δύναμης HHV [11, p. 5] [12, p. 27585]	8
Πίνακας 3: Ολικά φαινολικά, φλαβονοειδή, χλωρογενικά και καφεϊκά οξέα καθώς και αντιοξειδωτική δραστηριότητα σε εκχυλίσματα από υπολείμματα SCG [19]	10
Πίνακας 4: Μηχανικά και φυσικά χαρακτηριστικά των SCG pellet [41]	19
Πίνακας 5: Ανόργανο περιεχόμενο σε δείγμα υπολειμμάτων SCG και στο παραγόμενο, από αυτά, βιοεξανθράκωμα [42].....	21
Πίνακας 6: Χημική σύνθεση των εξαντλημένων σπόρων κριθαριού (BSG) σύμφωνα με διάφορες πηγές. [55] [56] [57] [50] [58] [59] [60] [61] [62].....	30
Πίνακας 7: Περιεχόμενο της συνολικής πρωτεΐνης σε αμινοξέα, καθώς και περιεχόμενο των BSG σε μεταλλικά στοιχεία [61]	33
Πίνακας 8: Προσεγγιστική ανάλυση (proximate analysis) των υπολειμμάτων BSG [67] [65] [66] [53] *	34
Πίνακας 9: Στοιχειακή ανάλυση (ultimate analysis) των υπολειμμάτων BSG [67] [65] [66] *....	34
Πίνακας 10: Φυσικοχημικές ιδιότητες της βενζίνης και της αιθανόλης (βιοαιθανόλης) [97]	49
Πίνακας 11: Σύσταση πρώτης ύλης SCG και BSG.....	94
Πίνακας 12: Σειρά πειραματικών δοκιμών για τροφοδοσία διαφορετικών μιγμάτων BSG/SCG προ-επεξεργασμένη με NaOH 0.5M.....	95
Πίνακας 13: Σύσταση μιγμάτων σε λίπη και έλαια.....	97
Πίνακας 14: Ανάλυση υγρού κλάσματος της πρώτης σειράς πειραμάτων.....	97
Πίνακας 15: Ανάλυση στερεού κλάσματος της πρώτης σειράς πειραμάτων.	98
Πίνακας 16: Δεύτερη σειρά πειραματικών δοκιμών για τα μίγματα SCG/BSG μετά από ξεχωριστή προ-επεξεργασία.	100
Πίνακας 17: Ανάλυση υγρού κλάσματος της δεύτερης σειράς πειραμάτων.....	100
Πίνακας 18: Ανάλυση στερεού κλάσματος της δεύτερης σειράς πειραμάτων.....	101
Πίνακας 19: Τρίτη σειρά πειραματικών δοκιμών για τα μίγματα SCG/BSG μετά από ξεχωριστή προ-επεξεργασία και με αλλαγή μίας μεταβλητής κάθε φορά.	102
Πίνακας 20: Ανάλυση υγρού κλάσματος της τρίτης σειράς πειραμάτων.	103
Πίνακας 21: Ανάλυση στερεού κλάσματος της τρίτης σειράς πειραμάτων.....	104

Πίνακας 22: Σύσταση πρώτων υλών του πειράματος D2 σε λίπη και έλαια.	105
Πίνακας 23: Τέταρτη σειρά πειραματικών δοκιμών για τα μίγματα SCG/BSG μετά από ξεχωριστή προ-επεξεργασία.	105
Πίνακας 24: Αποικοδόμηση των ολικών στερεών καθώς και των δομικών συστατικών (κυτταρίνη, ημικυτταρίνη, λιγνίνη) της πρώτης σειράς πειραματικών δοκιμών.	106
Πίνακας 25: Αποικοδόμηση των ολικών στερεών καθώς και των δομικών συστατικών (κυτταρίνη, ημικυτταρίνη, λιγνίνη) της δεύτερης σειράς πειραματικών δοκιμών.	110
Πίνακας 26: Αποικοδόμηση των ολικών στερεών καθώς και των δομικών συστατικών (κυτταρίνη, ημικυτταρίνη, λιγνίνη) της τρίτης σειράς πειραματικών δοκιμών.	112
Πίνακας 27: Απόδοση αιθανόλης για την πρώτη σειρά πειραματικών δοκιμών.	118
Πίνακας 28: Επίδραση της κυτταρινάσης Cellic CTec2 στο ποσοστό απόδοσης της αιθανόλης στην πρώτη σειρά πειραματικών δοκιμών.	120
Πίνακας 29: Απόδοση αιθανόλης για την δεύτερη σειρά πειραματικών δοκιμών.	120
Πίνακας 30: Απόδοση αιθανόλης για την τρίτη σειρά πειραματικών δοκιμών.	122
Πίνακας 31: Απόδοση αιθανόλης στην τέταρτη σειρά πειραματικών δοκιμών.	124

Ευρετήριο εικόνων

Εικόνα 1: Διεργασία προσρόφησης των χρωστικών AO7 και MB από SCG-GAC [39].....	18
Εικόνα 2: Σχηματική τομή ενός σπόρου κριθαριού [53].....	28
Εικόνα 3: Τα 4 κύρια είδη βιοαιθανόλης και οι πρώτες ύλες που χρησιμοποιούνται σε κάθε περίπτωση [96].	47
Εικόνα 4: Πειραματική διάταξη για την προετοιμασία των δειγμάτων SCG και BSG.	64
Εικόνα 5: Ανακινούμενο υδατόλουτρο (IKA KS 3000i control).....	65
Εικόνα 6: Ξηραντήριο Gaia GC-100	67
Εικόνα 7: Οι πρώτες ύλες εξαντλημένων κόκκων καφέ και εξαντλημένων σπόρων κριθαριού που χρησιμοποιήθηκαν ως τροφοδοσία.....	68
Εικόνα 8: Αναλυτικός ζυγός ακριβείας 4 δεκαδικών ψηφίων.....	73
Εικόνα 9: Φούρνος ξήρανσης Carbolite με ρεύμα αέρα.	73
Εικόνα 10: Κάψες πορσελάνης που περιέχουν δείγματα εξαντλημένων κόκκων καφέ SCG.	74
Εικόνα 11: Φούρνος μέτρησης πτητικών στερεών Barnstead Thermolyne.	75
Εικόνα 12: Συσκευή μέτρησης ολικού οργανικού άνθρακα TOC	76
Εικόνα 13: Κάψες πορσελάνης που χρησιμοποιούνται στην συσκευή μέτρησης TOC.	77
Εικόνα 14: Φούρνος (Solid Sample Module SSM 5000A)	77
Εικόνα 15: Κεντρική μονάδα TOCVCSH.....	78
Εικόνα 16: Προσδιορισμός ελεύθερης γλυκόζης με τη μέθοδο GOD/PAP	83
Εικόνα 17: Κλίβανος αποστείρωσης ISOLAB Laborgerate GmbH Autoclave	84
Εικόνα 18: Παγόλουτρο που χρησιμοποιείται στον προσδιορισμό του ολικού αμύλου.....	89
Εικόνα 19: Συσκευή φυγοκέντρησης IEC/Centra CL2	90

Ευρετήριο σχημάτων

Σχήμα 1: Βασικά στάδια παραγωγής στιγμιαίου καφέ και δημιουργίας υπολείμματος υπό μορφής εξαντλημένων κόκκων καφέ SCG.....	5
Σχήμα 2: Εφαρμογές και προϊόντα από την αξιοποίηση των υπολειμμάτων καφέ SCG	8
Σχήμα 3: Αντιδράσεις μετεστεροποίησης ενός τριγλυκεριδίου [23].....	13
Σχήμα 4: Σχηματική αναπαράσταση των σταδίων παραγωγής ζυθογλεύκους καθώς και του παραπροϊόντος, τους εξαντλημένους σπόρους κριθαριού (BSG).	29
Σχήμα 5: Δομή σακχαρόζης [99].....	51
Σχήμα 6: Δομές αμυλόζης, αμυλοπηκτικής και γλυκόζης [99].	52
Σχήμα 7: Τα βασικά συστατικά της βιομάζας και η δομή της κυτταρίνης, ημικυτταρίνης και λιγνίνης [100].....	53

Ευρετήριο διαγραμμάτων

Διάγραμμα 1: Υδρόλυση κυτταρίνης, ημικυτταρίνης και λιγνίνης στα δείγματα μετά από ζύμωση της πρώτης σειράς πειραματικών δοκιμών.....	108
Διάγραμμα 2: Μέση υδρόλυση κυτταρίνης, ημικυτταρίνης και λιγνίνης στα δείγματα μετά από ζύμωση της πρώτης σειράς πειραματικών δοκιμών.....	109
Διάγραμμα 3: Υδρόλυση κυτταρίνης, ημικυτταρίνης και λιγνίνης στα δείγματα μετά από ζύμωση της δεύτερης σειράς πειραματικών δοκιμών.....	111
Διάγραμμα 4: Ποσοστά υδρόλυσης κυτταρίνης, ημικυτταρίνης και μη διαλυτής λιγνίνης στην τρίτη σειρά πειραματικών δοκιμών.	113
Διάγραμμα 5: Συγκέντρωση φαινολικών ουσιών στο υπερκείμενο υγρό των πειραμάτων της πρώτης σειράς σε συνάρτηση με την αποικοδόμηση της μη διαλυτής λιγνίνης.	116
Διάγραμμα 6: Συγκέντρωση πτητικών ουσιών στο υπερκείμενο υγρό των πειραμάτων της πρώτης σειράς σε συνάρτηση με την αποικοδόμηση της μη διαλυτής λιγνίνης και της ημικυτταρίνης.	116
Διάγραμμα 7: Απόδοση της αιθανόλης στις διεργασίες ζύμωσης της πρώτης σειράς πειραματικών δοκιμών.....	119
Διάγραμμα 8: Απόδοση της αιθανόλης στις διεργασίες ζύμωσης της δεύτερης σειράς πειραματικών δοκιμών.....	121
Διάγραμμα 9: Απόδοση της αιθανόλης στις διεργασίες ζύμωσης της τρίτης σειράς πειραματικών δοκιμών.....	122

1 Εισαγωγή

Η παγκόσμια συγκυρία, οι πρόσφατες εξελίξεις στον ενεργειακό τομέα και κυρίως στο χώρο του πετρελαίου, έχουν επαναφέρει με επιτακτικό τρόπο την ανάγκη για την αξιοποίηση των εναλλακτικών μορφών ενέργειας, της εξοικονόμησης και της ορθολογικής χρήσης της ενέργειας των συνιστωσών δηλαδή, που εξασφαλίζουν τη λεγόμενη βιώσιμη ανάπτυξη.

Οι ανανεώσιμες πηγές ενέργειας έχουν διερευνηθεί εδώ και αρκετές δεκαετίες και ήδη καταλαμβάνουν ένα σημαντικό κομμάτι της σύγχρονης ενεργειακής αγοράς. Μεταξύ αυτών συγκαταλέγονται και τα βιοκαύσιμα, όπως η βιοαιθανόλη, δηλαδή καύσιμα που προκύπτουν από την αξιοποίηση της βιομάζας και δύνανται να συνεισφέρουν σημαντικά στην κάλυψη των ενεργειακών αναγκών. Ανάλογα με την προέλευσή της, η βιομάζα κατηγοριοποιείται σε βιομάζα 1ης, 2ης και 3ης γενιάς, μία κατηγοριοποίηση που λαμβάνει υπόψη τη φύση της πρώτης ύλης από την οποία προέρχεται και το κατά πόσο αυτή ανταγωνίζεται τα τρόφιμα. Μέχρι σήμερα, σε μεγάλη κλίμακα, αξιοποιούνται μόνο τύποι βιομάζας που εμπίπτουν στην πρώτη κατηγορία, δηλαδή βιομάζα που προέρχεται από εδάδιμες καλλιέργειες. Η τάση, ωστόσο στρέφεται προς την σταδιακή εγκατάλειψη αυτών και την ουσιαστική ενσωμάτωση άλλων τύπων υποστρωμάτων, που μέχρι σήμερα απορρίπτονται ή αποτελούν φυσικά υπολείμματα διεργασιών. Στην κατηγορία αυτή συγκαταλέγονται και τα λιγνοκυτταρινούχα υπολείμματα, όπως είναι οι εξαντλημένοι κόκκοι καφέ και οι εξαντλημένοι σπόροι κριθαριού.

Η απόρριψη των υπολειμμάτων εξαντλημένου καφέ αποτελεί σοβαρό περιβαλλοντικό πρόβλημα λόγω της τοξικότητάς τους και της υψηλής περιεκτικότητάς τους σε οργανική ύλη. Η υψηλή περιεκτικότητα σε οργανικές ενώσεις καθιστούν το SCG εξαιρετικά ελκυστικό ως βιομάζα για την παραγωγή βιοκαυσίμων και πολύτιμων προϊόντων καθώς και μια πολλά υποσχόμενη πρώτη ύλη για ένα ολοκληρωμένο βιώσιμο βιο-διυλιστήριο. Είναι επομένως απαραίτητο να αναπτυχθούν στρατηγικές για τη συλλογή των παραπροϊόντων αυτών και τη δημιουργία νέων ευκαιριών των επιχειρήσεων που μπορούν να προσφέρουν μια αποδοτικότερη χρήση τους. Αντίστοιχα, οι εξαντλημένοι σπόροι κριθαριού αποτελούν το πιο άφθονο στερεό απόβλητο της ζυθοποιίας. Τα απόβλητα της ζυθοποιίας κατατάσσονται γενικά στα απόβλητα από την παραγωγή αλκοολούχων και μη αλκοολούχων ποτών (ΕΚΑ: 02 07) και πρέπει να τυγχάνουν διαχείρισης όπως αυτή ορίζεται από τη νομοθεσία (Υ.Α. Η.Π. 50910/2727/2003). Οι στρατηγικές μείωσης και επαναχρησιμοποίησής τους, υποβάλλονται διαρκώς σε μεταβολές, καθώς αναδύονται τεχνολογίες αξιοποίησής τους, φιλικές προς το περιβάλλον (EC, 2017).

1. Εισαγωγή

Στην παρούσα διπλωματική εργασία, μελετήθηκε η αξιοποίηση αυτών των λιγνοκυτταρινούχων υπολειμμάτων, και συγκεκριμένα πιθανοί μέθοδοι για την παραγωγή βιοαιθανόλης 2^{ης} γενιάς από μίγματα εξαντλημένων κόκκων καφέ και σπόρων κριθαριού.

Στο κεφάλαιο 2, γίνεται αναφορά στην φύση, την προέλευση, την σύσταση καθώς και διάφορες χρήσης που σχετίζονται τόσο με τους εξαντλημένους σπόρους καφέ όσο και με τους εξαντλημένους σπόρους κριθαριού. Επιπλέον, γίνεται λόγος για τους τρόπους και τα στάδια παραγωγής της βιοαιθανόλης 2^{ης} γενιάς από διαφορετικά είδη βιομάζας.

Στο κεφάλαιο 3, γίνεται περιγραφή της πειραματικής διαδικασίας της έρευνας, καθώς και των σκευών, διατάξεων και της τροφοδοσίας που χρησιμοποιήθηκε. Επίσης, αναλύονται λεπτομερώς οι μέθοδοι ανάλυσης που χρησιμοποιήθηκαν για την εξαγωγή μετρήσεων και αποτελεσμάτων.

Η εργασία συνεχίζεται με την παράθεση των αποτελεσμάτων της έρευνας καθώς επίσης και των συμπερασμάτων που εξήχθησαν από τις επιμέρους πειραματικές δοκιμές και την επεξεργασία των αποτελεσμάτων αυτών.

2 Θεωρητικό Μέρος

2.1 Ο καφές

2.1.1 Γενικά

Ο καφές είναι το δημοφιλέστερο ποτό σε όλο τον κόσμο και το σημαντικότερο αγροτικό εμπόρευμα στην παγκόσμια αγορά τα τελευταία χρόνια. Σύμφωνα με στατιστικές μελέτες που έχουν γίνει από τον Διεθνή Οργανισμό του Καφέ (ICO), πάνω από 150 εκατομμύρια τεμάχια καφέ των 60kg έχουν παραχθεί το έτος 2017-2018, ενώ αξίζει να σημειωθεί πως η χρήση του καφέ για οικιακή κατανάλωση έχει αυξηθεί κατά 35% την τελευταία δεκαετία αγγίζοντας τα 3 εκατομμύρια τόνους καφέ ετησίως [1]. Τα 2 κύρια είδη καφέ που διατίθενται στην παγκόσμια αγορά ονομάζονται Arabica (*Coffea Arabica*) και Robusta (*Coffea Canephora*). Το 64% της παγκόσμιας παραγωγής αφορά το είδος Arabica και το 34% το είδος Robusta, ενώ για το υπόλοιπο 1% ευθύνονται κάποια μη εμπορεύσιμα είδη καφέ [2, p. 69]. Το είδος Arabica καλλιεργείται σε υψόμετρα άνω των 1000 μέτρων και θεωρείται ανώτερης ποιότητας λόγω της ηπιότερης γεύσης που αναπτύσσεται. Η ποικιλία Robusta χρησιμοποιείται κυρίως στις βιομηχανίες παραγωγής στιγμιαίου καφέ για την παραγωγή διαλυτών εκχυλισμάτων καφέ.

2.1.2 Ιστορία του Καφέ

Κανένας δεν γνωρίζει ακριβώς πότε ανακαλύφθηκε ο καφές, αν και υπάρχουν πολλές ιστορίες για την προέλευσή του. Τα ίχνη του εντοπίζονται αιώνες πίσω, στα αρχαία δάση στην Αιθιοπία, όπου ένας βοσκός με όνομα Kaldi ανακάλυψε για πρώτη φορά τις δυνατότητες αυτών των κόκκων καφέ. Συγκεκριμένα, παρατήρησε πως οι κατσίκες του ήταν αρκετά ζηρηρές και δεν ήθελαν να κοιμηθούν τα βράδια αν είχαν καταναλώσει ποσότητα αυτού του φυτού. Σε συνέχεια, ο Kaldi ανέφερε τα ευρήματά του στον ηγούμενο του τοπικού μοναστηριού, ο οποίος δημιούργησε ένα ποτό από αυτούς τους καρπούς που τον κράτησαν σε επαγρύπνηση κατά τις βραδινές προσευχές. Ο ηγούμενος μοιράστηκε τις ιδιότητες αυτού του φυτού με τους υπόλοιπους μοναχούς και έτσι ξεκίνησε να εξαπλώνεται η γνώση των ενεργητικών δυνατοτήτων του καφέ.

Στην περιοχή της Υεμένης στην Αραβία, η καλλιέργεια και το εμπόριο του καφέ είχαν ήδη ξεκινήσει από τον 15^ο αιώνα, ενώ μετά τον 16^ο αιώνα, ο καφές είχε γίνει γνωστός και στην Περσία, την Αίγυπτο, την Τουρκία και την Συρία. Στην αραβική χερσόνησο, είχαν ήδη εδραιωθεί τα καφεενεία τα οποία είχαν το όνομα “*qahveh khaneh*”, δηλαδή χώροι κοινωνικής δικτύωσης όπου άνθρωποι άκουγαν μουσική, έπαιζαν σκάκι και ανταλλάζαν τα νέα τους πίνοντας αυτό το διάσημο ρόφημα [3].

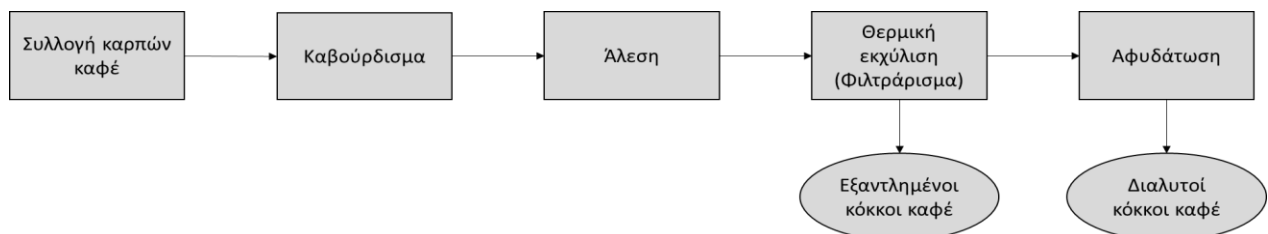
Ο καφές στην Ευρώπη, έφτασε μέσω πολέμου και συγκεκριμένα μετά τη συντριβή των Τούρκων στα τείχη της Βιέννης το 1683. Ο τουρκικός στρατός, ο οποίος τράπηκε σε άτακτη φυγή, άφησε πίσω του όλα του τα εφόδια, ανάμεσά τους και πεντακόσια σακιά με κόκκους καφέ. Οι στρατιώτες που τα βρήκαν, νόμισαν αρχικά πως ήταν τροφή για καμήλες και αποφάσισαν να τα πετάξουν. Ένας Πολωνός, ο Jerzy Franciszek Kulczycki, όμως, ο οποίος είχε ζήσει χρόνια στην Ανατολή ζήτησε και πήρε τελικά το φορτίο για λογαριασμό του. Το πρώτο καφεενείο της Ευρώπης ήταν προ των πυλών. Ο Kulczycki άνοιξε το πρώτο καφεενείο της Ευρώπης στη Βιέννη με το όνομα «*Blue Bottle Coffee House*» και ο πρώτος καφές που σέρβιρε ήταν αλεσμένος σε ψιλή σκόνη και βρασμένος σε νερό, ενώ τον αρωμάτιζε με μέλι και γάλα. Τον καφέ, ο οποίος βαπτίστηκε «*βιεννουά*» τον σέρβιρε μαζί με κρουασάν σε σχήμα ημισελήνου για να θυμίζει την ήττα των Οθωμανών. Σύντομα ο καφές διαδόθηκε σε όλη την Ευρώπη, ενώ μόνο οι Γερμανοί που προτιμούσαν την μπύρα και οι Άγγλοι που προτιμούσαν το τσάι δεν ενθουσιάστηκαν ιδιαίτερα. Στην αρχή ο καφές σερβιρόνταν σκέτος, ενώ η ζάχαρη καθιερώθηκε αργότερα από τις γυναίκες κυρίως που δεν άντεχαν να τον πίνουν σκέτο [4].

2.1.3 Εξαντλημένοι Κόκκοι Καφέ

2.1.3.1 Παραγωγή υπολειμμάτων SCG

Εξαντλημένοι κόκκοι καφέ, (Spent Coffee Grounds – SCG), ονομάζεται το κύριο αδιάλυτο υπόλειμμα που δημιουργείται κατά την παραγωγή του διαλυτού στιγμιαίου καφέ με θερμική εκχύλιση με νερό (φιλτράρισμα) των καβουρδισμένων κόκκων καφέ. Σύμφωνα με τους Murthy και Naidu [5], περίπου 2kg υγρών SCG παράγονται για κάθε 1kg παραγόμενο διαλυτού στιγμιαίου καφέ. Στο Σχήμα 1, παρουσιάζονται τα βασικά στάδια της παραγωγής στιγμιαίου καφέ καθώς και της δημιουργίας του υπολείμματος. Αρχικά, οι πράσινοι καρποί του καφέ υπόκεινται σε μια διαδικασία που ονομάζεται καβούρδισμα. Κατά την διαδικασία αυτή, οι πράσινοι καρποί παίρνουν το καφέ χρώμα ενώ ταυτόχρονα απελευθερώνονται τα αρώματα του καφέ. Στην συνέχεια, ακολουθεί άλεση των κόκκων και φιλτράρισμα

με θερμική εκχύλιση με νερό σε θερμοκρασίες ανάμεσα στους 100 και 180 βαθμούς Κελσίου. Σε αυτό το στάδιο, απομακρύνονται οι εξαντλημένοι κόκκοι καφέ. Το υγρό που απομένει, περιέχει υδατο-διαλυτά στερεά, τα οποία συλλέγονται με αφυδάτωση και περαιτέρω ξήρανση για να παραχθούν οι διαλυτοί κόκκοι του καφέ [6]. Αξίζει να σημειωθεί πως οι SCG δεν παράγονται μόνο από την παραπάνω διαδικασία. Κάθε χρόνο, παράγονται περίπου 6 εκατομμύρια τόνοι εξαντλημένων κόκκων καφέ. Συνολικά, το 50% αυτών προέρχεται από την βιομηχανική παραγωγή του στιγμιαίου διαλυτού καφέ, ενώ το υπόλοιπο 50% προέρχεται από την παγκόσμια παραγωγή ροφημάτων καφέ που παρασκευάζονται σε καφετέριες, εστιατόρια και σπίτια [7]. Οι SCG δεν έχουν καμία εμπορική αξία και συνήθως απορρίπτονται ως στερεά απόβλητα σε χώρους υγειονομικής ταφής ή, σε πολύ περιορισμένο βαθμό, προωθούνται σε εγκαταστάσεις κομποστοποίησης. Τα τελευταία χρόνια όμως, η ανάγκη για μείωση και αξιοποίηση των αποβλήτων έχει διεγείρει το ενδιαφέρον και την αναζήτηση πιθανών μεθόδων χρήσης αυτών των αποβλήτων.



Σχήμα 1: Βασικά στάδια παραγωγής στιγμιαίου καφέ και δημιουργίας υπολείμματος υπό μορφής εξαντλημένων κόκκων καφέ SCG.

2.1.3.2 Σύνθεση υπολειμμάτων SCG

Οι SCG είναι ένα στερεό υπόλειμμα που απαρτίζεται από λεπτόκοκκα σωματίδια, έχει υγρασία έως και 70-80%, ενώ το χαρακτηρίζουν το υψηλό οργανικό φορτίο και η οξύτητα. Ο όρος οργανικό φορτίο σημαίνει πως το υπόλειμμα SCG αποτελείται από οργανικές ουσίες όπως πολυσακχαρίτες, μεταλλικά στοιχεία, πολυφαινόλες, αμινοξέα και πρωτεΐνες καθώς και λιπαρά οξέα.

Οι κόκκοι καφέ αποτελούνται κυρίως από πολυσακχαρίτες (σε ποσοστό ανάμεσα στο 43 και 50% του ξηρού βάρους) όπως κυτταρίνη, γαλακτομαννάνες, αραβινογαλακτάνες και ξυλάνες [6]. Η σύνθεση των SCG εξαρτάται άμεσα από την αρχική σύνθεση των κόκκων αυτών, τις συνθήκες καβουρδίσματος και τη θερμική διεργασία εκχύλισης. Οι SCG αναγνωρίζονται ως μια πλούσια πηγή λιγνοκυτταρινούχων ενώσεων. Η γλυκάνη (κυτταρίνη) με την ημικυτταρίνη και την λιγνίνη αποτελούν τα βασικά συστατικά της λιγνοκυτταρινικής βιομάζας. Η περιεκτικότητα σε λιγνίνη είναι πολύ χαμηλή όσον αφορά τους

σπόρους καφέ (περίπου 5% σε ξηρή βάση), όμως μετά την παραγωγή του διαλυτού στιγμιαίου καφέ, το υπόλειμμα SCG εμπλουτίζεται με αυτή, φτάνοντας περίπου το 30% σε ξηρή βάση. Η σύνθεση των SCG εξαρτάται κυρίως από την δομή και την διαλυτότητα των πολυσακχαριτών, το στάδιο του καβουρδίσματος και την διαδικασία φιλτραρίσματος με θερμό νερό. Αυτό σημαίνει πως κάποιιοι πολυσακχαρίτες μπορεί να ανακτηθούν πλήρως από τους καβουρδισμένους κόκκους καφέ, ενώ κάποιιοι άλλοι επηρεάζονται λιγότερο με αποτέλεσμα να παραμένουν στην δομή των SCG [2, p. 72].

Ανάμεσα στις δύο βασικές ποικιλίες καφέ, την ποικιλία Arabica και την ποικιλία Robusta, μελέτες έχουν δείξει αρκετή διαφοροποίηση ως προς τους περιεχόμενους πολυσακχαρίτες. Συγκεκριμένα, έχει αναφερθεί πως ο καφές ποικιλίας Arabica περιέχει περισσότερους πολυσακχαρίτες από αυτόν της Robusta (Bradbury, 1990), φτάνοντας το ποσοστό 48% και 55%, αντίστοιχα (Clifford, 1986). Άλλες μελέτες έχουν δείξει πως η περιεκτικότητα σε πολυσακχαρίτες είναι παρόμοια για τις δύο αυτές ποικιλίες (Fisher et al., 2001). Επίσης, διαφορές έχουν παρατηρηθεί σχετικά με την ποσότητα και την δομή της μαννάνης ανάμεσα στις δυο ποικιλίες. Παρόλο που στην ποικιλία Arabica έχει βρεθεί μεγαλύτερη ποσότητα μαννάνης, ο βαθμός πολυμερισμού αυτού του πολυσακχαρίτη στην ποικιλία Robusta έχει βρεθεί υψηλότερος.

Όσον αφορά το πρωτεϊνικό περιεχόμενο των SCG, έχει βρεθεί πως η θερμική εκχύλιση οδηγεί σε ένα υπόλειμμα SCG το οποίο έχει μεγαλύτερη περιεκτικότητα σε πρωτεΐνη απ' ό τι ο αρχικός κόκκος καφέ, με εύρος τιμών 7-17% (w/w) σύμφωνα με αναφορές (Campos-Vega et al., 2015). Το εύρος αυτών των τιμών οφείλεται στις διαφοροποιημένες μεθόδους επεξεργασίας του καφέ καθώς επίσης και στο γεγονός πως η μέτρηση της ποσότητας πρωτεΐνης μπορεί να δώσει μεγαλύτερα αποτελέσματα από τα πραγματικά λόγω ύπαρξης άλλων αζωτούχων ενώσεων. Τέτοιες αζωτούχες, μη-πρωτεϊνικές ενώσεις είναι η καφεΐνη (0.7-41 μg/mg SCG) και η μελανοϊδίνη ως αποτέλεσμα αντιδράσεων Maillard (16%).

Σχετικά με την σύνθεση των αμινοξέων, έως και το 50% της σύνθεσης οφείλεται στα απαραίτητα αμινοξέα. Οι SCG είναι πλούσιοι στα απαραίτητα αμινοξέα BCAA όπως βαλίνη, λυσίνη, ισολευκίνη, ενώ περιέχουν και σε μικρότερο βαθμό αρωματικά αμινοξέα AAA όπως τυροσίνη και φαινυλαλανίνη. Οι ποσότητες και οι αναλογίες αυτών των αμινοξέων έχουν φανεί χρήσιμες για αντιμετώπιση διάφορων παθήσεων όπως ασθένειες του ήπατος, οξειδωτικό στρες και υπέρταση [2, p. 73].

Τα λιπίδια μετά την διαδικασία παραγωγής στιγμιαίου καφέ, παραμένουν στο υπόλειμμα SCG. Αυτά βρίσκονται σε ποσοστά από 10 έως 20% κατά βάρος (Πίνακας 1) [8, p. 35777] και αποτελούνται κυρίως από γλυκερίδια (80-90%), περιλαμβανομένου των λιπαρών οξέων ενώ τα υπόλοιπα είναι τερπένια (cafestol και kahweol), στερόλες (όπως σιτοστερόλη, στιγμαστερόλη και καμπεστερόλη) και

2.1 Θεωρητικό Μέρος: Ο καφές

τοκοφερόλες. Τα κύρια λιπαρά οξέα είναι τα λινελαϊκά, τα παλμιτικά, τα στεαρικά και τα ελαϊκά οξέα, ενώ σε μικρότερες συγκεντρώσεις υπάρχουν τα αραχιδικά και τα λινολενικά οξέα.

Οι SCG περιλαμβάνουν σημαντική ποσότητα φαιολικών ουσιών, κυρίως χλωρογενικού οξέος (CGA) σε ποσοστά από 0.1 έως 0.8% κατά βάρος σε ξηρή βάση [9, p. 157] και των παράγωγων του όπως καφεοϋλκινικό οξύ, φερουλοϋλκινικό οξύ, ρ-κουμαροϋλκινικό οξύ καθώς και μικτούς διεστέρες καφεϊκών και φερουλικών οξέων με κινικό οξύ [10]. Συνολικά, μια πολύ καλή προσέγγιση της σύνθεσης των εξαντλημένων κόκκων καφέ, SCG, βρίσκεται παρακάτω στον Πίνακα 1.

Πίνακας 1: Χημική σύνθεση των εξαντλημένων κόκκων καφέ, SCG [8, p. 35777]

Χημική σύνθεση των SCG	Περιεχόμενο (wt.%)
Κυτταρίνη	8.6-13.3
Ημικυτταρίνη	30-40
Πρωτεΐνες	6.7-13.6
Έλαια	10-20
Λιγνίνη	25-33
Πολυφαινόλες	2.5
Καφεΐνη	0.02
Αραβινόζη	1.7
Γαλακτόζη	13.8
Μαννόζη	21.2
Τέφρα	1.6
Οργανική Ύλη	90.5

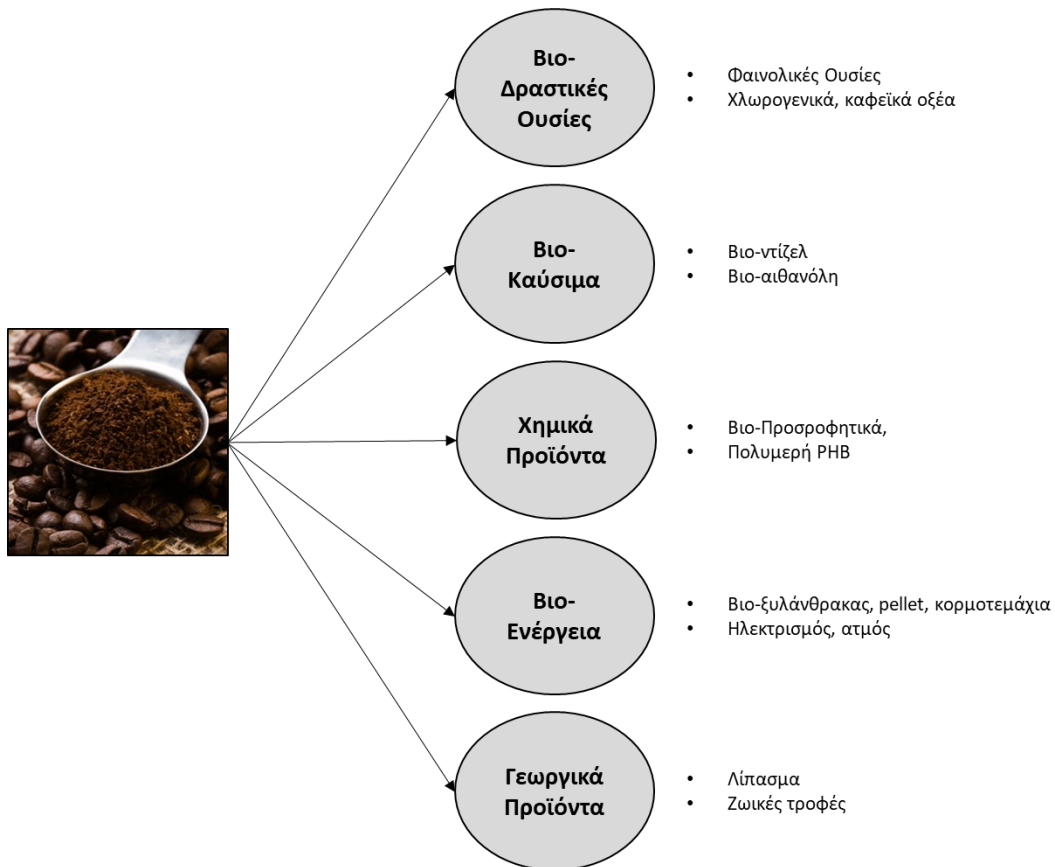
Όσον αφορά την θερμογόνο δύναμη των εξαντλημένων κόκκων καφέ, έρευνες έχουν δείξει πως η ανώτερη θερμογόνο δύναμη των SCG είναι περίπου 21.9-23 MJ/kg. Οι αναλογίες C,H,N,O,S που καθορίζουν την HHV των SCG όπως έχει βρεθεί από διάφορες πηγές βρίσκεται παρακάτω:

Πίνακας 2: Στοιχειακή ανάλυση των SCG και υπολογισμός της ανώτερης θερμογόνου δύναμης HHV [11, p. 5] [12, p. 27585]

Πρώτη Ύλη	Στοιχειακή Ανάλυση (wt. %)					HHV (MJ/kg)
	C	H	N	O	S	
SCG	48.9-57.56	6.95-7.9	1.5-3.51	32.1-40.1	0.00-0.24	21.9-23

2.1.3.3 Επεξεργασία και αξιοποίηση υπολειμμάτων SCG

Έντονο ενδιαφέρον έχει παρατηρηθεί τα τελευταία χρόνια σχετικά με την αξιοποίηση των υπολειμμάτων του καφέ. Έχουν γίνει αρκετές έρευνες, όχι μόνο για την σωστή διαχείριση αυτού του είδους απορριμμάτων, αλλά η σύστασή τους αποτελεί ενδιαφέρον κομμάτι για την παραλαβή διαφόρων χρήσιμων προϊόντων. Δεν μπορεί, όμως, να παραληφθεί η έντονη επιβάρυνση του περιβάλλοντος που προκύπτει από την τυχαία διάθεσή τους. Στο Σχήμα 2 φαίνονται συνοπτικά οι κύριες πιθανές εφαρμογές που προκύπτουν από την επεξεργασία των υπολειμμάτων SCG.



Σχήμα 2: Εφαρμογές και προϊόντα από την αξιοποίηση των υπολειμμάτων καφέ SCG

2.1.3.3.1 Αντιοξειδωτική δράση των SCG

Η χρήση των SCG ως πιθανής πηγής βιο-δραστικών ενώσεων, κυρίως πολυφαινόλων, είναι μια μία υποσχόμενη αλλά ελάχιστα εξεζητημένη προσέγγιση, από τεχνολογικής άποψης. Όπως έχει αποδειχθεί, οι φυτικές πολυφαινόλες λαμβάνουν ιδιαίτερη προσοχή από επιστημονικές αλλά και ιατρικές κοινότητες, όχι μόνο για τις ισχυρές αντιοξειδωτικές τους ιδιότητες, αλλά και για την ικανότητα τους να παρεμβαίνουν σε πολλά στάδια ανάπτυξης του καρκίνου [10]. Το εκχύλισμα του εξαντλημένου καφέ έχει χαρακτηριστεί ως μια πηγή φυσικών αντιοξειδωτικών, με αντιφλεγμονώδεις και αντι-αλλεργικές ιδιότητες [13], ενώ ταυτόχρονα αποτελεί πηγή προβιοτικών ενώσεων, όπως και αντιμικροβιακής δράσης [14]. Ο καφές, και επομένως και τα υπολείμματά του, περιέχει αρκετές ποσότητες φαινολικών ουσιών. Όπως αναφέρεται στον Πίνακα 1, οι πολυφαινόλες αποτελούν ποσοστό περίπου 2.5% κατά βάρος σε υπολείμματα καφέ, SCG, από τα οποία το χλωρογενικό οξύ CGA και τα παράγωγά του (όπως καφεοϋλκινικό οξύ, φερουλοϋλκινικό οξύ, ρ-κουμαροϋλκινικό οξύ καθώς και μικτούς διεστέρες καφεϊκών και φερουλικών οξέων με κινικό οξύ) βρίσκονται σε ποσοστά μεταξύ 0.1 και 0.8% κατά βάρος. Τα χλωρογενικά αυτά οξέα, όπως ονομάζονται, παρουσιάζουν μεγάλο ενδιαφέρον για τους επιστήμονες καθώς και για τους μηχανικούς τροφίμων και φαρμάκων, αφού παρουσιάζουν πολλές βιολογικές και λειτουργικές ιδιότητες: αντιμικροβιακές, αντιικές (κατά των ιώσεων), αντιμυκοτοξικές, αντικαρκινικές, αντιοξειδωτικές, χηλικές [15].

Η ανάκτηση των πολυφαινολικών αντιοξειδωτικών από υπολείμματα καφέ, SCG, ξεκινά με την προκατεργασία της ύλης. Οι SCG, λόγω της υψηλής υγρασίας που μπορεί να φτάνει το 70-80% [2, p. 71], υπόκεινται σε ξήρανση και, στην συνέχεια, μείωση του μεγέθους τους με άλεσμα. Έρευνες [16] συνιστούν υποχρεωτική ξήρανση της πρώτης ύλης περίπου στους 40 °C, προκειμένου να αυξηθεί η σταθερότητα και ο χρόνος αποθήκευσης των SCG. Η ανάκτηση των υδρόφιλων βιο-δραστικών ουσιών, στην συνέχεια, γίνεται με εκχύλιση με πολικό διαλύτη. Μελέτες [17] [18] [19, pp. 4162-4168] αποδεικνύουν πως η αφαίρεση των λιπιδίων με εκχύλιση Soxhlet με χρήση οργανικών διαλυτών, πριν από την εκχύλιση για ανάκτηση των πολυφαινόλων, επιδρά θετικά στην τελική απόδοση της διεργασίας. Το στάδιο αφαίρεσης, ή μάλλον ανάκτησης ελαίων SCG, έδειξε να αυξάνει την αντιοξειδωτική ικανότητα των SCG, καθώς αποφεύγεται η οξείδωση των λιπιδίων και ο σχηματισμός ελευθέρων ριζών κατά την διάρκεια μακράς αποθήκευσης του εκχυλίσματος [20]. Η καλύτερη απόδοση στην εκχύλιση για ανάκτηση πολυφαινόλων επιτυγχάνεται συνήθως χρησιμοποιώντας ισομοριακό μίγμα αιθανόλης και νερού (1:1) ως διαλύτη. Γενικά, η χρήση μιγμάτων αιθανόλης ως διαλύματα αυτών των εκχυλίσεων οδηγούν σε υψηλότερη πολυφαινολική απόδοση (3 φορές μεγαλύτερη από την χρήση μίγματος

2.1 Θεωρητικό Μέρος: Ο καφές

ισοπροπανόλης/νερού). Η αύξηση της συγκέντρωσης αιθανόλης στο διάλυμα εκχύλισης αυξάνει την πολυφαινολική απόδοση μέχρι ένα κρίσιμο σημείο (περίπου μέχρι 60% συγκέντρωσης αιθανόλης). Από το σημείο εκείνο και μετά, η αύξηση της συγκέντρωσης της αιθανόλης επιδρά αρνητικά στην τελική απόδοση της εκχύλισης, ενώ η χρήση καθαρής αιθανόλης οδηγεί σε απόδοση ακόμη μικρότερη και από την χρήση καθαρού νερού [21, p. 101]. Αξίζει να σημειωθεί, πως η χρήση μεθανόλης αποδίδει ακόμη μικρότερες αποδόσεις, συγκριτικά με την χρήση αιθανόλης ή νερού, σύμφωνα με έρευνες που πραγματοποιήθηκαν από τους Murthy & Naidu [5]. Ένας ακόμη σημαντικός παράγοντας, που επηρεάζει την συνολική απόδοση της εκχύλισης πολυφαινόλων από SCG, σχετίζεται με την εφαρμογή συνεχούς και διαδοχικής εκχύλισης με την οποία μπορεί να αυξάνει την απόδοση αλλά επίσης αυξάνεται και το κόστος και ο χρόνος που καταναλώνονται για την διεργασία [19].

Η συγκέντρωση φαινολικών ενώσεων που εκφράζονται σε ισοδύναμα γαλλικού οξέος (GAE) στα παραπροϊόντα του καφέ ποικίλλει ανάλογα με τις συνθήκες εκχύλισης λόγω της διαλυτότητας των ενώσεων. Στον Πίνακα 3, φαίνονται τα αποτελέσματα από μελέτες που έχουν γίνει και αφορούν τα ολικά φαινολικά, φλαβονοειδή, χλωρογενικά και καφεϊκά οξέα καθώς και την αντιοξειδωτική δραστηριότητα σε εκχυλίσματα από υπολείμματα SCG. Στην 2^η στήλη οι εκχυλίσεις έχουν γίνει με χρήση νερού, ενώ στην 3^η στήλη για τις εκχυλίσεις χρησιμοποιήθηκε μίγμα αιθανόλης/νερού με αναλογία 3:2 κατ' όγκο [19].

Πίνακας 3: Ολικά φαινολικά, φλαβονοειδή, χλωρογενικά και καφεϊκά οξέα καθώς και αντιοξειδωτική δραστηριότητα σε εκχυλίσματα από υπολείμματα SCG [19]

Βιο-Δραστικές Ουσίες	Εκχύλιση με Νερό	Εκχύλιση με μίγμα Αιθανόλης/Νερού (3:2 v/v)
Φαινολικά (mg GAE/g)	19.6	28.2
Φλαβονοειδή (mg QE/g)	3.2	5.63
Αντιοξειδωτικά -EC ₅₀ (%v/v)	2.3	1.4
Χλωρογενικά οξέα (mg CQAE/g)	6.67	5.97
Καφεϊκά οξέα (mg/g)	11.2	11.5

Φαρμακοκινητικές μελέτες έχουν δείξει ότι περίπου το ένα τρίτο των απορριφθέντων χλωρογενικών οξέων απορροφάται στο στομάχι και το εγγύς δωδεκαδάκτυλο, ενώ τα υπόλοιπα διασπώνται από την μικροχλωρίδα του εντέρου σε καφεϊκά και κινικά οξέα. Τα 2 αυτά οξέα έχουν αποδειχθεί πως παρέχουν νευροτροφικές και νευροπροστατευτικές ιδιότητες [10].

Κατά την διεργασία του καβουρδίσματος του καφέ, οι φαινολικές ουσίες αντιδρούν με τις ελεύθερες ρίζες αντιδράσεων Maillard και μπορεί να ενσωματωθούν σε προϊόντα αντιδράσεων Maillard καφέ χρώματος (MRPs), τα οποία ονομάζονται μελανοΐδινες. Οι μελανοΐδινες, που παράγονται από την θερμική αυτή επεξεργασία, είναι ένα από τα κύρια συστατικά των παρασκευασμάτων του καφέ, αντιπροσωπεύοντας έως και το 25% της ύλης σε ξηρή βάση. Είναι ενώσεις που χαρακτηρίζονται από ισχυρές αντιοξειδωτικές ιδιότητες και την ικανότητα χηλώσεως μετάλλων (δημιουργίας συμπλόκου μεταξύ ενός μετάλλου και μιας άλλης οργανικής ουσίας, προκειμένου να αυξήσει την απορρόφηση των μετάλλων από τον οργανισμό). Ωστόσο, στην περίπτωση των SCG, οι ουσίες αυτές, σύμφωνα με μελέτες, καταλαμβάνουν πολύ μικρότερη συγκέντρωση σε σχέση με τον αρχικό καφέ και αυτό καθιστά την εκχύλιση τους ως μια μη εφικτή διαδικασία [17].

2.1.3.3.2 Ανάκτηση ελαίων και παραγωγή Βιοντίζελ

Το βιοντίζελ είναι ένα υγρό και καθαρό βιοκαύσιμο που παράγεται από ανανεώσιμες πηγές ενέργειας (βιομάζα) και θεωρείται υποκατάστατο του συμβατικού ντίζελ. Χαρακτηριστικό του είναι πως έχει θετική επίδραση στις εκπομπές καυσαερίων (σε σχέση με το πετρελαϊκό ντίζελ) όταν αναμειγνύεται με συμβατικό ντίζελ καθώς η περιεκτικότητά του σε οξυγόνο είναι περίπου 10%. Σε αντίθεση με το πετρελαϊκό ντίζελ, είναι ένα καθαρό, μη τοξικό, βιοδιασπώμενο καύσιμο που δεν περιέχει αρωματικές ενώσεις, οδηγεί σε πολύ χαμηλές εκπομπές SO_x, σωματιδιακού καπνού, αιθάλης και CO, δεν αυξάνει (ή αυξάνει λίγο) τις εκπομπές NO_x, ενώ συμβάλλει αποτελεσματικά στη μείωση των αερίων του θερμοκηπίου (π.χ. CO₂) αφού προέρχεται από βιολογικές πηγές. Θεωρητικά, το βιοντίζελ μπορεί να παραχθεί από οποιονδήποτε φυτικό ή ζωικό οργανισμό που με κατάλληλες διεργασίες (εκχυλίσεις) μπορεί να δώσει έλαιο ή λίπος [22, p. 142].

Οι εξαντλημένοι κόκκοι καφέ, SCG, χαρακτηρίζονται από την πλούσια περιεκτικότητά τους σε άνθρακα, αφού, όπως φαίνεται και στον Πίνακα 2, ο άνθρακας C έρχεται πρώτος σε ποσοστό κοντά στο 53%, ενώ τον ακολουθεί το οξυγόνο O με ποσοστό κοντά στο 35%. Το γεγονός αυτό, καθώς και ότι η περιεκτικότητά της ύλης σε έλαια βρίσκεται στο διάστημα 10-20% (σύμφωνα με τον Πίνακα 1), έχει κάνει τους SCG αντικείμενο πολλών ερευνών με στόχο την ανάκτηση λιπιδίων και την παραγωγή βιοντίζελ.

Υπάρχουν πολλές μέθοδοι ανάκτησης των ελαίων από τους εξαντλημένους κόκκους καφέ, όπως η απλή εκχύλιση με διαλύτη, η εκχύλιση Soxhlet, η εκχύλιση υπερκρίσιμου ρευστού (SFE) συνήθως με χρήση CO₂, η εκχύλιση υπερήχων και η εκχύλιση μικροκυμάτων [23]. Πριν την εκχύλιση των SCG, απαιτείται ξήρανση της ύλης καθώς η παρουσία της μειώνει σημαντικά την αποδοτικότητα της

διεργασίας [24]. Το λάδι, συνήθως εκχυλίζεται με την βοήθεια οργανικών διαλυτών όπως το κανονικό εξάνιο, την ισοπροπανόλη ή και μίγμα αυτών των δύο [23].

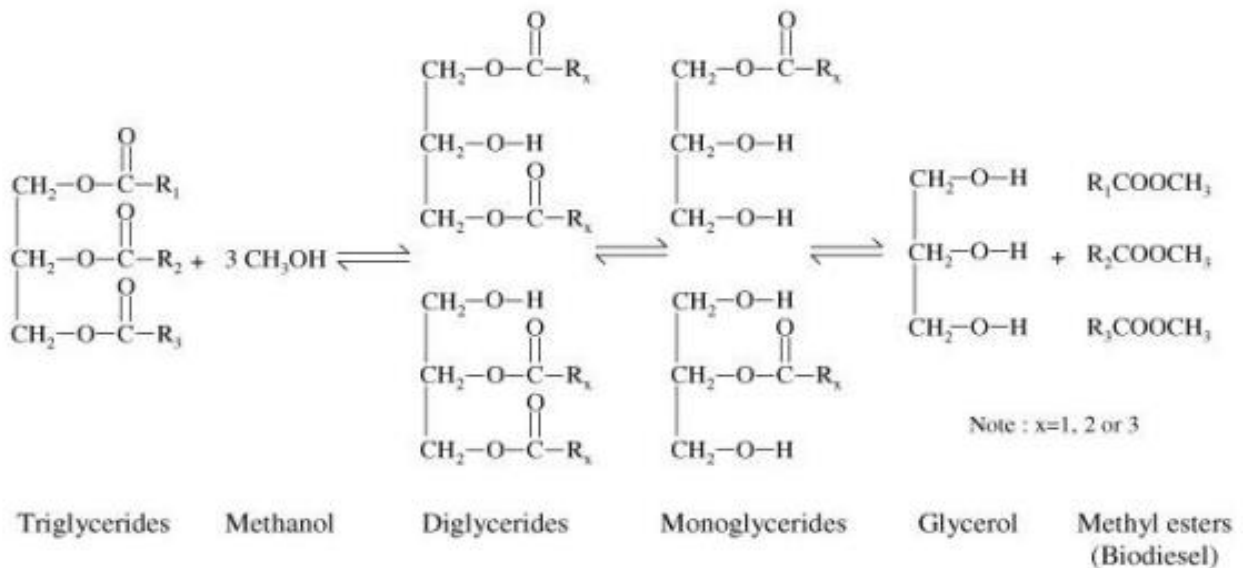
Στην περίπτωση της απλής εκχύλισης, συνιστάται ανάδευση σε καθορισμένο χρόνο και η χρήση κατάλληλου διαλύματος όπως το κανονικό εξάνιο ή το επτάνιο. Η διεργασία απλής εκχύλισης θεωρείται ως διεργασία με την χαμηλότερη απόδοση σε έλαια (περίπου 7-13 g ελαίων/100g SCG) σύμφωνα με μελέτες [18].

Η εκχύλιση Soxhlet αποτελεί την συνήθη μέθοδο εκχύλισης ελαίων που χρησιμοποιείται ακόμη και σαν μέθοδος αναφοράς κατά την ανάπτυξη και τη χρήση εκχύλισης SFE όπως αναφέρουν πηγές [18]. Για την διεξαγωγή της, έχουν χρησιμοποιηθεί διάφοροι πολικοί και μη πολικοί διαλύτες. Διαλύτες με υψηλό σημείο βρασμού όπως το τολουόλιο και η ισοπροπανόλη φαίνεται να καταναλώνουν πολύ περισσότερη ενέργεια από αυτούς με χαμηλότερο, όπως εξάνιο και πεντάνιο, κατά την διάρκεια της εκχύλισης. Παρόλα αυτά, η χρήση διαλυτών με χαμηλά σημεία βρασμού έχει αποδειχθεί πως οδηγεί σε σημαντικές απώλειες διαλύτη κατά την εκχύλιση. Συνεπώς, τέτοιοι διαλύτες μπορεί να φανούν μη οικονομικοί όταν χρησιμοποιούνται για εκχύλιση [24]. Ο πιο ευρέως χρησιμοποιούμενος διαλύτης για την εκχύλιση Soxhlet φαίνεται να είναι το κανονικό εξάνιο, αν και μελέτες αποκαλύψαν πως το η-οκτάνιο είναι μακράν ο πιο αποδοτικός διαλύτης που μπορεί να χρησιμοποιηθεί παρέχοντας υψηλή απόδοση λαδιού που φτάνει τα 26.5g ελαίων/100g SCG [25]. Πολικοί διαλύτες, όπως η αιθανόλη και η ισοπροπανόλη, επίσης οδηγούν σε πολύ καλή απόδοση λαδιού μέχρι και 16g ελαίων/100g SCG. Φιλικές προς το περιβάλλον τεχνολογίες εκχύλισης, όπως η SFE, χρησιμοποιούνται όλο και περισσότερο για την ανάκτηση λιπιδίων από τα υπολείμματα SCG. Σε σύγκριση με την προηγούμενη μέθοδο (μέθοδος εκχύλισης Soxhlet), η SFE αποδίδει μικρότερες αποδόσεις που φτάνουν το 80-90% της μεθόδου Soxhlet. Η σημαντικότερη λειτουργική παράμετρος, που επηρεάζει την τελική απόδοση της εκχύλισης SFE, αποτελεί η πίεση λειτουργίας. Η αύξηση της πίεσης, λόγω της αύξησης της πυκνότητας του ρευστού και της διαλυτικής ισχύς του CO₂, έχει ως αποτέλεσμα την αύξηση της απόδοσης της διεργασίας. Βάση μελετών που έχουν διεξαχθεί και αφορούν την βελτιστοποίηση της εκχύλισης SFE, έχει βρεθεί πως η χρήση υψηλότερης θερμοκρασίας (50-55 °C) και πίεσης (190-300 bar) καθώς και η προσθήκη πολικού συνδιαλύτη (όπως αιθανόλη 5 wt%) αποτελεί λύση ώστε να επιτευχθεί η υψηλότερη περιεκτικότητα σε λιπίδια κατά την διάρκεια της διεργασίας [21, p. 117]. Επιπλέον, μια οικονομική αξιολόγηση της εκχύλισης Soxhlet [26] αποκάλυψε πως οι πιο συμφέρουσες συνθήκες λειτουργίας είναι οι εξής: Πίεση 300bar, θερμοκρασία 50 °C, 30kg CO₂ για κάθε 1kg SCG και για κάθε 1 ώρα.

2.1 Θεωρητικό Μέρος: Ο καφές

Η εφαρμογή εναλλακτικών μεθόδων εκχύλισης για ανάκτηση ελαίων από υπολείμματα SCG διεξήχθη σε μία μελέτη [27], όπου οι συγγραφείς συνέκριναν την απόδοση ελαίων από εκχύλιση υπερήχων (Ultrasound Assisted Extraction, UAE) και από εκχύλιση μικροκυμάτων (Microwave Assisted Extraction, MAE) χρησιμοποιώντας πετρελαϊκό βενζόλιο και n-εξάνιο ως διαλύτες. Η εφαρμογή αυτών των διαλυτών και στις δυο περιπτώσεις δεν έδειξε σημαντικές διαφορές ως προς την απόδοση των εκχυλίσεων, όμως γενικά σε σύγκριση με άλλες μεθόδους όπως η μέθοδος Soxhlet, τα αποτελέσματα έχουν μεγάλη διαφορά. Οι αποδόσεις σε έλαια τόσο στην μέθοδο υπερήχων, όσο και σε αυτή των μικροκυμάτων, είναι αρκετά μικρότερες σε σύγκριση με την μέθοδο Soxhlet. Ωστόσο, βρέθηκε πως η αύξηση της ισχύος των μικροκυμάτων (200-800 W) αποδίδει παρόμοια αποτελέσματα με την εκχύλιση υπερήχων. Τα οφέλη των 2 αυτών μεθόδων σχετίζονται με τη μείωση του χρόνου εκχύλισης (διάρκεια 10 λεπτών στην περίπτωση των μικροκυμάτων) και με την χαμηλότερη θερμοκρασία που απαιτείται.

Το λάδι που ανακτάται από τα τις παραπάνω μεθόδους, στην συνέχεια, μπορεί να μετατραπεί σε βιοντίζελ με αντιδράσεις μετεστεροποίησης. Η αντίδραση μετεστεροποίησης είναι μια αντιστρέψιμη αντίδραση με 3 διαδοχικά βήματα, όπου τα τριγλυκερίδια μετατρέπονται σε διγλυκερίδια, τα διγλυκερίδια σε μονογλυκερίδια και τα μονογλυκερίδια μετατρέπονται σε εστέρες και γλυκερόλη (Σχήμα 3). Η αντίδραση αυτή δίνει 3 moles μονοαλκυλεστέρα λιπαρού οξέος(Βιοντίζελ) και 1 mole γλυκερόλης που αποτελεί το παραπροϊόν [23].



Σχήμα 3: Αντιδράσεις μετεστεροποίησης ενός τριγλυκεριδίου [23]

Ακόμη, έχει αναφερθεί πως το ανακτώμενο λάδι από τα υπολείμματα SCGs μπορεί να χρησιμοποιηθεί για την παραγωγή πολυϋδροξυβουτυρικού εστέρα (PHBs). Λόγω των μηχανικών ιδιοτήτων του, που είναι παρόμοιες με εκείνες του πολυπροπυλενίου ή πολυαιθυλενίου, το PHB θεωρείται ως μία εναλλακτική λύση έναντι των συνθετικών πολυμερών. Είναι ένα πολυμερές που μπορεί να παραχθεί από ανανεώσιμες πηγές ή πηγές αποβλήτων όπως το SCG και είναι απολύτως βιοαποικοδομήσιμο [28]. Σύμφωνα με πηγές [29], τα πολυυδροξυαλκανοϊκά (PHAs) στα οποία ανήκει ο PHB, μπορούν να παραχθούν με εκχύλιση υπερκρίσιμου ρευστού σε ένα ημι-συνεχές σύστημα υψηλής πίεσης εξοπλισμένο με 4 φίλτρα. Από την άλλη πλευρά, άλλες μελέτες [28] έδειξαν πως η εκχύλιση των ελαίων για παραγωγή των PAHs επιτυγχάνεται και με εκχύλιση Soxhlet. Τα αποτελέσματα αυτής της μελέτης για 70gr SCG με διαλύτη κανονικό εξάνιο 250mL ήταν ένα έλαιο απαρτιζόμενο από παλμιτικά και λινελαϊκά οξέα με συγκεντρώσεις 35.7% και 43.7% αντίστοιχα. Τα οξέα αυτά χρησιμοποιούνται για την παραγωγή PAHs, και συγκεκριμένα PHBs, με χρήση *Cupriavidus necator* ως βιοκαταλύτη. Έχει καταγραφεί πως με χρήση *Cupriavidus necator* ως βιοκαταλύτη η απόδοση της διεργασίας αυτής φτάνει τα 0.82g PHBs/g λαδιού SCG [28].

2.1.3.3 Ανάκτηση σακχάρων και παραγωγή Βιοαιθανόλης

Η βιοαιθανόλη, στην σημερινή εποχή, αποτελεί την κύρια εναλλακτική λύση για περιβαλλοντικά βιώσιμη ενέργεια. Είναι ένα υποσχόμενο υποκατάστατο των παραδοσιακών ορυκτών καυσίμων όπως είναι η βενζίνη στις μηχανές εσωτερικής καύσης (MEK). Χαρακτηριστικό της βιοαιθανόλης είναι πως έχει καλύτερη αναλογία άνθρακα προς υδρογόνο (1:3) σε σχέση με τη βενζίνη (1:1,8), ενώ δεν είναι τοξική όπως τα ορυκτά υγρά καύσιμα. Η πρώτη χώρα που χρησιμοποίησε τη βιοαιθανόλη ως καύσιμο MEK ήταν η Βραζιλία, με χρήση πρώτης ύλης ζαχαροκάλαμο, ενώ ακολούθησαν σταδιακά και η ΗΠΑ και η ΕΕ, με πρώτη ύλη το καλαμπόκι και τα σιτηρά, ζαχαρότευτλα κλπ. αντίστοιχα [22, p. 96]. Σήμερα, η βιοαιθανόλη βρίσκεται πρώτη στην αγορά ανανεώσιμων πηγών ενέργειας και προσφέρει μείωση των εκπομπών CO₂ πάνω από 80% σε σύγκριση με τα μη ανανεώσιμα καύσιμα [21, p. 225].

Τα υπολείμματα του καφέ, SCG, αποτελούν μια καλή πηγή υδατανθράκων (π.χ. κυτταρίνη και ημικυτταρίνη όπως φαίνεται και στον Πίνακα 1) και αυτό τους δίνει την δυνατότητα να μπορούν να χρησιμοποιηθούν για παραγωγή αιθανόλης 2^{ης} γενιάς. Η παραγωγή της βιο-αιθανόλης από την λιγνοκυτταρική βιομάζα των SCG απαιτεί τον συνδυασμό 4 βημάτων:

- Μείωση μεγέθους
- Προκατεργασία με αραιωμένο οξύ

- Ενζυμική Υδρόλυση
- Ζύμωση
- Απόσταξη για παραγωγή βιο-αιθανόλης

Το πρώτο στάδιο της διαδικασίας περιλαμβάνει την μείωση του μεγέθους του υλικού με άλεσμα και κοσκίνισμα της ύλης SCG. Στο δεύτερο στάδιο, το κλάσμα ημικυτταρίνης υδρολύεται με θειικό οξύ (2% κατά βάρος) στους 100 °C. Τα προϊόντα που λαμβάνονται από την όξινη υδρόλυση είναι αδιάλυτο στερεό κλάσμα και ένα υγρό κλάσμα το οποίο είναι πλούσιο σε πεντόζες (σάκχαρα με 5 άτομα άνθρακα, C5 σάκχαρα). Το υγρό αυτό κλάσμα διαχωρίζεται από το στερεό με διήθηση. Τέλος, το στερεό κλάσμα, που είναι πλούσιο σε κυτταρίνη και λιγνίνη, υποβάλλεται στην διεργασία της ενζυμικής υδρόλυσης στους 50 °C. Τα προϊόντα αυτής της διεργασίας αποτελούν ένα υγρό κλάσμα πλούσιο σε εξόζη (σάκχαρα με 6 άτομα άνθρακα, C6 σάκχαρα) και ένα στερεό κλάσμα πλούσιο σε λιγνίνη και κυτταρίνη που δεν αντέδρασε [21, p. 81]. Από την όξυνση των SCG, λαμβάνονται ως παραπροϊόντα όπως η φουρφουράλη και η Υδροξυμεθυλοφουρφουράλη (HMF) μέσω αντιδράσεις αποσύνθεσης των σακχάρων. Το γεγονός αυτό κάνει αναγκαία την εφαρμογή μεθόδου αποτοξίνωσης ώστε στο επόμενο στάδιο της ζύμωσης (όπου χρησιμοποιείται ο μικροοργανισμός *Zygomonas mobilis*) , να αποφευχθεί η πιθανότητα δηλητηρίασης και αναστολής της διεργασίας [30].

Το στάδιο της ζύμωσης διεξάγεται με τον μικροοργανισμό *Z. Mobilis*, όπου εξόζες και πεντόζες θεωρούνται ως πρώτη ύλη. Από την άλλη πλευρά, σαν εναλλακτική λύση χρησιμοποιείται ο *S. Cerevisiae* ως μικροοργανισμός ζύμωσης για παραγωγή αιθανόλης χρησιμοποιώντας εξόζες ως πρώτη ύλη. Αρχικά, το πλούσιο σε σάκχαρα υγρό αποστέλλεται σε διαδικασία αποστείρωσης στους 121 °C η οποία εξουδετερώνει κάθε βιολογική δραστηριότητα. Στην συνέχεια, η διαδικασία της ζύμωσης γίνεται με τον *S. Cerevisiae* στους 37 °C και με τον *Z. Mobilis* στους 30 °C. Η κυτταρική βιομάζα διαχωρίζεται από τον ζυμό καλλιέργειας με μια απλή μέθοδο καθίζησης με την βοήθεια της βαρύτητας. Μετά την ζύμωση, ο ζυμός καλλιέργειας, οποίος περιέχει περίπου 5-10% w/w αιθανόλη προωθείται στο τελευταίο στάδιο διαχωρισμού, σε 2 αποστακτικές στήλες. Στην 1^η στήλη, συγκεντρώνεται το 45-50% κατά βάρος της αιθανόλης. Στην 2^η στήλη, η αιθανόλη συγκεντρώνεται έως εμφάνιση αζεοτροπικού σημείου (στο 96% κατά βάρος) όπου οδηγείται σε ξήρανση με μοριακά κόσκινα. Η τελική συγκέντρωση βιο-αιθανόλης στο υγρό που λαμβάνεται ως προϊόν είναι περίπου 99.6% κατά βάρος [21, p. 82].

Κρίνοντας από το περιεχόμενο και τη σύνθεση των SCG σε πολυσακχαρίτες, μπορούν να χρησιμοποιηθούν 2 διαφορετικές μέθοδοι παραγωγής 2^{ης} γενιάς βιο-αιθανόλη:

- Χρήση σακχάρων από ημικυτταρίνη (σάκχαρα με 5 άτομα άνθρακα C όπως η ξυλόζη και η αραβινόζη και με 6 άτομα άνθρακα C όπως η μαννόζη και η γαλακτόζη)
- Χρήση σακχάρων από κυτταρίνη (σάκχαρα με 6 άτομα άνθρακα C όπως η γλυκόζη).

Η ανάκτηση σακχάρων από την ημικυτταρίνη προϋποθέτει όξινη προκατεργασία, ενώ η ανάκτηση γλυκόζης από την κυτταρίνη γίνεται με ενζυμική υδρόλυση της προκατεργασμένης ύλης. Πηγές αναφέρουν πως η ζύμωση των σακχάρων με 6 άτομα άνθρακα με σακχαρομύκητα *S. Cerevisiae* οδηγούν σε παραγωγή 11 g/L αιθανόλης με απόδοση 50.2%. Επισημαίνεται πως άλλοι μικροοργανισμοί όπως ο μύκητας *Pichia Stipitis* και ο *Kluyveromyces fragilis* έχουν μικρότερη απόδοση συγκριτικά με τον *S. Cerevisiae* [2, p. 84].

2.1.3.3.4 Προσροφητικές ιδιότητες των SCG

Τα υπολείμματα του καφέ, SCG, μπορούν να χρησιμοποιηθούν ως μέτρο αντιμετώπισης της μόλυνσης του εδάφους με βλαβερά βαριά μέταλλα. Συγκεκριμένα, έχει βρεθεί πως οι SCG δρουν ως βιο-αποικοδομητές και μπορούν να προσροφήσουν ποσότητες Νικελίου και Καδμίου τόσο από το έδαφος όσο και από καλλιεργούμενα βρώσιμα λαχανικά όπως ο κόλιανδρος [31].

Άλλες πηγές αναφέρονται στη δυνατότητα των SCG να αυξάνουν την ατομική διασπορά νανοσωματιδίων μη-ασθενούς σιδήρου (Nanoscale Zero-Valent Iron -NZVI) με αποτέλεσμα και την αυξημένη επιφανειακή ενεργότητά του. Το μέταλλο NZVI είναι ικανό να προσροφήσει σε μεγάλο βαθμό ιόντα μόλυβδου Pb(II) και καδμίου Cd(II) σε συνθήκες pH μεταξύ 4-6, ενώ σε pH 2-4 μπορεί να προσροφήσει ικανοποιητικά ιόντα αρσενικού As(III) και As(V). Με την υποστήριξη υπολειμμάτων SCG, η ικανότητα προσρόφησης του NZVI αλλά και ο ρυθμός της απορρόφησης των μετάλλων αυξάνεται [32].

Τα υπολείμματα SCG μπορούν να δράσουν και από μόνα τους για την προσρόφηση ιόντων καδμίου εντός υδατικών διαλυμάτων, σύμφωνα με μελέτες της N. Azouaou και των συνεργατών της [33]. Οι μελέτες σχετίζονται με την επίδραση διάφορων παραμέτρων στο τελικό αποτέλεσμα προσρόφησης (αρχική συγκέντρωση 10-700 mg/L, χρόνος επαφής 0-240 λεπτά, δόση προσροφητικού 3-24gr, pH 2-8, θερμοκρασία 20-50 °C). Από τα πειραματικά αποτελέσματα αποδείχθηκε πως η μέγιστη ικανότητα προσρόφησης ιόντων καδμίου από τα SCG ήταν 15.65 mg/g, και η οποία επιτυγχάνεται με τις ακόλουθες συνθήκες λειτουργίας: θερμοκρασία περιβάλλοντος 20 °C, δόση προσροφητικού 9gr, αρχική συγκέντρωση $[Cd]_0=100\text{mg/L}$ και $\text{pH}=7$.

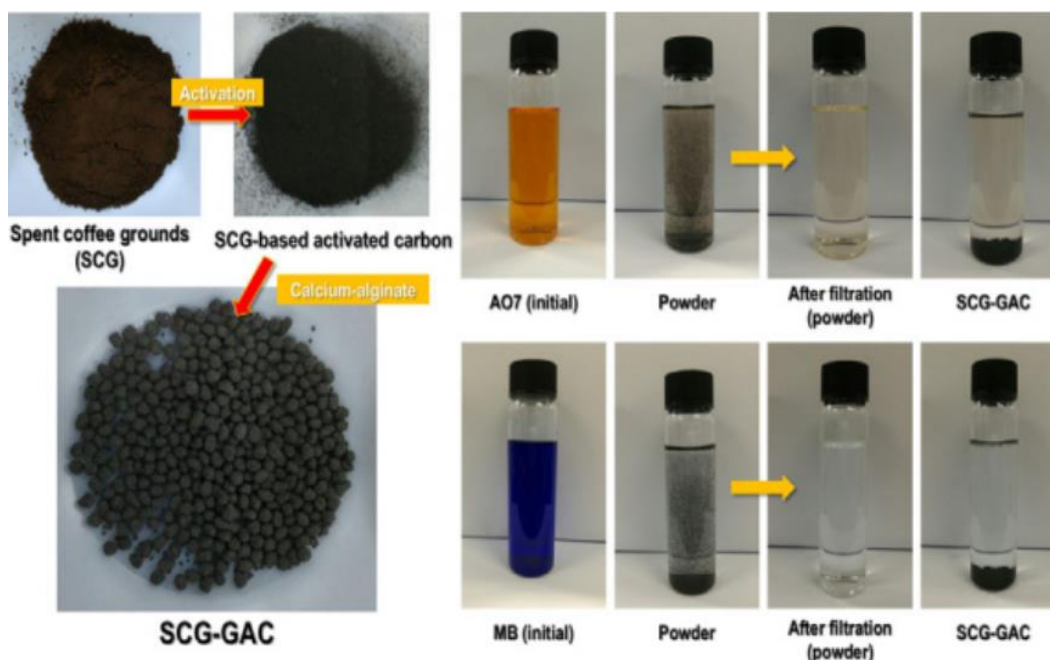
Ακόμη, έρευνες έχουν δείξει πως οι εξαντλημένοι κόκκοι καφέ, SCG, μπορούν να χρησιμοποιηθούν κατά την επεξεργασία μολυσμένων υδάτων, απομακρύνοντας τα ιόντα Υδραργύρου Hg^{2+} . Τα ιόντα Υδραργύρου (Hg^{2+} και Hg_2^+) καθώς και ο διμεθυλυδράργυρος (DMHg) αποτελούν βλαβερές ουσίες, που όταν έρθουν σε επαφή με τον άνθρωπο μπορούν να μεταβάλλουν τις λειτουργίες του κεντρικού νευρικού συστήματος (ΚΝΣ) ακόμη και σε πολύ χαμηλά επίπεδα έκθεσης, προκαλώντας νευροφυσιολογικά επακόλουθα. Οι SCG, αν και για την διαδικασία μπορούν να χρησιμοποιηθούν μόνο μια φορά, μπορούν να δράσουν ως βιοπροσοφητικό υλικό, αφαιρώντας ένα μεγάλο ποσοστό Hg^{2+} . Η μέγιστη προσοφητική ικανότητα των ιόντων φτάνει τα 31.75mg για κάθε 1g SCG [34].

Προκειμένου να βελτιωθεί η ικανότητα προσρόφησης των υπολειμμάτων SCG, κάποιои ερευνητές [35] [36] [37] ασχολήθηκαν με την ανθρακοποίηση (εκτενής πυρόλυση) της ύλης SCG και στην συνέχεια έκαναν χρήση του προϊόντος (SCG εξανθράκωμα) για την αφαίρεση ρυπαντών από υδατικά λύματα. Με την εξανθράκωση των SCG, φαίνεται να αυξάνεται η ειδική επιφάνεια και ο όγκος των πόρων της ύλης, όμως αυτό αποδείχθηκε πως εξακολουθεί να οδηγεί σε χαμηλές προσοφητικές ικανότητες. Αυτή η συμπεριφορά ίσως οφείλεται στο γεγονός πως κατά την διάρκεια την ανθρακοποίησης, αφαιρούνται κάποιες επιφανειακές ομάδες που θα μπορούσαν να επιδράσουν θετικά στην αλληλεπίδραση μεταξύ των οργανικών ρυπαντών και της προσοφητικής επιφάνειας της ύλης. Το πρόβλημα αυτό φαίνεται να αντιμετωπίζεται με την προσθήκη ενός επιπλέον σταδίου ενεργοποίησης της ύλης(μετατροπή σε ενεργό άνθρακα, activated carbon – AC) μετά την διεργασία εξανθράκωσης, προκειμένου να βελτιωθεί η υφή και η χημεία της επιφάνειας της προσοφητικής ύλης [21, p. 256]. Η παραγωγή AC βασίζεται σε χημικές μεθόδους ενεργοποίησης όπου γίνεται χρήση κυρίως υδροξειδίου του καλίου, χλωριούχου ψευδαργύρου και φωσφορικού οξέος ως παράγοντες ενεργοποίησης. Η ενεργό άνθρακες που παράγονται από τα υπολείμματα SCG μπορούν στην συνέχεια να χρησιμοποιηθούν για την προσρόφηση διάφορων μετάλλων όπως τα ιόντα μόλυβδου. Συγκεκριμένα, έρευνες [38] ασχολούνται με την προσρόφηση ιόντων μόλυβδου από SCG που έχει ενεργοποιηθεί με την βοήθεια χλωριούχου ψευδάργυρου $ZnCl_2$. Τα πειράματα διεξήχθησαν εντός αντιδραστήρα τύπου Batch όπου η συγκέντρωση των ιόντων ήταν 10-90 mg/L με απόδοση προσρόφησης που έφτασε το 70%.

Η χρήση των παραγόμενων ACs ενδείκνυται και για την αφαίρεση χρωστικών ουσιών. Οι χρωστικές ουσίες προέρχονται από διάφορες βιομηχανίες, κυρίως υφασματοβιομηχανίες, και αποτελούν τεράστιο πρόβλημα για ολόκληρο το οικοσύστημα καθώς είναι πολύ σταθερές και δεν βιοαποικοδομούνται. Δύο χρωστικές ουσίες που μελετήθηκαν σε βάθος [39] αποτελούν το όξινο πορτοκαλί (acid orange 7) και το κυανό του μεθυλενίου (methylene blue). Στην έρευνα, αποδείχθηκε πως

2.1 Θεωρητικό Μέρος: Ο καφές

παγιδεύοντας ενεργό άνθρακα, παραγόμενο από SCG, σε σφαιρίδια αλγινικού ασβεστίου (calcium-alginate beads), έχει ως αποτέλεσμα την δημιουργία ενός προσροφητικού ικανού να απορροφήσει τις χρωστικές ουσίες AO7 και MB με μέγιστες αποδόσεις 665.9 mg/g και 986.8 mg/g αντίστοιχα. Αποτελέσματα της προσροφητικής ικανότητας του υλικού SCG-GAC φαίνονται στην Εικόνα 1.



Εικόνα 1: Διεργασία προσρόφησης των χρωστικών AO7 και MB από SCG-GAC [39]

Ο ενεργός άνθρακας AC που παράγεται από την εξανθράκωση και την χημική ενεργοποίηση ύλης SCG με χρήση φωσφορικού οξέος H_3PO_4 ή όξινου φωσφορικού νατρίου Na_2HPO_4 μπορεί να χρησιμοποιηθεί για την αφαίρεση φαινόλης εντός διαλυμάτων. Η φαινόλη είναι μια ουσία που έχει εφαρμογή σε διάφορες βιομηχανίες, όπως στην παραγωγή ρητίνης και αποτελεί μια κοινή μολυσματική, καρκινογόνα, ουσία του νερού. Η συγκέντρωσή της στα υδατικά λύματα περιορίζεται από διάφορες χώρες ($<1\text{mg/L}$ στις ΗΠΑ). Η ικανότητα προσρόφησης του AC σε αυτή την περίπτωση φτάνει τα 55.5mg/g με χρήση H_3PO_4 και 105mg/g με χρήση Na_2HPO_4 [21, pp. 272-273].

2.1.3.3.5 Παραγωγή βιο-ενέργειας από SCG

Η χρήση βιομάζας ως πρώτη ύλη για την παραγωγή ενέργειας και ατμού είναι μια εναλλακτική των ορυκτών καυσίμων και έχει ήδη επιτυχία στην βιομηχανία του καφέ. Περίπου 2.4 kg (ξηρής βάσης) υπολειμμάτων SCG μπορούν να παράγουν την ίδια ποσότητα ατμού που παράγει 1 λίτρο πετρελαίου

θέρμανσης [2, p. 82]. Επίσης, οι SCG μπορούν να μετατραπούν σε βιοεξανθράκωμα (biochar), ένα υδρόφοβο στερεό προϊόν με αυξημένη ενεργειακή πυκνότητα, βελτιώνοντας έτσι το θερμοχημικό περιεχόμενο τους. Ο ξυλάνθρακας παράγεται μέσω της διαδικασίας της πυρόλυσης, δηλαδή θερμαίνοντας σε μια κατάλληλη θερμοκρασία (400-800 °C) την ύλη, με απουσία ατμόσφαιρας ή οξυγόνου, για ορισμένη χρονική διάρκεια που οδηγεί στην αποσύνθεση όλων των οργανικών συστατικών. Ανάλογα το ρυθμό θέρμανσης και την θερμοκρασία, η πυρόλυση την οποία μπορούν τα υποστούν τα υπολείμματα SCG, μπορεί να χωριστεί σε 3 κατηγορίες: φρύξη (torrefaction), αργή πυρόλυση, γρήγορη πυρόλυση. Η φρύξη βιομάζας, που αποτελεί μια ήπια μορφή πυρόλυσης, έχει αποδειχθεί ως η καλύτερη μέθοδος παραγωγής ενός στερεού ανθρακικού, υδροφοβικού υπολείμματος με υψηλή θερμική απόδοση [21, p. 314]. Έρευνες δείχνουν πως μέσω αυτής τις διεργασίας μπορεί να προκύψει ένας είδος SCG βιο-κάρβουνου με υψηλότερη θερμογόνο δύναμη (30.4-31.9 MJ/kg) συγκριτικά με το ορυκτό κάρβουνο (28-32 MJ/kg), ενώ η βέλτιστη θερμοκρασία φρύξης της βιομάζας βρίσκεται περίπου στους 400 °C [40]. Σε σύγκριση με την HHV των SCG, όπως φαίνεται στον Πίνακα 2, προκύπτει μια βελτίωση της τάξης του 35%.

Εναλλακτικά, οι SCG μπορούν να κοκκοποιηθούν σε μορφή pellet και να οδηγηθούν σε εμπορικούς και οικιακούς λέβητες για καύση. Η καύση των SCG σε λέβητες έχει αποδειχθεί πολύ αποδοτική αλλά με πολύ μικρότερη ανάκτηση ενέργειας συγκριτικά με την χρήση πριονιδιών [2, p. 83]. Σύμφωνα με έρευνες [41], SCG pellet μπορούν να παραχθούν στους 70 °C με μια συσκευή με όνομα Kahl 14/175 pelletizer και σε συχνότητα 50Hz, χρησιμοποιώντας SCG μεγέθους 0.6mm, αποδίδοντας pellet με ιδιότητες που βρίσκονται στον Πίνακα 4.

Πίνακας 4: Μηχανικά και φυσικά χαρακτηριστικά των SCG pellet [41]

Δείγμα	Μήκος (mm)	Διάμετρος (mm)	Υγρασία (%)	Φαινόμενη Πυκνότητα (kg/m ³)	LHV (MJ/kg)
SCG pellet	15-25	6	11.8	1211	17,520

Οι εξαντλημένοι κόκκοι καφέ έχουν επίσης χρησιμοποιηθεί στα δυτικά της Γαλλίας για την παραγωγή συμπιεσμένων κορμοτεμαχίων (compressed fuel logs) από το 2012. Η εταιρία RID Solution χρησιμοποιεί μια συσκευή για την παραγωγή των κορμοτεμαχίων η οποία παράγει προϊόντα μήκους 300mm και διαμέτρου 90mm. Λειτουργεί σε θερμοκρασία 120 °C και πίεση 2 tons/cm² και παράγει 1.5 τόνους κορμοτεμαχίων την ώρα. Τα κορμοτεμάχια περιέχουν 20% κατά βάρος SCG, τα οποία SCG έχουν προηγουμένως υποστεί ξήρανση (λόγω της υψηλής υγρασίας που τα χαρακτηρίζει). Το σύστημα

ξηρανσης λειτουργεί με θερμοκρασία εισόδου 400 °C και θερμοκρασία εξόδου 70°C, ενώ έχει απόδοση που μειώνει την υγρασία των SCG σε ποσοστό κάτω των 10% [21, pp. 326-327].

Τέλος, οι SCG μετά την εκχύλιση των ελαίων (Defatted Spent Coffee Ground, DSCG) μπορούν να χρησιμοποιηθούν άμεσα ως καύσιμη ύλη καθώς η ανώτερη θερμογόνο δύναμη βρίσκεται ακόμη κοντά στο 20 MJ/kg (που βρίσκεται πολύ κοντά στα 22MJ/kg του ξύλου και στα 18MJ/kg του ζαχαροκάλαμου [2, p. 82]), αντικαθιστώντας τα συμβατικά ορυκτά καύσιμα, ή μπορούν να αναβαθμιστούν σε βιο-έλαιο, (μαύρος πολτός αποτελούμενος από υδρογονάνθρακες και νερό, bio-oil), με ανώτερη θερμογόνο δύναμη HHV≈27 MJ/kg [9, p. 157].

2.1.3.3.6 Εφαρμογές στην γεωργία

Μια πολύ ενδιαφέρουσα εφαρμογή των υπολειμμάτων καφέ SCG που έχει μελετηθεί ευρέως αφορά την μετατροπή τους σε λίπασμα για άμεση χρήση σε στην γεωργία. Μελέτες που έχουν διεξαχθεί σε αγροτικές καλλιέργειες αναφέρουν πως με την άμεση προσθήκη SCG στο χώμα, αυξάνονται τα επίπεδα χλωροφύλλης και καροτενοειδών, παράγοντας σημαντικές ποσότητες ασκορβικού οξέος και τοκοφερόλων. Οι SCG μπορούν να χρησιμοποιηθούν ως λίπασμα λόγω του περιεχομένου τους σε άζωτο, με αναλογία C:N περίπου 20, ποσοστό πολύ κοντινό με την κοπριά. Η χρήση 5-30% SCG για την καλλιέργεια μαρουλιών είχε αποτέλεσμα υγιή φυτά με ενισχυμένα φωτοσυνθετικά χρώμα (έντονο πράσινο χρώμα), βιταμίνες, μέταλλα και αντιοξειδωτικά [2, p. 85]. Βέβαια, το αποτέλεσμα αυτό επηρεάζεται αρκετά από την φυσική κατάσταση των υπολειμμάτων SCG. Η χρήση SCG που έχουν προηγουμένως κομποστοποιηθεί προτιμάται από φρέσκα παραγόμενα SCG, καθώς οι συγκεντρώσεις των πολυφαινόλων και της καφεΐνης έχουν σημαντικά μειωθεί. Επιπλέον, έρευνες έχουν δείξει πως η πυρόλυση των SCG πριν την χρήση τους ως λιπάσματα, αυξάνει την περιεκτικότητα της ύλης σε χρήσιμα θρεπτικά στοιχεία, τα οποία οδηγούν σε μεγαλύτερη παραγωγικότητα του εδάφους [42]. Οι μετρήσεις φαίνονται στον Πίνακα 5. Αντίθετα, μια διετή έρευνα [43] που εξέτασε την επίδραση των SCG (με εφαρμογή 10kg/m²) σε πράσινες καλλιέργειες έδειξε πως τα SCG προκάλεσαν σημαντική αναστολή της ανάπτυξης των φυτών την 1^η χρονιά και λιγότερο σημαντική την 2^η. Αυτό οφείλεται, σύμφωνα με την έρευνα, στην ύπαρξη καφεΐνης και πολυφαινόλων και στις ταννίνες που εμπεριέχονται στα υπολείμματα SCG.

Πίνακας 5: Ανόργανο περιεχόμενο σε δείγμα υπολειμμάτων SCG και στο παραγόμενο, από αυτά, βιοεξανθράκωμα

[42]

Δείγμα	Κύρια Ανόργανα στοιχεία (wt.%)			
	P	K	Ca	Mg
SCG	0.18	0.81	0.20	0.20
Βιοεξανθράκωμα από SCG	0.48	1.94	0.56	0.60

Το πρωτεϊνικό περιεχόμενο των SCG επιτρέπει την εφαρμογή τους ως συστατικό ζωικής τροφής. Μελέτες αναφέρουν πως ποσότητα SCG μπορεί να προστεθεί σε ζωικές τροφές αναλόγως τα ζωικά είδη: μηρυκαστικά (10-30%), χοίροι (10-24%), ψάρια (13-30%) και κοτόπουλα (2.5-5%). Οι συγκεκριμένες αναλογίες έχουν βασιστεί στην επίδραση που μπορεί να έχουν οι SCG στην φυσιολογία και την υγεία των ζώων. Μεγαλύτερες αναλογίες SCG στις ζωικές τροφές μπορεί να επιδράσουν αρνητικά στην ανάπτυξη και την υγεία των ζώων λόγω της ύπαρξης μη θρεπτικών ενώσεων όπως η καφεΐνη και οι φαινολικές ουσίες όπως το χλωρογενικό οξύ, το καφεϊκό οξύ και οι ταννίνες. Οι ουσίες αυτές χαρακτηρίζονται ως μη θρεπτικοί παράγοντες και μπορούν να περιορίσουν την διαθεσιμότητα σε πρωτεΐνη μεταβάλλοντας τα πεπτικά ένζυμα και τους μικροοργανισμούς στο έντερο. Η ύπαρξη καφεΐνης επιδρά αρνητικά στην επιτυχία των SCG να μπορούν να χρησιμοποιηθούν στην γεωργία και για αυτό το λόγο ενδείκνυται η χρήση SCG από καφέ που έχει υποστεί αποκαφεΐνοποίηση (decaffeine) [2, p. 86].

2.2 Το κριθάρι

2.2.1 Γενικά

Το κριθάρι είναι ένα δημητριακό που ανήκει στην οικογένεια των Ποσειδών (*Poaceae*). Υπάρχουν 3 γένη κριθαριού: 1) *Hordeum vulgare*, το οποίο είναι εξάστοιχο 2) *Hordeum distichum*, το οποίο είναι δύστοιχο και 3) *Hordeum irregulare*, το οποίο καλλιεργείται πολύ λιγότερο από τα άλλα. Ανάλογα με το πόσες σειρές σπόρων έχει στην κεφαλή το κριθάρι, ταξινομείται σε δύστοιχο, τετράστοιχο και εξάστοιχο. Το εξάστοιχο κριθάρι παράγει περίπου 25-60 σπόρους, ενώ το δύστοιχο κριθάρι παράγει 25-30 σπόρους και για αυτό το λόγο, το είδος *Hordeum vulgare* καλλιεργείται πιο πολύ. Το τετράστοιχο κριθάρι ουσιαστικά είναι ένα χαλαρό εξάστοιχο. Το κριθάρι (*Hordeum vulgare*) είναι ένας πολύ σημαντικός σπόρος, και το πιο διαδεδομένο γένος κριθαριού στον κόσμο εδώ και πολλά χρόνια. Είναι ένα είδος δημητριακού, ιδιαίτερα ευπροσάρμοστο και η παραγωγή του εντοπίζεται κυρίως σε περιοχές με Μεσογειακό κλίμα καθώς και σε περιοχές με Ωκεάνιο και Ηπειρωτικό κλίμα. Το κριθάρι, επιπλέον, έχει ιδιαίτερη αντοχή σε ξηρή ατμόσφαιρα και αυτό του δίνει την δυνατότητα να μπορεί να ανθίσει και σε περιοχές κοντά σε ερήμους όπως της Βόρειας Αφρικής [44].

Σύμφωνα με στατιστικές μελέτες της Ευρωπαϊκής Επιτροπής [45], την τελευταία 5ετία, το κριθάρι έρχεται 3^ο στην κατάταξη (πίσω από το μαλακό σιτάρι και το καλαμπόκι) στην παραγωγή δημητριακών στην Ευρώπη με συνολική μέση παραγωγή 59.838 χιλιάδες τόνους ετησίως, ενώ το 2018 υπολογίζεται ότι η παραγωγή στην Ευρώπη άγγιξε τους 56.483 χιλιάδες τόνους κριθαριού. Ειδικότερα στην Ελλάδα, υπολογίζεται πως η παραγωγή του κριθαριού ανέρχεται στους 361 χιλιάδες τόνους ετησίως.

Το κριθάρι χρησιμοποιείται για ζωοτροφές, ανθρώπινα τρόφιμα και παραγωγή βύνης. Κάθε μία από αυτές τις χρήσεις απαιτεί και την κατάλληλη ποικιλία κριθαριού. Περίπου τα 3/4 της παραγωγής κριθαριού χρησιμοποιούνται για τρόφιμα και βύνη και το υπόλοιπο ως ζωοτροφή. Το κριθάρι υψηλής ποιότητας περιέχει υψηλά επίπεδα φυτικών πρωτεϊνών και υψηλή φαινόμενη πυκνότητα και επομένως ενδείκνυται για τροφές, ενώ το κριθάρι με χαμηλά επίπεδα πρωτεϊνών και μικρή φαινόμενη πυκνότητα προορίζεται για διεργασίες παραγωγής βύνης. Βέβαια, υπάρχουν ποικιλίες κριθαριού που μπορούν να χρησιμοποιηθούν και για τις 2 διεργασίες. Το κριθάρι που προορίζεται για ανθρώπινη κατανάλωση χρησιμοποιείται στις σούπες, ως επεκτατικό συστατικό για τις φυτικές πρωτεΐνες και ενίοτε αλέθεται σε

αλεύρι. Το αλεύρι κριθαριού μπορεί να χρησιμοποιηθεί για βρεφικά τρόφιμα ή για την παρασκευή αραβικής πίτας και χυλού βρώμης γνωστού και ως πόριτζ [46].

2.2.2 Ιστορία και προέλευση του κριθαριού

Η προέλευση του κριθαριού είναι ιδιαίτερα αμφισβητήσιμη. Η Αίγυπτος και η Κίνα είναι πιθανότατα το κέντρο της προέλευσης του καλλιεργούμενου κριθαριού. Η καλλιέργεια του κριθαριού φαίνεται επίσης να ήταν εμφανής και σε άλλα μέρη του κόσμου αργότερα. Για παράδειγμα, το κριθάρι υπολογίζεται να καλλιεργείται στην Βορειοδυτική Ευρώπη περίπου το 3000 π.Χ. Δεδομένου ότι το κριθάρι είναι ένα προϊόν που καλλιεργείται από τα αρχαία χρόνια, δεν έχουν καταγραφεί αρχαία εμπορίου αυτού του δημητριακού και επομένως η πραγματική προέλευση του δεν μπορεί να βρεθεί επακριβώς. Ο πιο πιθανός πρόγονος του κριθαριού εντοπίζεται στην ποικιλία του δύστοιχου κριθαριού. Οι περισσότερες ενδείξεις υποδηλώνουν πως το είδος *Sprontaneum* αποτελεί τον πιο άμεσο πρόγονο και πως όλες οι υπόλοιπες ποικιλίες κριθαριού είναι αποτέλεσμα μεταλλάξεων και υβριδισμού του συγκεκριμένου είδους.

Η καλλιέργεια του κριθαριού πιθανότατα προήλθε από τις ορεινές περιοχές της Αιθιοπίας και της Νοτιοανατολικής Ασίας σε προϊστορικούς χρόνους. Πιστεύεται πως η καλλιέργεια του κριθαριού επεκτείνεται χρονολογικά μέχρι και το 5000 π.Χ. στην Αίγυπτο, το 3500 π.Χ. στην Μεσοποταμία, το 3000 π.Χ. στην Βορειοδυτική Ευρώπη και το 2000 π.Χ. στην Κίνα. Το κριθάρι αποτελούσε την κύρια καλλιέργεια για παραγωγή ψωμιού των Εβραίων, των Ελλήνων, των Ρωμαίων και του μεγαλύτερου μέρους της Ευρώπης μέχρι και τον 16^ο αιώνα [44].

Το κριθάρι, όπως και το σιτάρι, είχαν εφαρμογή κατά την πρώιμη Νεολιθική εποχή από τους Αιγύπτιους, για την καθημερινή παραγωγή βρώμης και ψωμιού. Στην Αιγυπτιακή λογοτεχνία, το κριθάρι αναφέρεται συνήθως ως κριθάρι «Άνω Αιγύπτου» και κριθάρι «κάτω Αιγύπτου» καθώς και λευκό και κόκκινο κριθάρι. Κατά τα αρχαία χρόνια στην Αίγυπτο, αναφέρεται πως παρασκευάζονταν ένα είδος μύρας με μικρό περιεχόμενο σε αλκοόλ με επεξεργασία του «κόκκινου κριθαριού του Νείλου». Το κριθάρι, αρχικά, σχετιζόταν με Αιγυπτιακές θρησκευτικές τελετές καθώς και εορταστικές εκδηλώσεις, ενώ πολλές φορές χρησιμοποιούνταν σε κηδείες ή σαν θυσία προς τους θεούς. Εκτός από την χρήση του ως τροφή, το κριθάρι έβρισκε εφαρμογές στην ζυθοποιία, σαν μέσο συναλλαγών ή ακόμη και σε θεραπευτικά προϊόντα. Το αλεσμένο κριθάρι, συνήθως σε ανάμειξη με λάδι, έβρισκε εφαρμογή: στις πληγές με σκοπό τη μείωση του χρόνου επούλωσης, στην αντιμετώπιση κρυώματος και φλεγμάτων

καθώς και σε οφθαλμικές παθήσεις. Επιπλέον, το κριθάρι δρούσε ως διαγνωστικός παράγοντας με τον οποίο οι αρχαίοι Αιγύπτιοι προέβλεπαν το γένος του μωρού σε εγκυμονούσες γυναίκες [47].

Με την εξέλιξη των πολιτισμών και τη γεωργική καλλιέργεια ως κύριο μέσο συναλλαγών, η χρήση και η καλλιέργεια του κριθαριού εξαπλώθηκε στην Ευρωπαϊκή ήπειρο. Το κριθάρι αποτελούσε ένα κοινό συστατικό για την παραγωγή ψωμιού και βρώμης των αρχαίων Ελλήνων. Λέγεται πως ο Πλίνιος ο Πρεσβύτερος, μετά από επίσκεψη του στην Αίγυπτο, γνώρισε τις φαρμακευτικές ιδιότητες του κριθαριού και μετέφερε τις γνώσεις του πίσω στην αρχαία Ελλάδα. Ο Πλίνιος ανέφερε συγκεκριμένα πως η κατανάλωση κριθαριού μπορεί να θεραπεύσει τα έλκη του στομάχου, ενώ δημιούργησε μια συνταγή φαγητού με βασικό συστατικό το κριθάρι που έγινε ιδιαίτερα διαδεδομένη εκείνη την εποχή [48]. Αντίθετα, στην αρχαία Ρώμη, το ψωμί φτιαγμένο από σιτάρι θεωρούνταν πιο θρεπτικό, πιο εύπεπτο και γενικά πολύ ανώτερο από το ψωμί κριθαριού. Για αυτό το λόγο, το ψωμί κριθαριού καταναλώνονταν κυρίως μόνο από σκλάβους και από φτωχούς. Μετά την πτώση της Ρωμαϊκής αυτοκρατορίας, το ψωμί κριθαριού θεωρούνταν κατώτερο από τα ψωμιά σικάλεως και σίτου. Το κριθάρι αποτελούσε γενική τροφή των Ρωμαίων μονομάχων η οποίοι αποκαλούνταν και “*hordearii*” ή αλλιώς οι άνδρες κριθαριού, καθώς πίστευαν ότι το κριθάρι τους έδινε πολύ περισσότερη δύναμη και αντοχή από άλλες τροφές [48].

2.2.3 Διαδικασία παραγωγής μύρας

Το κριθάρι είναι το βασικό δημητριακό που χρησιμοποιείται κατά την παραγωγή βύνης σε όλο τον κόσμο. Δύο κύρια είδη κριθαριού χρησιμοποιούνται για τη διαδικασία της βυνοποίησης, το εξάστοιχο και το δύστοιχο κριθάρι. Το δύστοιχο κριθάρι παράγει βύνη υψηλής εκχύλισης, με φωτεινό χρώμα και λιγότερη περιεκτικότητα σε ένζυμα από ότι το εξάστοιχο [49]. Η παραγωγική διαδικασία για τη δημιουργία της μύρας ακολουθεί κάποια βασικά στάδια ανεξάρτητα από τη χώρα καταγωγής της, τον ειδικό τύπο της και το εκάστοτε ζυθοποιείο. Τα κύρια αυτά βήματα είναι: η βυνοποίηση, η ζυθοποίηση καθώς και η διαύγαση.

2.2.3.1 Βυνοποίηση

Αρχικά, το κριθάρι συλλέγεται, καθαρίζεται από σκόνες και ξένους μικροοργανισμούς και έπειτα διαβαθμίζεται σύμφωνα με το μέγεθος των κόκκων ώστε να καταλήξει σε επεξεργάσιμη πλέον μορφή για την διαδικασία της βυνοποίησης. Βαριές και μεσαίες ποιότητες, διατηρούνται σε κόσκινα με

ανοίγματα 2,5, 2,4, 2,2 και 2,0mm, βύνης ξεχωριστά. Η διαδικασία της βυνοποίησης πραγματοποιείται σε 3 στάδια: 1) διαβροχή, 2) εκβλάστηση και 3) ξήρανση.

Η μεταμόρφωση των σπόρων κριθαριού σε βύνη ξεκινά με την διαβροχή τους. Η διαβροχή περιλαμβάνει την τοποθέτηση σπόρων κριθαριού σε μεγάλες κυλινδρικές δεξαμενές γεμισμένες με νερό, για 2-3 ημέρες, και σε θερμοκρασία 5-18 °C έτσι ώστε να αυξηθεί το ενζυμικό περιεχόμενο των σπόρων. Το νερό εισέρχεται στο έμβρυο μέσω μικροβλαστών με αποτέλεσμα η υγρασία των σπόρων να αυξάνεται έως και 42-48%. Το νερό διαβροχής αλλάζει κάθε 6 με 8 ώρες αλλά δεν ανακυκλώνεται. Η ενυδάτωση του εσωτερικού των σπόρων προκαλεί την έναρξη της βλάστησης και οδηγεί στην ενεργοποίηση του μεταβολισμού του πρωτεϊνόκοκκου (Εικόνα 2) [50].

Στην συνέχεια, συλλέγονται οι σπόροι που έχουν καταβυθιστεί, για να προωθηθούν στη διεργασία της εκβλάστησης, όπου σε ελεγχόμενες συνθήκες θερμοκρασίας και υγρασίας, αναπτύσσεται η πράσινη βύνη με διπλάσιο μήκος του αρχικού σπόρου. Κατά την εκβλάστηση παράγονται ένζυμα που προκαλούν τη διάσπαση του αμύλου (α-αμυλάση και β-αμυλάση) καθώς επίσης και πρωτεάσες και κυτάσες. Οι αμυλάσες διασπούν μέρος του αμύλου του κριθαριού, οι πρωτεάσες διασπούν μέρος των πρωτεϊνών σε αμινοξέα και οι κυτάσες μαλακώνουν το κυτταρικό τοίχωμα. Η συνηθέστερη θερμοκρασία βλάστησης είναι 15-18 °C, ενώ η συνολική διαδικασία απαιτεί 7 με 10 ημέρες για να ολοκληρωθεί.

Επόμενο στάδιο αποτελεί η ξήρανση της πράσινης βύνης ή αλλιώς και φρύξη. Το στάδιο αυτό αφορά στην διοχέτευση θερμού αέρα θερμοκρασίας 85-105 °C ώστε να ελαττωθεί η υγρασία (από περίπου 45% σε 2-3%), μετατρέποντας την πράσινη σε ξηρή βύνη. Πολλές φορές οι βύνες υφίστανται μια επιπλέον κατεργασία καβουρντίσματος και με αυτό τον τρόπο παραλαμβάνονται οι καστανές και σκούρες βύνες για την παραγωγή αντίστοιχων μπυρών. Μάλιστα όσο πιο έντονο είναι αυτό το καβούρντισμα τόσο πιο βαθιά και σκούρα είναι τα χρώματα της παραγόμενης μπύρας.

Μετά το στάδιο της φρύξης με ή χωρίς επιπλέον επεξεργασία έρχεται η στίλβωση της βύνης, που δεν είναι τίποτα άλλο από μια φάση καθαρισμού, και η αποθήκευση της για να μπορέσει να γίνει η άλεση και στη συνέχεια ο βρασμός της θρυμματισμένης βύνης με κατεργασμένο νερό [51] [52].

2.2.3.2 Ζυθοποίηση

Η διαδικασία της ζυθοποίησης ξεκινά με την άλεση της βύνης κριθαριού, που προέκυψε από το προηγούμενο στάδιο, και την ανάμειξή του με νερό εντός της δεξαμενής ζυθεκχύλισης. Η θερμοκρασία του νερού ξεκινά να αυξάνεται με αργό ρυθμό (από 37 έως 78 °C) ώστε να προωθήσει την ενζυμική

υδρόλυση των συστατικών της βύνης, κυρίως του αμύλου, αλλά και άλλων συστατικών όπως είναι οι πρωτεΐνες, οι (1-3, 1-4)-β-γλυκάνες και οι αραβινοξυλάνες, καθώς και για να διαλυτοποιήσει τα προϊόντα διάσπασης. Κατά τη διαδικασία αυτή, το άμυλο μετατρέπεται σε ζυμώσιμα σάκχαρα (κυρίως μαλτόζη και μαλτοτριόζη) και μη ζυμώσιμα σάκχαρα (δεξτρίνες), ενώ οι πρωτεΐνες αποικοδομούνται μερικώς σε πολυπεπίδια και αμινοξέα. Αυτή η ενζυμική μετατροπή (ζυθεκχύλιση) παράγει ένα γλυκό υγρό, γνωστό ως ζυθογλεύκος (μούστος). Το αδιάλυτο, μη αποικοδομήσιμο μέρος της βύνης κριθαριού αφήνεται ελεύθερο, σχηματίζοντας ένα είδος φίλτρου μέσα από το οποίο διηθείται το ζυθογλεύκος και το διήθημα χρησιμοποιείται ως μέσο για την παραγωγή της μπίρας [50].

Το παραπάνω ζυθογλεύκος μεταφέρεται στις δεξαμενές ζύμωσης όπου προστίθεται η μαγιά για να ξεκινήσει η ζύμωση. Ανεξάρτητα από το είδος μαγιάς που επιλέγεται, η δράση της είναι να μετατρέπει τα σάκχαρα σε αλκοόλη και διοξείδιο του άνθρακα με αποτέλεσμα την τελική παραλαβή της μπίρας. Οι δεξαμενές που χρησιμοποιούνται σήμερα είναι κυρίως ανοξείδωτες με κωνικό πάτο και κυλινδρική κορυφή. Ο κωνικός πάτος που έχει άνοιγμα περίπου 60 μοιρών επιτρέπει την συλλογή των στερεών υπολειμμάτων και της ζύμης (στην περίπτωση των βυθοζυμών) στην κορυφή του και από εκεί την εύκολη απομάκρυνσή τους. Σε γενικές γραμμές η ζύμωση με τη βοήθεια βυθοζυμών κρατάει 8-12 ημέρες, ενώ στη περίπτωση που συμμετέχουν αφροζύμες οι μέρες μειώνονται σε 2-5. Μετά το τέλος της ζυθοποίησης, λαμβάνει χώρα η περίοδος ωρίμανσης που γίνεται μέσα στις δεξαμενές σε χαμηλές θερμοκρασίες περίπου 0 – 2 βαθμούς Κελσίου για 4-8 εβδομάδες (ανάλογα με τον τύπο της μπίρας, ξανθιά ή σκούρα, γενικά οι ξανθιές θέλουν λιγότερο χρόνο από τις σκουρόχρωμες). Την περίοδο αυτή οι μπίρες εξελίσσονται, μαλακώνουν και καθαρίζουν [52].

2.2.3.3 Διαύγαση

Μόλις περάσει ο χρόνος ωρίμανσης στις δεξαμενές, ακολουθεί η διαύγαση της μπίρας ή αλλιώς το φιλτράρισμα. Είναι πολύ σημαντικό στάδιο και χρειάζεται προσοχή, γιατί από τη μια, από αυτό εξαρτάται σε μεγάλο βαθμό η σταθεροποίηση και η όψη της μπίρας στο ποτήρι και από την άλλη θα πρέπει να έχει την σωστή ισορροπία για να μην χάνονται πολλά από τα οργανοληπτικά χαρακτηριστικά της μπίρας που την κάνουν να ξεχωρίζει. Υπάρχουν πολλά είδη φίλτρων όπως και τρόποι φιλτραρίσματος, τα πιο συνηθισμένα είναι η γη διατόμων ή συστήματα πλακών με συγκεκριμένους πόρους που απομακρύνουν τα ανεπιθύμητα σωματίδια. Τελευταία διαδικασία αποτελεί η εμφιάλωση και η αποθήκευση της μπίρας [52].

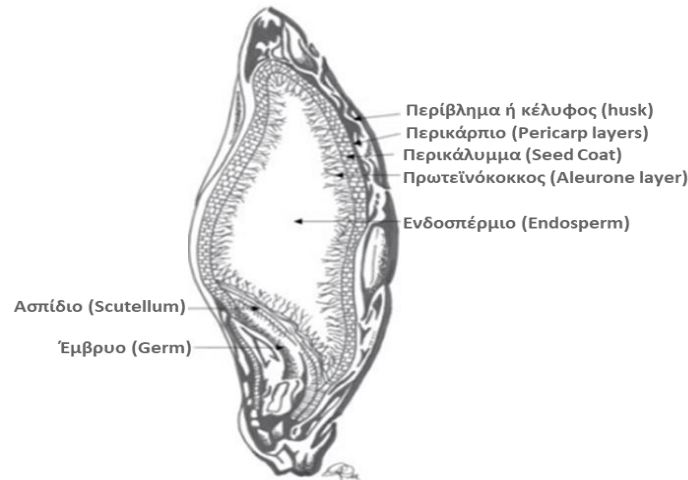
2.2.4 Εξαντλημένοι Σπόροι Κριθαριού

Οι εξαντλημένοι σπόροι κριθαριού (spent barley grains, ή brewers' spent grains, BSG) είναι ένα άφθονο υπόλειμμα που παράγεται κατά τη διαδικασία παραγωγής της μπίρας, και αποτελεί περίπου το 85% των συνολικών παραπροϊόντων που λαμβάνονται. Το υλικό αυτό ουσιαστικά αποτελεί την φλούδα του κριθαριού, η οποία αφαιρείται ως στερεό παραπροϊόν μετά την παραγωγή του ζυθογλεύκους. Οι BSG είναι πλούσιοι σε φυτικές ίνες και πρωτεΐνες και αυτό τους δίνει τη δυνατότητα να χρησιμοποιούνται, μέχρι σήμερα, ως ζωοτροφή. Για κάθε 100 λίτρα παραγόμενης μπίρας, παράγονται 20kg νωπών BSG τα οποία διατίθενται στην αγορά ως ζωοτροφή με αγοραία αξία περίπου 35€ ανά τόνο. Ωστόσο, λόγω του θρεπτικού περιεχομένου τους, οι BSG παρουσιάζουν ιδιαίτερο ενδιαφέρον για τη χρήση τους σε προϊόντα ανθρώπινης διατροφής, ιδίως λόγω του χαμηλού κόστους και της υψηλής διαθεσιμότητάς τους. Οι εξαντλημένοι σπόροι κριθαριού διερευνώνται τον τελευταίο καιρό με σκοπό την εύρεση εναλλακτικών τρόπων χρήσης τους, καθώς έτσι μπορούν να επωφεληθούν, τόσο οι ζυθοποιίες από την αξιοποίηση αυτού του παραπροϊόντος, αλλά και το περιβάλλον, καθώς η ανακύκλωση και η επαναχρησιμοποίηση βιομηχανικών αποβλήτων είναι ιδιαίτερα σημαντική [53].

2.2.4.1 Παραγωγή εξαντλημένων σπόρων κριθαριού

Οι κόκκοι κριθαριού μπορούν να διαιρεθούν σε 3 βασικά μέρη (Εικόνα 2): το φύτρο (ή αλλιώς έμβρυο), το ενδοσπέρμιο (το οποίο απαρτίζεται από τον πρωτεϊνόκοκκο και το αμυλώδες ενδοσπέρμιο) και τις στρώσεις κάλυψης του σπόρου. Τα καλύμματα του σπόρου μπορούν και αυτά να διαιρεθούν, από

έξω προς τα μέσα, στο περίβλημα (το οποίο βρίσκεται εξωτερικά του σπόρου), στο περικάρπιο και στο περικάλυμμα (το οποίο περιβάλλει τον πρωτεϊνόκοκκο) [53].



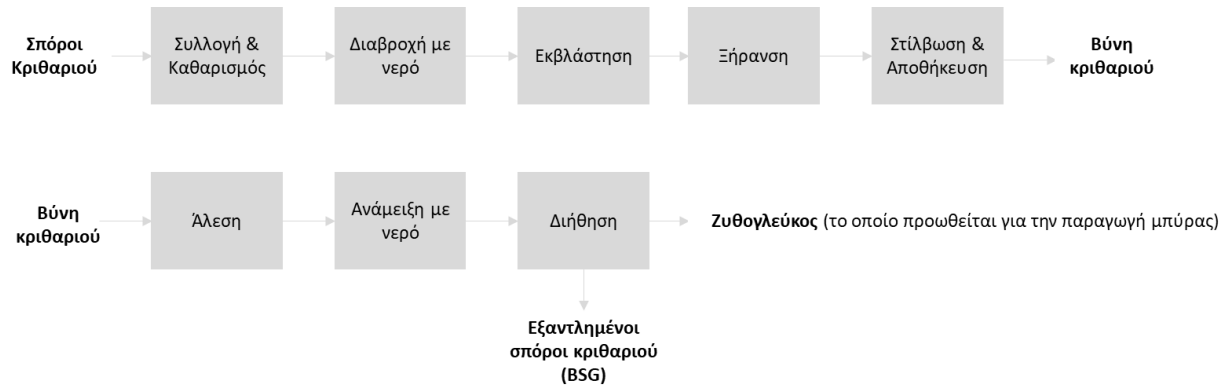
Εικόνα 2: Σχηματική τομή ενός σπόρου κριθαριού [53]

Επειδή το περικάρπιο είναι πολύ εύπλαστο και κάπως αδιάβροχο, και το περικάλυμμα λειτουργεί ως ημιπερατή μεμβράνη, η διεπιφάνεια μεταξύ περικαρπίου και περικαλύμματος διαχωρίζει πλήρως και αποτελεσματικά το εξωτερικό από το εσωτερικό του πυρήνα. Το περίβλημα είναι πολυστρωματικό και παρέχει εξωτερική προστασία στους σπόρους, ενώ αποτελείται κυρίως από λιγνοκυτταρινικά κυτταρικά τοιχώματα και μικρές ποσότητες πρωτεϊνών, ρητίνων και ταννίνων [50].

Κατά τη διάρκεια παραγωγής του ζύθου, το αμυλούχο ενδοσπέρμιο της βύνης κριθαριού υποβάλλεται σε ενζυμική αποικοδόμηση, η οποία οδηγεί σε απελευθέρωση ζυμώσιμων (όπως είναι η μαλτόζη και η μαλτοτριόζη) και μη ζυμώσιμων υδατανθράκων (δεξτρίνες), διαλυτών πρωτεϊνών, πολυπεπτιδίων και αμινοξέων. Αυτό που προκύπτει ονομάζεται βύνη, η οποία θα ζυμωθεί με τη βοήθεια ζύμης σε μύρα στην συνέχεια τα αδιάλυτα συστατικά των σπόρων κριθαριού (που περιλαμβάνουν κυρίως τα εξωτερικά καλύμματα των σπόρων) αποτελούν τους εξαντλημένους σπόρους κριθαριού BSG. Στο Σχήμα 4, φαίνονται περιληπτικά όλα τα στάδια και οι διεργασίες με τις οποίες παράγονται τελικά τα υπολείμματα των σπόρων κριθαριού BSG.

Στην παραδοσιακή ζυθοποιία, οι BSG παίζουν πολύ σημαντικό ρόλο καθώς σχηματίζουν ένα είδος φίλτρου μέσα από το οποίο θα περάσει ο πολτός για να διαχωριστεί ο μούστος. Επομένως, η αρχική άλεση της βύνης πρέπει να είναι τέτοια ώστε τα καλύμματα των σπόρων (τα BSG) να παραμένουν άθικτα ώστε να σχηματίζουν ένα κατάλληλο φίλτρο. Η μέθοδος αυτή χρησιμοποιείται ακόμη και σήμερα σε

κάποιες μικρές βιομηχανίες ζυθοποιίας, όμως στις περισσότερες, και ιδίως στις μεγάλες βιομηχανίες πλέον γίνεται χρήση ενός πιο εξειδικευμένου φίλτρου που δεν βασίζεται τόσο στην καλή κατάσταση των BSG, με αποτέλεσμα να δίνεται η δυνατότητα για αποτελεσματικότερη άλεση της βύνης [53].



Σχήμα 4: Σχηματική αναπαράσταση των σταδίων παραγωγής ζυθογλεύκους καθώς και του παραπροϊόντος, τους εξαντλημένους σπόρους κριθαριού (BSG).

2.2.4.2 Σύσταση εξαντλημένων σπόρων κριθαριού

Σύμφωνα με έρευνες [54], η διαδικασία της ζυθοποιίας είναι πολύ επιλεκτική και αφαιρεί από τη βύνη μόνο εκείνα τα θρεπτικά συστατικά που απαιτούνται για την παραγωγή του ζυθογλεύκους (μούστου). Κατάλοιπα αυτής της διαδικασίας παραμένουν κάποιες αδιάλυτες πρωτεΐνες και υπολείμματα κυτταρικού τοιχώματος (του κελύφους, του περικάρπιου και του περικαλύμματος), από κάθε χρησιμοποιούμενο σπόρο κριθαριού. Η διαδικασία της ζυθοποιίας, και επομένως και η επεξεργασία των σπόρων κριθαριού, μεταβάλλεται ανάλογα με το είδος της μπίρας που πρόκειται να παραχθεί. Έτσι, οι BSG μπορεί να αποτελούνται από τα υπολείμματα της βύνης κριθαριού, ή μπορεί να περιέχουν και υπολείμματα από διάφορα άλλα πρόσθετα όπως σιταριού, ρυζιού ή αραβοσίτου που προστέθηκαν κατά το στάδιο της ανάμειξης με νερό.

2.2.4.2.1 Χημική σύσταση των BSG

Η χημική σύσταση των εξαντλημένων σπόρων κριθαριού ποικίλει ανάλογα με την ποικιλία του κριθαριού (π.χ. αν είναι δύστοιχο ή εξάστοιχο), τον χρόνο συγκομιδής, τις συνθήκες βυνοποίησης και ζυθοποίησης καθώς επίσης και από την ύπαρξη ή όχι των διάφορων προσθέτων κατά την διαδικασία της ζυθοποιίας. Κατά βάση, το υπόλειμμα BSG θεωρείται μια λιγνοκυτταρινική ύλη η οποία είναι πλούσια

2.2 Θεωρητικό Μέρος: Το κριθάρι

σε πρωτεΐνες και φυτικές ίνες (ημικυτταρίνη και κυτταρίνη) και λιγνίνη. Η τυπική δομή των υπολειμμάτων BSG παρουσιάζεται στον Πίνακα 6, όπως έχει βρεθεί από διάφορες έρευνες.

Οι φυτικές ίνες, όπως φαίνεται στον Πίνακα 6, αποτελούν περίπου το 50% της σύνθεσης των BSG, ενώ μπορούν να φτάσουν και το 70% σε κάποιες περιπτώσεις. Τα υψηλά αυτά επίπεδα φυτικών ινών έχουν εξαιρετικά σημαντικές επιπτώσεις στην ανθρώπινη διατροφή λόγω της αίσθησης πλήρωσης που προκαλούν και της καθυστερημένης πέψης. Η ημικυτταρίνη αποτελείται, κατά κύριο λόγο, από αραβινοξυλάνη, η οποία αποτελεί το βασικό συστατικό των BSG και μπορεί να βρεθεί σε ποσοστό που φτάνει το 40% κατά βάρος σε ξηρή βάση. Η αραβινοξυλάνη, είναι ο κύριος μη κυτταρινικός πολυσακχαρίτης ο οποίος εντοπίζεται σε όλα τα δημητριακά και στα χόρτα [53].

Πίνακας 6: Χημική σύνθεση των εξαντλημένων σπόρων κριθαριού (BSG) σύμφωνα με διάφορες πηγές. [55] [56]

[57] [50] [58] [59] [60] [61] [62]

Χημική σύνθεση των BSG	Εύρος τιμών ^α	Μέση τιμή ^β
Κυτταρίνη	12-33	22.26
Ημικυτταρίνη	19.2-40	23.81
Πρωτεΐνες	14.2-31	21.53
Λιπίδια	3-13	8.78
Λιγνίνη	11.9-27.8	18.04
Πολυφαινόλες	0.7-2	1.48
Άμυλο	2-12	6.23
Τέφρα	1.1-4.6	2.97

^α Όλες οι τιμές είναι εκφρασμένες σε g ανά 100g ξηρής ύλης BSG (% w/w).

^β Η μέση τιμή είναι υπολογισμένη από το σύνολο των τιμών που βρίσκονται στις πηγές και όχι από το εύρος.

Ένα άλλο σημαντικό συστατικό των υπολειμμάτων BSG είναι η λιγνίνη, η οποία αντιπροσωπεύει περίπου το 12-28% του συνολικού ξηρού βάρους, σύμφωνα με τον Πίνακα 6. Η λιγνίνη είναι μια μεγαλομοριακή ένωση αρωματικού χαρακτήρα, σε αντίθεση με την κυτταρίνη που έχει ξεκάθαρα υδατανθρακικό χαρακτήρα. Η λιγνίνη έχει τρισδιάστατη μοριακή δομή και θεωρείται ως ένα πολύπλοκο βιοπολυμερές υλικό χωρίς τακτικά επαναλαμβανόμενες μονάδες, αλλά με έναν τύπο "δενδριτικού" χαρακτήρα. Οι κεντρικές δομικές μονάδες της λιγνίνης είναι τρεις παρόμοιες αρωματικές αλκοόλες παράγωγα του φαινυλοπροπανίου (φαινυλοπροπανοειδείς ενώσεις), γνωστές ως μονολιγνόλες. Οι

αλκοόλες αυτές διαφέρουν μεταξύ τους μόνο ως προς τον αριθμό των μεθοξυομάδων στο φαινύλιο. Οι τρεις αυτές μονολιγνόλες που σχηματίζουν μια λιγνίνη είναι η ρ-κουμαρυλική αλκοόλη, η κωνιφερυλική αλκοόλη και η σιναπυλική αλκοόλη [63]. Η λιγνίνη είναι πολύ σημαντική για τα φυτά, αφού είναι υπεύθυνη για την δομική ακαμψία και ακεραιότητα του κυτταρικού τοιχώματός τους [53].

Σύμφωνα με τον Πίνακα 6, η περιεκτικότητα του BSG σε πρωτεΐνες κυμαίνεται περίπου στο 14-31%, αλλά τυπικά υπάρχει σε ποσοστό περίπου 20% του συνολικού ξηρού βάρους. Τα κύρια είδη πρωτεϊνών, στα υπολείμματα BSG, είναι ορδεΐνες (hordeins), γλουτελίνες (glutelins), σφαιρίνες (globulins) και λευκωματίνες (albumins). Τα απαραίτητα αμινοξέα αντιπροσωπεύουν το 30% περίπου του συνολικού περιεχομένου σε πρωτεΐνες. Αξίζει να σημειωθεί πως, ενώ στα περισσότερα δημητριακά, η λυσίνη εμφανίζεται σε πολύ χαμηλά ποσοστά, στα υπολείμματα BSG, η λυσίνη κυριαρχεί με ποσοστό περίπου 14.3% του συνολικού περιεχόμενου σε αμινοξέα. Τυπικό περιεχόμενο των BSG σε αμινοξέα και μεταλλικά στοιχεία, σύμφωνα με έρευνες [61], φαίνεται αναλυτικότερα στον Πίνακα 7. Στην συγκεκριμένη έρευνα, τα δείγματα κριθαριού, βύνης και BSG που χρησιμοποιήθηκαν, βρέθηκε να περιέχουν πρωτεΐνη σε ποσοστά 9.65%, 8.52% και 22.13% κατά βάρος (w/w) της ύλης, αντίστοιχα. Ωστόσο, οι τιμές των αμινοξέων του Πίνακα 7 είναι κανονικοποιημένες για να μπορούν να αποδώσουν μια γενική εικόνα της περιεκτικότητας σε αμινοξέα.

Τα συνολικά μεταλλικά στοιχεία, όπως φαίνεται και στον Πίνακα 7, καταλαμβάνουν ένα ποσοστό περίπου 1.13% (w/w) στα υπολείμματα εξαντλημένων σπόρων κριθαριού, το οποίο υπερβαίνει τα επίπεδα των μεταλλικών στοιχείων τόσο στο κριθάρι (0.82% w/w) όσο και στην παραγόμενη βύνη κριθαριού (0.73% w/w). Οι BSG περιέχουν μέταλλα όπως το ασβέστιο, ο φώσφορος και το μαγνήσιο σε υψηλότερα επίπεδα σε σύγκριση με το κριθάρι και την βύνη κριθαριού, ενώ περιέχουν κάλιο σε πολύ χαμηλότερες αναλογίες.

Ένα ακόμη σημαντικό θρεπτικό συστατικό των BSG αποτελούν τα λιπίδια και τα λιπαρά οξέα. Η περιεκτικότητά τους, σύμφωνα με τον Πίνακα 6, βρίσκεται περίπου στο 8.8% (w/w), το οποίο μάλιστα υπερβαίνει κατά κύριο λόγο τα επίπεδα που υπάρχουν σε προϊόντα όπως το αλεύρι σίτου και το αλεύρι ολικής άλεσης, με τα απαραίτητα λιπαρά οξέα να αντιπροσωπεύουν πάνω από το 50% των συνολικών λιπιδίων. Γενικά, η σημασία των λιπιδίων στα ψωμιά με αλεύρι σίτου οφείλεται στην συμβολή που έχουν στον όγκο, την απαλότητα, την βελτιωμένη ψίχα και την συνολική ποιότητα. Επιπλέον, το λίπος είναι σημαντικό στην συμπεριφορά της ζύμης και συγκεκριμένα στην μηχανική ικανότητα, την ευκαμψία και το γενικό χειρισμό της ζύμης [61].

Τελευταία, σε περιεκτικότητα, συστατικά στους BSG έρχονται το άμυλο και οι πολυφαινόλες. Τα επίπεδα του άμυλου σε γενικές γραμμές είναι αμελητέα, συγκριτικά με το κριθάρι και την βύνη κριθαριού και αυτό συμβαίνει λόγω της εκτεταμένης αμυλόλυσης που υφίσταται η ύλη κατά τη διαδικασία της ζυθοποίησης [61]. Επιπλέον, οι πολυφαινόλες, όπως φαίνεται και στον Πίνακα 6, βρίσκονται σε ποσοστό 0.7-2% (w/w), ένα πολύτιμο ποσοστό καθώς αυτές είναι χρήσιμες για τις αντιοξειδωτικές τους ικανότητες. Συγκεκριμένα, έχει αναφερθεί ότι επιδρούν θετικά στην προστασία του DNA, ως ισχυρά αντιοξειδωτικά και αντικαρκινικά, προστατεύοντας τον οργανισμό από οξειδωτικές ενώσεις όπως το υπεροξείδιο του υδρογόνου (H_2O_2) και το tert-butylhydroperoxide (t-BOOH) [64].

2.2 Θεωρητικό Μέρος: Το κριθάρι

Πίνακας 7: Περιεχόμενο της συνολικής πρωτεΐνης σε αμινοξέα, καθώς και περιεχόμενο των BSG σε μεταλλικά στοιχεία [61]

Μη απαραίτητα αμινοξέα α	Κριθάρι	Βύνη	BSG	Μεταλλικά	Κριθάρι	Βύνη	BSG
				στοιχεία β			
Ιστιδίνη	16.46	22.33	26.27	Φώσφορος	0.24	0.27	0.46
Γλουταμινικό οξύ	8.80	8.81	16.59	Μαγνήσιο	0.08	0.09	0.24
Ασπαραγινικό οξύ	1.97	2.00	4.81	Ασβέστιο	0.06	0.05	0.22
Βαλίνη	2.38	2.82	4.61	Πυρίτιο	0.05	0.06	0.14
Αργινίνη	2.17	2.70	4.51	Κάλιο	0.39	0.26	0.07
Αλανίνη	2.28	2.70	4.12	Συνολικά	0.82	0.73	1.13
Σερίνη	1.24	0.82	3.77				
Τυροσίνη	1.45	1.65	2.57	Αλάτι β	0.01	0.02	0.71
Γλυκίνη	0.83	0.71	1.74				
Ασπαραγίνη	2.38	3.88	1.47				
Γλουταμίνη	MA	MA	0.07				
γ-Αμινοβουτυρικό οξύ	26.50	0.12	0.26				
Απαραίτητα αμινοξέα α	Κριθάρι	Βύνη	BSG				
Λυσίνη	26.09	43.36	14.31				
Λευκίνη	3.11	3.41	6.12				
Φαινυλαλανίνη	2.07	2.47	4.64				
Ισολευκίνη	1.76	2.00	3.31				
Θρεονίνη	0.10	0.24	0.71				
Τρυπτοφάνη	0.10	MA	0.14				
Μεθειονίνη	0.31	MA	MA				

^α Οι τιμές είναι εκφρασμένες σε ποσοστό επί % της συνολικής περιεκτικότητας σε πρωτεΐνη της κάθε ύλης.

^β Οι τιμές είναι εκφρασμένες σε ποσοστό κατά βάρος της κάθε ύλης (% w/w).

MA = Μη ανιχνεύσιμο ή μη μετρήσιμο, στην συγκεκριμένη έρευνα

2.2.4.2.2 Στοιχειακή σύνθεση των BSG

2.2 Θεωρητικό Μέρος: Το κριθάρι

Οι εξαντλημένοι σπόροι κριθαριού αποτελούν μια βιομάζα με καλές θερμικές ιδιότητες καθώς έχουν καλή αναλογία H:C, που βρίσκεται περίπου στο 0.14 και C:O κοντά στο 1.25 (Πίνακας 9). Οι ιδιότητες τους φαίνεται να είναι καλύτερες από διάφορες άλλες μορφές βιομάζας, όπως είναι τα υπολείμματα δασών, οι φλούδες καφέ, ο ευκάλυπτος, οι πυρήνες ροδάκινου και το φυτό μίσχανθος [65]. Οι BSG είναι μια αναξιοποίητη και πολλά υποσχόμενη πρώτη ύλη, η οποία είναι φθηνή και φιλική προς το περιβάλλον όσον αφορά την παραγωγή ανθρακούχων καύσιμων υλών με θερμοχημικές διεργασίες όπως η υδροθερμική εξανθράκωση (hydrothermal carbonization, HTC) ή η πυρόλυση [66]. Έχουν γίνει αρκετές μελέτες που αφορούν τον χαρακτηρισμό αυτής της ύλης. Τα αποτελέσματα της προσεγγιστικής ανάλυσης (proximate analysis), καθώς και της στοιχειακής ανάλυσης (ultimate analysis), όπως έχουν παρθεί από διάφορες πηγές, απεικονίζονται στους Πίνακες 8 και 9.

Πίνακας 8: Προσεγγιστική ανάλυση (proximate analysis) των υπολειμμάτων BSG [67] [65] [66] [53] *

Υγρασία	Τέφρα	Πτητικά	Μόνιμος Άνθρακας
70-81%	1.1%-4.6%	77.1%-79.2%	9.4%-18.9%

*Όλες οι τιμές είναι υπολογισμένες σε ξηρή βάση (dry basis), εκτός της υγρασίας.

Πίνακας 9: Στοιχειακή ανάλυση (ultimate analysis) των υπολειμμάτων BSG [67] [65] [66] *

C	H	N	S	O	HHV	LHV
48.3-53.5%	5.6-7.3%	4.4-5.5%	0.3-1.9%	34.0-38.7%	17.8-23.5 MJ/kg	16.5-20.0 MJ/kg

*Όλες οι τιμές είναι υπολογισμένες σε ξηρή βάση και χωρίς τέφρα (dry and ash-free basis).

Όπως φαίνεται στον Πίνακα 8, τα υπολείμματα BSG περιέχουν πολύ υψηλά ποσοστά υγρασίας μετά τον διαχωρισμό τους με το ζυθογλεύκος (μούστος), στη διαδικασία της ζυθοποιίας, οι οποίες κυμαίνονται στο 70-81% κατά βάρος της ύλης σε υγρή βάση. Συνήθως, πριν από οποιαδήποτε επεξεργασία, οι BSG υφίσταται ξήρανση με σκοπό να μειωθεί η υγρασία, φτάνοντας το 5-15% ανάλογα τη διεργασία της ξήρανσης [65] [66]. Επιπλέον, οι BSG μπορούν να θεωρηθούν μια ενδιαφέρουσα πρώτη ύλη για την παραγωγή ενέργειας μέσω καύσης, καθώς, όπως φαίνεται στον Πίνακα 9, η υψηλότερη θερμογόνος δύναμη HHV των BSG είναι αρκετά ικανοποιητική και φτάνει μέχρι και τα 23.5 MJ/kg.

2.2.4.3 Συντήρηση και αποθήκευση των BSG

Όπως φάνηκε παραπάνω, τα υπολείμματα BSG περιέχουν πολύ υψηλές ποσότητες υγρασίας, οι οποίες προκαλούν δυο προβλήματα που πρέπει να αντιμετωπισθούν, προκειμένου να αξιοποιηθεί η συγκεκριμένη βιομάζα.

Αρχικά, όπως και στα περισσότερα είδη βιομάζας, η μεταφορά τους μπορεί να είναι ιδιαίτερα δαπανηρή, και η περιεκτικότητα σε υγρασία επιβαρύνει το πρόβλημα, καθώς αυξάνεται το βάρος τους. Αυτό έχει ως αποτέλεσμα, η κύρια κατάληξή τους να σχετίζεται με την διάθεση αυτών στους τοπικούς αγρότες ως ζωοτροφή. Ωστόσο, συνήθως η προσφορά υπερτερεί της ζήτησης [68].

Το δεύτερο ζήτημα αφορά στο γεγονός πως η υψηλή περιεκτικότητα των BSG σε πολυσακχαρίτες και πρωτεΐνες (Πίνακας 6), σε συνδυασμό με την ύπαρξη υγρασίας, καθιστά την ύλη ευάλωτη στην ανάπτυξη μικροβίων και στην αλλοίωση της βιομάζας, περιορίζοντας έτσι την επιτυχή εκμετάλλευσή της. Έρευνες έδειξαν πως μετά από 30 ημέρες αποθήκευσης των BSG σε θερμοκρασία δωματίου, εντοπίστηκαν ίχνη από 8 διαφορετικά μυκητιακά γένη, συμπεριλαμβανομένων των *Aspergillus*, *Fusarium*, *Mucor*, *Penicillium* και *Rhizopus* [50]. Μία άλλη έρευνα έδειξε πως, παρόλο που το υπόλειμμα BSG μπορεί να θεωρηθεί μικροβιολογικά σταθερό και εντός αποδεχτών ορίων για τη χρήση του ως ζωοτροφή, ο πολλαπλασιασμός των μικροαερόφιλων βακτηριδίων και αναερόβιων οργανισμών υποδεικνύει πως η μικροχλωρίδα είναι επιρρεπής σε μια ταχεία αλλαγή μετά την παραγωγή του BSG. Επομένως, η ύλη BSG πρέπει να σταθεροποιείται και να αποθηκεύεται υπό κατάλληλες συνθήκες μετά την παραγωγή της, αν πρόκειται να χρησιμοποιηθεί σε κάποιο μεταγενέστερο στάδιο [60].

Έχουν εξεταστεί διάφορες μέθοδοι, ως προς την ακαταλληλότητά τους, για τη διατήρηση των εξαντλημένων σπόρων κριθαριού. Διαλύματα οξέων όπως το γαλακτικό οξύ, το αιθανικό οξύ, το μυρμηκικό (μεθανικό) οξύ και το βενζοϊκό οξύ έχουν χρησιμοποιηθεί για την συντήρηση των BSG, με το βενζοϊκό και το μυρμηκικό οξύ να είναι ιδιαίτερα αποτελεσματικά. Παρόλο που επί του παρόντος δεν υπάρχει κάποιος κανονισμός που να υποχρεώνει σε συγκεκριμένες οδηγίες συντήρησης των BSG για εφαρμογή σε ανθρώπινα τρόφιμα, υπάρχουν οδηγίες σε κάποιες χώρες σχετικά με την καλύτερη πρακτική συντήρησης και χρήσης των BSG ως ζωοτροφές. Για παράδειγμα, στη Γερμανία, το κρατικό Βαυαρικό κέντρο έρευνας για την γεωργία (Bavarian State Research Centre for Agriculture) προτείνει πως η χρήση μίγματος άλατος βενζοϊκού οξέος, άλατος προπιονικού οξέος και άλατος σορβικού οξέος σε συγκέντρωση 0.2-0.3% (w/w) μπορεί να χρησιμοποιηθεί για την παράταση της αερόβιας σταθερότητας των BSG κατά 4-5 ημέρες [69].

Για την συντήρηση των εξαντλημένων σπόρων κριθαριού έχουν εξεταστεί αρκετές φυσικές μέθοδοι όπως η ξήρανση με φούρνο, η λυοφιλίωση (ψυχρή ξήρανση, freeze-drying), κατάψυξη καθώς και χρήση υπέρθερμου ατμού. Η κατάψυξη έχει καθοριστεί ως μια ακατάλληλη μέθοδος συντήρησης καθώς χρειάζεται να αποθηκεύονται τεράστιοι όγκοι BSG και το κόστος θα ήταν πάρα πολύ υψηλό. Αντίθετα, οι μέθοδοι ξήρανσης, είτε με ψύξη είτε με φούρνο, μειώνουν τον όγκο της βιομάζας [70]. Επιπλέον, μια άλλη έρευνα έδειξε πως ανάμεσα στην κατάψυξη και την ξήρανση με φούρνο και με ψύξη, η κατάψυξη προκαλεί μεταβολές στην περιεκτικότητα της ύλης σε αραβινόζη, ενώ οι άλλες 2 μέθοδοι ξήρανσης δεν προκαλούν καμία τροποποίηση στην σύνθεση. Σύμφωνα με την ίδια έρευνα, η ψυχρή ξήρανση δεν θεωρείται οικονομικά βιώσιμη μέθοδος, ενώ η ξήρανση με φούρνο βρέθηκε ως η καταλληλότερη μέθοδος για την συντήρηση των εξαντλημένων σπόρων [71]. Ωστόσο, η τελευταία μέθοδος θα πρέπει να διεξάγεται σε θερμοκρασίες μικρότερες των 60 °C καθώς μεγαλύτερες θερμοκρασίες παράγουν δυσάρεστες οσμές. Ένα μειονέκτημα της ξήρανσης σε φούρνο είναι ο κίνδυνος να αυξηθεί η θερμοκρασία στην έξοδο του ξηραντήρα, οδηγώντας στο καψάλισμα ή και κάψιμο των BSG [50]. Μία εναλλακτική μέθοδος ξήρανσης αποτελεί η χρήση υπέρθερμου ατμού. Η μέθοδος αυτή έχει αποδειχθεί ιδιαίτερα επωφελής με την έννοια ότι καταναλώνει λιγότερη ενέργεια από ότι η ξήρανση σε φούρνο, αποδίδει καλύτερα αποτελέσματα ξήρανσης και βοηθάει στην ανάκτηση πολύτιμων οργανικών ενώσεων [72] [73]. Οι παράγοντες που επηρεάζουν σημαντικά την ξήρανση της ύλης BSG είναι η ταχύτητα του ατμού που διέρχεται από την ύλη καθώς και η θερμοκρασία του.

2.2.4.4 Επεξεργασία και Αξιοποίηση των BSG

2.2.4.4.1 Χρήση των BSG σε τρόφιμα και ζωοτροφές

Η χρήση των εξαντλημένων σπόρων κριθαριού στον τομέα των τροφίμων προοριζόμενα για κατανάλωση τόσο από τα ζώα όσο και από τον άνθρωπο, είναι μια ιδέα που αξιολογείται εδώ και πολύ καιρό, καθώς όλο και περισσότερα οφέλη για την υγεία ανακαλύπτονται από την πέψη ενώσεων που εμπεριέχονται στα υπολείμματα BSG. Κατά συνέπεια, πολλά ερευνητικά κέντρα εξακολουθούν να διερευνούν την δυνατότητα χρήσης των BSG ως συστατικά σε διάφορα διατροφικά προϊόντα. Οι τελευταίες έρευνες εστιάζουν στην ανάκτηση πολύτιμων ουσιών που εμπεριέχονται στους BSG με σκοπό την προσθήκη τους σε τρόφιμα και την προώθηση διάφορων χαρακτηριστικών που πιθανά να επιδρούν θετικά στην υγεία.

BSG στις ζωοτροφές

Η κύρια τρέχουσα εφαρμογή των BSG αφορά την τροφή βοοειδών. Οι BSG μπορούν να χρησιμοποιηθούν απευθείας σε υγρή μορφή (μετά τον διαχωρισμό τους με το ζυθογλεύκος) ή σε ξηρή μορφή. Η υψηλή περιεκτικότητά τους σε πρωτεΐνες και φυτικές ίνες σε συνδυασμό με το χαμηλό κόστος αυτού του παραπροϊόντος είναι δυο παράγοντες που κάνουν τα υπολείμματα BSG μια πολύ ενδιαφέρουσα ύλη για χρήση ως ζωοτροφή. Σε συνδυασμό με μη δαπανηρές πηγές αζώτου όπως η ουρία, οι BSG είναι σε θέση να παρέχουν όλα τα βασικά αμινοξέα που απαιτούν τα ζώα για την ανάπτυξή τους [74]. Επιπλέον, η συμπερίληψη των BSG στη διατροφή των αγελάδων αυξάνει την παραγωγή γάλακτος και την περιεκτικότητα σε ολικά στερεά, μειώνοντας την περιεκτικότητα σε λιπαρές ουσίες στο γαλακτοκομικό προϊόν [75] [76]. Τα υπολείμματα BSG έχουν χρησιμοποιηθεί επίσης για την σίτιση άλλων ζώων όπως πουλερικών, χοίρων ή ακόμη και τα ψαριών. Έχουν αναφερθεί σημαντικά αποτελέσματα από τη χρήση BSG σε αυτά τα ζώα, όπως η αύξηση του σωματικού βάρους. Σήμερα, οι BSG θεωρούνται μια χαμηλού κόστους εναλλακτική λύση για διατροφικά συστατικά τροφής των πουλερικών. Ωστόσο, έχει αναφερθεί πως κάποιοι πολυσακχαρίτες που εμπεριέχονται στους BSG, όπως η αραβινοξυλάνη και β-γλυκάνη δεν πέπτονται στον γαστρεντερικό σωλήνα αυτών των πτηνών, καθώς δεν έχουν τα απαραίτητα ένζυμα που χρειάζονται για την υδρόλυση των πολυμερικών αλυσίδων. Ως εκ τούτου, συνήθως προστίθενται ένζυμα β-γλυκανάσης και ξυλανάσης για να αντιμετωπιστεί αυτό το πρόβλημα [77].

BSG στα τρόφιμα

Εκτός της συμβολής τους στις ζωοτροφές, οι BSG έχουν θεωρηθεί και ένα αξιόλογο συστατικό για την προσθήκη τους σε ανθρώπινα τρόφιμα. Στην πραγματικότητα, η υψηλή περιεκτικότητά τους σε φυτικές ίνες, πρωτεΐνες και μεταλλικά στοιχεία είναι αυτή που μπορεί βελτιώσει τη συνολική θρεπτική αξία διάφορων τροφών. Μερικά πλεονεκτήματα για την υγεία από την πέψη των BSG είναι η επιταχυμένη διάρκεια πέψης, το αυξημένο βάρος των κοπράνων και η απέκκριση λίπους (ανακούφιση τόσο της δυσκοιλιότητας όσο και της διάρροιας), η μείωση της συχνότητας εμφάνισης πέτρας στην χοληδόχο κύστη, η μείωση της χοληστερόλης στο πλάσμα καθώς και η μείωση των επιπέδων γλυκόζης μεταγευματικά [78] [79]. Τα παραπάνω ευεργετικά αποτελέσματα αποδίδονται στην παρουσία πρωτεϊνών πλούσιων σε γλουταμίνη, σε μη κυτταρινικούς πολυσακχαρίτες και σε διαλυτές διαιτητικές ίνες, συμπεριλαμβανομένης της (1-3,1-4)-β-γλυκάνης, που υπάρχουν στα υπολείμματα BSG.

Υπάρχουν πολλές μελέτες που αναφέρουν τη χρήση των BSG σε προϊόντα διατροφής. Για παράδειγμα, έχει μελετηθεί η συμβολή των BSG για την παρασκευή προϊόντων αρτοποιίας, όπως ψωμιά,

μπισκότα, κέικ, βιάφλες, τортίγιες, σνακ, ντόνατς ή ακόμη και καραμέλες. Για να ενταχθούν σε αυτά τα προϊόντα, τα υπολείμματα BSG θα πρέπει πρώτα να μετατραπούν σε αλεύρι, καθώς η αρχική τους μορφή είναι αρκετά κοκκώδης για να μπορέσει να χρησιμοποιηθεί. Η ένταξη των BSG στα προϊόντα αρτοποιίας αυξάνει το περιεχόμενο τους σε πρωτεΐνες, φυτικές ίνες καθώς και αμινοξέα, μειώνοντας την περιεκτικότητα του τελικού προϊόντος σε θερμίδες [68]. Ωστόσο, πρέπει να δίνεται προσοχή όταν προστίθενται BSG σε τρόφιμα. Δεδομένου του καφετί χρώματος, συνιστάται εφαρμογή μόνο σε έγχρωμα προϊόντα όπως σε μερικά είδη ψωμιών, μπισκότων και κέικ, ώστε να μην επηρεαστεί το χρώμα του τελικού προϊόντος. Επιπλέον, η προσθήκη μόνο μικρής ποσότητας BSG (μέχρι και 100g/kg προϊόντος) σε προϊόντα συνιστάται, ώστε να αποφευχθούν τυχόν τροποποιήσεις στην γεύση και την υφή του τελικού προϊόντος [68].

Οι εξαντλημένοι σπόροι κριθαριού μπορούν να χρησιμοποιηθούν και σε άλλα διατροφικά προϊόντα, πέρα των προϊόντων αρτοποιίας, σύμφωνα με τελευταίες έρευνες. Για παράδειγμα, οι BSG μπορούν να χρησιμοποιηθούν στην παραγωγή λουκάνικων φρανκφούρτης, αυξάνοντας το περιεχόμενο των λουκάνικων σε φυτικές ίνες χωρίς να επηρεάζεται αρνητικά η αισθητική τους. Δεδομένου ότι οι BSG προωθούν αυτά χαρακτηριστικά στο τελικό προϊόν, προτάθηκε για χρήση ως υποκατάστατο λίπους για την παραγωγή προϊόντων κρέατος με υψηλή περιεκτικότητα σε φυτικές ίνες και χαμηλής περιεκτικότητας σε λιπαρές ουσίες [80]. Μια ακόμη εφαρμογή των BSG αφορά την παραγωγή του τραχανά. Η προσθήκη αλεσμένης ύλης BSG σε προϊόντα τραχανά οδηγεί σε μια σούπα με αποδεχτές ιδιότητες όσον αφορά την αισθητική αξιολόγηση του προϊόντος. Στην πραγματικότητα, οι ελαφρώς χαμηλότερες τιμές ορισμένων αισθητικών ιδιοτήτων (χρώμα, άρωμα και γεύση) θεωρείται ότι αντισταθμίζονται από τα σημαντικά οφέλη για την υγεία που παρέχει η αυξημένη περιεκτικότητα ινών στο προϊόν [81].

Ανάκτηση βιοδραστικών ουσιών από BSG

Τα τελευταία χρόνια, οι βιοδραστικές ενώσεις, συμπεριλαμβανομένων των φαινολικών ενώσεων, έχουν λάβει ιδιαίτερη προσοχή όσον αφορά την προσθήκη τους σε τρόφιμα λόγω της δυνατότητάς τους να προάγουν την ανθρώπινη υγεία. Συγκεκριμένα, έχει βρεθεί πως αυτές οι ουσίες ευθύνονται για αντιοξειδωτικές, αντιαλλεργικές, αντιφλεγμονώδεις και αντιμικροβιακές επιδράσεις καθώς και για μείωση της πιθανότητας εμφάνισης διαβήτη, καρκίνου αλλά και επικίνδυνων παραγόντων, σχετιζόμενων με καρδιαγγειακές παθήσεις [82].

Οι εξαντλημένοι σπόροι κριθαριού είναι ένα παραπροϊόν, πλούσιο σε φαινολικές ουσίες (Πίνακας 6) με αντιοξειδωτική δραστηριότητα, οι οποίες μπορούν να ανακτηθούν με διάφορες μεθόδους εκχύλισης, όπως με την στερεή-υγρή εκχύλιση και την εκχύλιση μικροκυμάτων (microwave assisted extraction, MAE). Ανάμεσα σε αυτές τις μεθόδους, η στερεή-υγρή εκχύλιση, σύμφωνα με μία έρευνα, βρέθηκε ιδιαίτερα αποδοτική, όταν χρησιμοποιείται ως διαλύτης ακετόνη 60% (v/v) για 30 λεπτά στους 60 °C [62]. Σύμφωνα με έρευνες, φαινολικά οξέα όπως τα φερουλικά και τα p-κουμαρικά οξέα είναι αυτά που εμφανίζονται σε μεγαλύτερα ποσοστά στους BSG και ευθύνονται κατά κύριο λόγο για τις αντιοξειδωτικές ιδιότητες τους. Τα φλαβονοειδή έχουν επίσης αναφερθεί πως συνδέονται άμεσα με την αντιοξειδωτική ικανότητα των BSG [62].

2.2.4.4.2 Επεξεργασία των BSG και παραγωγή ενέργειας

Έχουν προταθεί αρκετές εναλλακτικές λύσεις που αφορούν την εκμετάλλευση των BSG για παραγωγή ενέργειας, συμπεριλαμβανομένης της θερμοχημικής μετατροπής (πυρόλυση, καύση), της παραγωγής βιοαερίου και της παραγωγής αιθανόλης. Η παραγωγή ενέργειας από τους εξαντλημένους σπόρους κριθαριού έχει μελετηθεί ιδιαίτερα λόγω της ανάγκης που υπάρχει, τα τελευταία χρόνια, για παραγωγή ενέργειας από ανανεώσιμες πηγές που είναι φιλικές προς το περιβάλλον. Επιπλέον, η υψηλή διαθεσιμότητα αυτού του υλικού σε συνδυασμό με την χημική του σύνθεση και το χαμηλό κόστος καθιστά τους BSG μια πρώτη ύλη ιδιαίτερα ενδιαφέρουσα σε αυτό τον τομέα [68].

Θερμοχημική μετατροπή των BSG

Μια από τις πιθανές εναλλακτικές λύσεις για την παραγωγή ενέργειας από υλικά βιομάζας, όπως οι BSG, είναι με τη χρήση τεχνολογιών θερμικής μετατροπής, όπως η πυρόλυση και η καύση. Τα υπολείμματα BSG, σύμφωνα με τον Πίνακα 9, έχουν υψηλότερη θερμογόνο δύναμη HHV που κυμαίνεται στο 17.8-23.5 MJ/kg (δηλαδή περίπου 20 MJ/kg), μια σημαντική τιμή που τα καθιστά ενδιαφέρουσα πρώτη ύλη για διεργασίες καύσης. Ωστόσο, αξίζει να σημειωθεί πως για να μπορέσει να αξιοποιηθεί η θερμαντική αξία αυτής της βιομάζας θα πρέπει προηγουμένως να έχει ξηρανθεί σε σημείο που η περιεχόμενη υγρασία να βρίσκεται σε ποσοστό μικρότερο των 550g/kg, με διεργασία, για παράδειγμα, συμπίεσης [83]. Η θερμότητα που μπορεί να παραχθεί μετά από την καύση των BSG θα μπορούσε να χρησιμοποιηθεί για την κάλυψη των ενεργειακών αναγκών που υπάρχουν στις βιομηχανίες ζυθοποιίας. Ωστόσο, η καύση των BSG έχει ως αποτέλεσμα και την απελευθέρωση τόσο σωματιδίων όσο και τοξικών αερίων που περιέχουν άζωτο και διοξείδιο του θείου σε ποσοστά 1000-3000mg/m³ και 480 mg/m³

αντίστοιχα [84]. Για αυτό το λόγο, θα πρέπει να λαμβάνονται τα απαραίτητα μέτρα ώστε κατά την καύση των BSG να περιορίζονται τέτοια προβλήματα.

Μια άλλη ενδιαφέρουσα εναλλακτική είναι η χρήση των BSG για την παραγωγή τούβλων ξυλάνθρακα. Η διαδικασία παραγωγής ξυλάνθρακα ξεκινά με την ξήρανση των υπολειμμάτων BSG, η οποία ακολουθείται από διεργασία συμπίεσης και εξανθράκωσης σε ατμόσφαιρα με χαμηλά επίπεδα οξυγόνου [85]. Ο βιο-ξυλάνθρακας που δημιουργείται από αυτή τη διαδικασία έχει υψηλότερη θερμογόνο δύναμη HHV που αγγίζει τα 27 MJ/kg. Αξίζει να σημειωθεί πως αυτή η τιμή είναι πολύ κοντά σε ξυλάνθρακες που έχουν παραχθεί από άλλες πρώτες ύλες όπως το ξύλο, το ζαχαροκάλαμο ή ακόμη και το κέλυφος φουντουκιών [68]. Από την άλλη πλευρά, τα τούβλα ξυλάνθρακα που παράγονται από τους BSG παρουσιάζουν θερμοκρασιακές ιδιότητες κατώτερες από εκείνες που χαρακτηρίζουν πρώτες ύλες όπως το κάρβουνο ή το πριονίδι, καθώς η θερμοκρασία ανάφλεξης είναι υψηλότερη και περίοδος καύσης είναι μεγαλύτερη [86].

Σύμφωνα με έρευνες, οι εξαντλημένοι σπόροι κριθαριού μπορούν να υποστούν μια μέτρια πυρόλυση στους 450 °C με χρήση αντιδραστήρα γνωστού ως *Pyroformer*, δίνοντας ως προϊόντα 29% ξυλάνθρακα (char), 51% βιο-ελαίου (bio-oil) και 19% μόνιμα αέρια. Το βιο-έλαιο (bio-oil), το οποίο υπερτερεί ως προϊόν πυρόλυσης, απαρτίζεται από μίγματα υδρογονανθράκων με χαμηλό έως μέτριο μοριακό βάρος, όπως το βενζόλιο, το κυκλοοκτατετραένιο, το εξένιο, το τολουόλιο, το ξυλόλιο, παράγωγα φαινολικών αρωματικών ενώσεων, ενδεκανοϊκό οξύ καθώς και διάφορους μεθυλεστέρες [87].

Παραγωγή Βιοαερίου από BSG

Αρκετές μελέτες έχουν γίνει που αναφέρονται στην δυνατότητα παραγωγής βιοαερίου από BSG. Το βιοαέριο περιλαμβάνει περίπου 55-65% μεθάνιο, 30-45% διοξείδιο του άνθρακα, ίχνη υδρόθειου και κάποια κλάσματα υδρατμών. Η διαδικασία παραγωγής βιοαερίου, μέσω αναερόβιας χώνευσης, μπορεί να χωριστεί σε 2 στάδια:

- 1) Στάδιο υδρόλυσης που προωθεί την πλήρη αποικοδόμηση της ύλης.
- 2) Στάδιο μεθανογένεσης στο οποίο αρχικά, όξινοι μικροοργανισμοί μετατρέπουν τα μακρομόρια που απελευθερώνονται από το προηγούμενο στάδιο της υδρόλυσης σε πτητικά λιπαρά, οξικά, βουτυρικά καθώς και προπιονικά οξέα και στη συνέχεια, μεθανογενή βακτήρια μετατρέπουν αυτά τα πτητικά οξέα σε μεθάνιο.

Το στάδιο της υδρόλυσης μπορεί να πραγματοποιηθεί με τη χρήση διαφορετικών μεθοδολογιών όπως χημική/θερμική επεξεργασία, θραύση ή ακόμη και ενζυμική επεξεργασία. Ο πιο σημαντικός παράγοντας είναι να βρεθούν οι κατάλληλες συνθήκες ώστε να αποικοδομηθεί πλήρως η δομή της ύλης ώστε η επομένη διεργασία που θα πραγματοποιηθεί να επιφέρει και καλύτερες αποδόσεις [88].

Σύμφωνα με μια μελέτη που σχετίζεται με την παραγωγή βιοαερίου από SCG, βρέθηκε πως η συνολική απόδοση της αναερόβιας χώνευσης ήταν $3476 \text{ cm}^3/100\text{g BSG}$ μετά από 15 ημέρες χώνευσης [88]. Η θεωρητική απόδοση σε μεθάνιο από BSG, σύμφωνα με πηγές, υπολογίζεται να βρίσκεται κοντά στα 98 m^3 για κάθε 1 τόνο BSG [68]. Ωστόσο, η παραγωγή βιοαερίου από BSG αναστέλλεται από προϊόντα ενδιάμεσης λιγνοκυτταρινικής αποικοδόμησης, κυρίως της παρακρεσόλης (p-cresol) [89]. Η παρεμπόδιση αυτή δεν μπορεί να αποφευχθεί ακόμη και αν η ύλη BSG υποβληθεί σε μηχανικές, θερμοχημικές ή χημικές επεξεργασίες. Η παραγωγή βιοαερίου είναι επομένως ένας τομέας που χρήζει ιδιαίτερης προσοχής για να μπορέσει να αναπτυχθεί μια σταθερή διαδικασία παραγωγής.

Παραγωγή αιθανόλης από BSG

Τα τελευταία χρόνια, η παραγωγή αιθανόλης έχει λάβει εξαιρετική προσοχή λόγω της αξίας της ως εναλλακτικό καύσιμο καθώς μπορεί να προστεθεί στην βενζίνη, ενώ παράλληλα είναι φιλική προς το περιβάλλον ως ανανεώσιμη και βιώσιμη πηγή ενέργειας. Τα υπολείμματα BSG έχουν μελετηθεί εκτενώς για την παραγωγή δευτερογενούς αιθανόλης και αυτό οφείλεται στο γεγονός πως η περιεκτικότητα της σε ημικυτταρίνη και κυτταρίνη είναι πολύ υψηλή (Πίνακας 6). Σε μια πρόσφατη έρευνα, αποδείχθηκε πως με όξινη υδρόλυση των BSG, και έπειτα με ζύμωση του ημικυτταρινικού προϊόντος, πλούσιου σε ξυλόζη, με τη βοήθεια του σακχαρομύκητα *Pichia stipitis*, είναι δυνατό να παραχθεί αιθανόλη με απόδοση μετατροπής κοντά στο 86.3%. Σημειώνεται, πως το αποτέλεσμα αυτό λαμβάνεται χωρίς την προσθήκη θρεπτικών ουσιών στο προϊόν υδρόλυσης, σε αντίθεση με άλλες πρώτες ύλες όπως τα υπολείμματα ζαχαροκάλαμου, τα οποία απαιτούν την προσθήκη θρεπτικών ουσιών στο στάδιο της ζύμωσης, προκειμένου να επιτευχθεί η αποτελεσματική μετατροπή των σακχάρων σε αιθανόλη 2^{ns} γενιάς. Το γεγονός αυτό συντελεί μια πολύ σημαντική πτυχή για την οικονομία της όλης διαδικασίας [68, p. 1268]. Όσον αφορά την εκμετάλλευση του περιεχομένου των BSG σε κυτταρίνη για την παραγωγή αιθανόλης, θα πρέπει να ληφθούν υπόψη κάποιες διεργασίες προκατεργασίας που απαιτούνται, προκειμένου η εκχύλιση της γλυκόζης από την κυτταρίνη να είναι πιο εύκολη, για μετέπειτα χρήση ως πηγή άνθρακα στο στάδιο της ζύμωσης. Συγκεκριμένα, οι BSG μπορεί να υποστούν όξινη επεξεργασία,

χώνευση με μικροκύματα, ενζυμική υδρόλυση ή ακόμη και επεξεργασία με υπερήχους. Μια γενική μεθοδολογία [68, p. 1268] που αφορά την παραγωγή αιθανόλης από BSG, περιλαμβάνει τα εξής στάδια:

- 1) Προκατεργασία των BSG με οξύ και θερμότητα για την αποικοδόμηση του ημικυτταρινικού κλάσματος.
- 2) Υδρόλυση των προκατεργασμένων BSG με ένζυμα για την μετατροπή του αμύλου και του κυτταρινικού υλικού σε απλά σάκχαρα.
- 3) Ζύμωση των απλών σακχάρων σε αιθανόλη με κάποιο κατάλληλο μικροοργανισμό (όπως τους *Zymomonas mobilis*, *Saccharomyces cerevisiae*, *Escherichia coli*, *Bacillus subtilis* και *Pichia pastoris*).
- 4) Απόσταξη της αιθανόλης που παράγεται μέσω της ζύμωσης.
- 5) Αφυδάτωση της αιθανόλης για την απομάκρυνση του νερού.

2.2.4.4.3 Παραγωγή χημικών προϊόντων από BSG

Οι εξαντλημένοι σπόροι κριθαριού μπορούν να χρησιμοποιηθούν και σε χημικές διεργασίες προκειμένου να ληφθούν ουσίες βιομηχανικού ενδιαφέροντος, είτε διαδικασίες εκχύλισης, είτε μέσω χημικών αντιδράσεων. Αρκετές πιθανές εφαρμογές έχουν προταθεί για χρήση BSG σε αυτόν τον τομέα, μεταξύ των οποίων, η χρήση του ως προσροφητικό υλικό για επεξεργασία λυμάτων φαίνεται να είναι μία από τις πιο ελπιδοφόρες εφαρμογές.

Εξαγωγή χημικών ουσιών από BSG

Όπως έχει ήδη αναφερθεί, οι BSG είναι πλούσιοι σε κυτταρινικούς και ημικυτταρινικούς πολυσακχαρίτες, οι οποίες είναι ενώσεις προστιθέμενης αξίας με πολλές βιομηχανικές εφαρμογές. Προκειμένου να εξαχθούν αυτές οι ενώσεις από την δομή BSG, μπορούν να χρησιμοποιηθούν διάφορες χημικές διεργασίες, μεταξύ των οποίων η όξινη και υδροθερμική υδρόλυση. Με χημική υδρόλυση, η κυτταρίνη μπορεί να μετατραπεί σε γλυκόζη, ενώ η ημικυτταρίνη μπορεί να μετατραπεί σε ξυλόζη και αραβινόζη, τα οποία είναι τα πιο άφθονα σάκχαρα που υπάρχουν στο κλάσμα του BSG.

Διάφορα υδροκιναμωμικά οξέα μπορούν επίσης να εξαχθούν από τους BSG με χημική επεξεργασία. Σε αυτά, εντάσσονται κυρίως τα φερουλικά και τα p-κουμαρικά οξέα, τα οποία μπορούν, σύμφωνα με μία έρευνα [90], να εξαχθούν βέλτιστα με αλκαλική υδρόλυση, με χρήση ως διαλύτη NaOH συγκέντρωσης 2% w/v, σε αναλογία στερεού/υγρού 1:20 και στους 120 °C για 90 λεπτά. Το υγρό που

ανακτάται από αυτή τη διαδικασία μπορεί να περιέχει έως και 145.3 mg/L φερουλικού οξέος, και 138.8 mg/L p-κουμαρικού οξέος. Η μέθοδος εκχύλισης μικροκυμάτων (MAE) είναι άλλη μια τεχνολογία που μπορεί να χρησιμοποιηθεί για την ανάκτηση πολυφαινόλων από τους BSG, συμπεριλαμβανομένου και του φερουλικού οξέος [91]. Λαμβάνοντας υπόψη πως το φερουλικό και το p-κουμαρικό οξύ είναι ενώσεις με αντιοξειδωτικές ιδιότητες και με σημαντικές βιομηχανικές εφαρμογές, η ανάκτηση αυτών προσφέρει νέες δυνατότητες σχετικά με την επαναχρησιμοποίηση των BSG στα τρόφιμα, τα καλλυντικά και τον φαρμακευτικό τομέα.

Αντιοξειδωτικές φαινολικές ουσίες μπορούν επίσης να ανακτηθούν από τους εξαντλημένους σπόρους κριθαριού με μέθοδο απλής εκχύλισης με διαλύτη. Έχουν χρησιμοποιηθεί πολλοί διαλύτες για αυτή τη διεργασία, ανάμεσά τους η μεθανόλη, η αιθανόλη, η ακετόνη, το εξάνιο, ο αιθανικός αιθυλεστέρας, το νερό αλλά και τα μίγματα μεθανόλης/νερού, αιθανόλης/νερού και ακετόνης/νερού. Ωστόσο, έχει αποδειχθεί πως ο καλύτερος διαλύτης για αυτή τη διεργασία αποτελεί το μίγμα ακετόνης/νερού με συγκέντρωση 60% (v/v). Οι αντιοξειδωτικές φαινολικές ουσίες που ανακτώνται μπορούν να χρησιμοποιηθούν ως φυσικές και φθηνές εναλλακτικές των συνθετικών αντιοξειδωτικών [62].

Παραγωγή προϊόντων χαρτιού από BSG

Λόγω της ινώδους φύσης του, το BSG θεωρείται ως κατάλληλη πρώτη ύλη για την παραγωγή χαρτιών. Οι εξαντλημένοι σπόροι κριθαριού έχουν ήδη χρησιμοποιηθεί για την παραγωγή χαρτοπετσετών, επαγγελματικών καρτών καθώς και σουβέρ, παρέχοντας υψηλής ποιότητας υφή σε αυτά τα προϊόντα. Μια πρόσφατη έρευνα ανέφερε την παραγωγή λευκασμένου κυτταρινικού πολτού από ύλη BSG. Ο χαρτοπολτός αυτός, πλούσιος σε κυτταρίνη (904 g/kg), με χαμηλό περιεχόμενο σε ημικυτταρίνη και εκχυλίσιμες ουσίες (79 και 34 g/kg αντίστοιχα), ανακτήθηκε με πολτοποίηση (soda pulping) της όξινα προκατεργασμένης ύλης BSG. Στη συνέχεια, ο πολτός λευκάνθηκε με ακολουθία τριών βημάτων, χρησιμοποιώντας 5% (v/v) υπεροξείδιο του υδρογόνου στα πρώτα δύο στάδια, και 0.25 mol/L NaOH στο τελευταίο. Με αυτή τη διαδικασία, ανακτήθηκε ένας λευκωμένος χαρτοπολτός με αριθμό Kappa 11.21, ιξώδες 3.12 cP, φωτεινότητα 71.3%, περιεχόμενο σε κυτταρίνη 957 g/kg και υπολειπόμενη λιγνίνη 34 g/kg [68, p. 1270].

Παραγωγή προσροφητικών υλικών από BSG

Μια από τις πιο ενδιαφέρουσες και ελπιδοφόρες εφαρμογές των BSG αποτελεί η παραγωγή προσροφητικών υλικών για την απομάκρυνση είτε οργανικών ουσιών από αέρια απόβλητα, είτε χρωστικών από υδατικά λύματα.

Στα υδατικά διαλύματα, οι BSG είναι ικανοί να προσροφήσουν κάδμιο, μόλυβδο καθώς και χρώμιο σε ποσότητες που φτάνουν τα 17.3, 35.5 και 18.94 mg/g αντίστοιχα. Ωστόσο, για να συμβεί αυτό, επιβάλλεται κατάλληλη επεξεργασία των BSG με NaOH, ώστε να αυξηθεί η προσροφητική ικανότητα για τα μέταλλα. Η ικανότητα των BSG να προσροφούν αυτά τα μέταλλα είναι παρόμοια με την ικανότητα που αναφέρεται και για άλλα υλικά όπως τα κυαθώδη φυτά, το πίτουρο σιταριού, τα υπολείμματα ζαχαροκάλαμου, ο πολτός ζαχαρότευτλων καθώς και το κέλυφος καρύδας [68, p. 1270]. Μια πρόσφατη έρευνα έδειξε πως προσροφητικό υλικό αποτελούμενο από εστεροποιημένο BSG έχει ακόμη μεγαλύτερη ικανότητα προσρόφησης όσον αφορά τα μέταλλα καδμίου εντός υδατικών διαλυμάτων. Οι εστεροποιημένοι BSG παρουσίασαν πολύ υψηλή απόδοση απομάκρυνσης καδμίου σε pH ανάμεσα στο 4-8, με μέγιστη προσροφητική ικανότητα των 473.93 mg/g, καθώς επίσης αποδείχθηκε πως είναι ικανοί να επαναχρησιμοποιηθούν έως και 9 φορές [92].

Οι εξαντλημένοι σπόροι κριθαριού μπορούν επίσης να αφαιρέσουν διάφορες χρωστικές από υδατικά απόβλητα. Οι BSG μπορούν να προσροφήσουν αποτελεσματικά την χρωστική ουσία AO7 (acid orange 7), η οποία χρησιμοποιείται κυρίως σε χαρτοβιομηχανίες και βιομηχανίες κλωστοϋφαντουργίας και της οποίας η παρουσία σε λύματα οδηγεί σε σοβαρά περιβαλλοντικά προβλήματα. Η προσροφητική ικανότητα των BSG φτάνει τα 30.5 mg AO7 ανά g BSG σε θερμοκρασία 30 °C, χωρίς να απαιτείται κάποιου είδους προκατεργασία της ύλης [93].

Οι BSG μπορούν επίσης να χρησιμοποιηθούν ως πρώτη ύλη για την παραγωγή ενεργού άνθρακα, ο οποίος χρησιμοποιείται ευρέως για τον καθαρισμό υδάτων και αερίων, λόγω της προσροφητικής του ικανότητας. Η διαδικασία παραγωγής ενεργού άνθρακα από λιγνίνη που εμπεριέχεται στους BSG, αποτελείται από τα ακόλουθα βήματα:

1. Ανάκτηση λιγνίνης από τους BSG με αλκαλική επεξεργασία
2. Καταβύθιση λιγνίνης με H₂SO₄
3. Ενεργοποίηση της ανακτώμενης λιγνίνης με 3g H₃PO₄ ανά g λιγνίνης στους 600 °C

Ο ενεργός άνθρακας που παράγεται από τους BSG παρουσιάζει μια προσροφητική ικανότητα παρόμοια ή και καλύτερη από αυτή διάφορων εμπορικών προϊόντων και είναι μια πολύ καλή λύση για την αντιμετώπιση υδατικών λυμάτων, καθώς μπορεί να προσροφήσει τόσο φαινολικές ουσίες, όσο και μεταλλικά ιόντα (κυρίως Ni, Fe, Cr και Si) [94].

2.3 Παραγωγή βιοαιθανόλης 2ης γενιάς

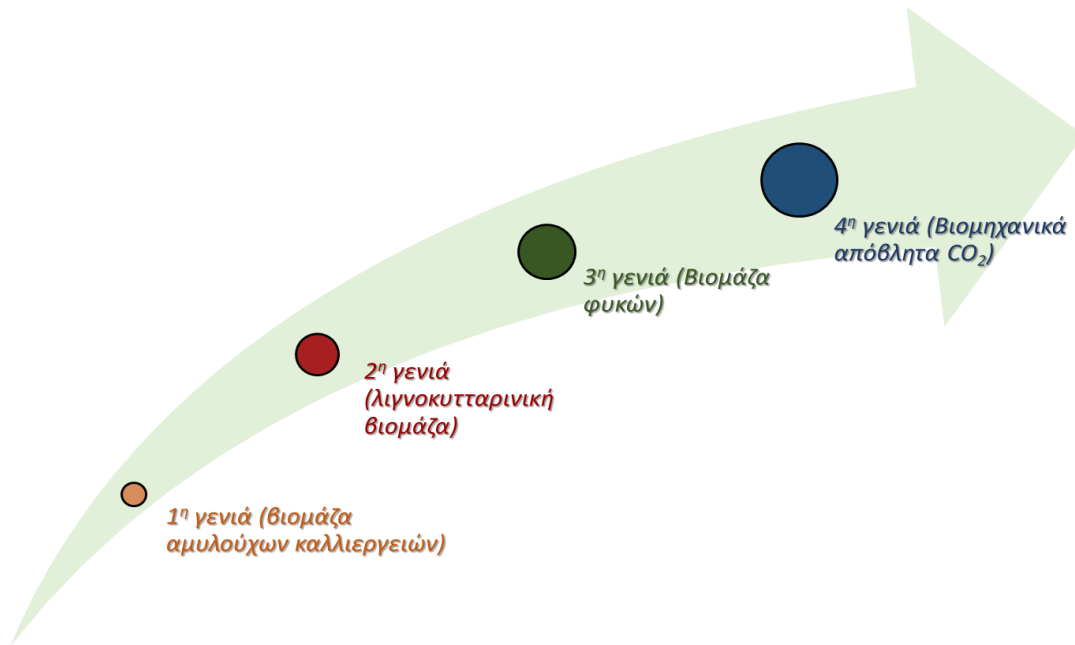
2.3.1 Βιοαιθανόλη

Η βιοαιθανόλη, γνωστή επίσης και ως αιθυλική αλκοόλη ή αιθανόλη, είναι μία οργανική ένωση με χημικό τύπο $\text{CH}_3\text{CH}_2\text{OH}$. Σήμερα η βιοαιθανόλη αποτελεί το πιο συχνά χρησιμοποιούμενο υγρό καύσιμο στον κόσμο. Η βιοαιθανόλη παράγεται κυρίως με μικροβιακή ζύμωση διαφόρων πρώτων υλών που περιέχουν ζυμώσιμα σάκχαρα ή υδατάνθρακες.

Επί του παρόντος, ο μεγαλύτερος παραγωγός βιοαιθανόλης είναι οι Ηνωμένες Πολιτείες, ακολουθούμενες από τη Βραζιλία, την Ευρωπαϊκή Ένωση (με επικεφαλής τη Γερμανία) και την Κίνα. Από τη δεκαετία του '80, η Βραζιλία έχει διαδραματίσει πρωτοποριακό ρόλο στον τομέα των τεχνολογιών βιοκαυσίμων και αυτή τη στιγμή αυτόνομο, με τη βιοαιθανόλη να αντιπροσωπεύει περισσότερο από το 50% της εγχώριας αγοράς των καυσίμων μεταφοράς. Αυτό το άφθονο μερίδιο της βιοαιθανόλης στη Βραζιλία λαμβάνεται κυρίως από ζαχαροκάλαμο, ενώ στις Ηνωμένες Πολιτείες παράγεται κυρίως από αραβόσιτο και αντιπροσωπεύει περίπου το ένα τρίτο της παραγωγής καλαμποκιού και περίπου το 6% της βενζίνης. Στην Ευρωπαϊκή Ένωση, η αβεβαιότητα σχετικά με τη νομοθεσία το 2013 και το 2014 καθυστέρησε την ανάπτυξη της αγοράς. Εντούτοις, το άνοιγμα του βιολογικού κέντρου Crescentino στο νομό Vercelli (βόρεια της Ιταλίας), που αναπτύχθηκε από την Beta Renewables τον Οκτώβριο 2013, αποτέλεσε σημείο καμπής για την παραγωγή βιοαιθανόλης από куτταρίνη στην Ευρώπη. Με την παραγωγή των 49.000 m³ βιοαιθανόλης, πρόκειται για το πρώτο εργοστάσιο куτταρινικής αιθανόλης σε παγκόσμια κλίμακα [95].

2.3.1.1 Οι 4 γενιές της βιοαιθανόλης

Οι διαθέσιμες πρώτες ύλες για την παραγωγή βιοαιθανόλης μπορούν να κατηγοριοποιηθούν σε 4 κύρια είδη (Εικόνα 3).



Εικόνα 3: Τα 4 κύρια είδη βιοαιθανόλης και οι πρώτες ύλες που χρησιμοποιούνται σε κάθε περίπτωση [96].

Η πρώτη ύλη 1^{ης} γενιάς αποτελείται κυρίως από εδώδιμες τροφές όπως είναι το ρύζι, το σιτάρι, το κριθάρι, η πατάτα, το καλαμπόκι, το ζαχαροκάλαμο και διάφορα φυτικά έλαια, όπως το σογιέλαιο, το ηλιέλαιο, το ελαιόλαδο κλπ. Παρόλο που η παραγωγή βιοαιθανόλης 1^{ης} γενιάς έχει κεντρίσει το ενδιαφέρον σε πολυάριθμες χώρες, η σκοπιμότητα της παραγωγής εξακολουθεί να είναι αμφισβητήσιμη λόγω του ανταγωνισμού που υπάρχει με την παραγωγή βρώσιμων προϊόντων και την καλλιέργεια γης.

Η παραγωγή βιοαιθανόλης 2^{ης} γενιάς επικεντρώνεται στην αξιοποίηση μη εδώδιμης πρώτης ύλης, συμπεριλαμβανομένης της λιγνοκυτταρινικής βιομάζας, όπως υπολείμματα δασών, ξυλώδη βιομάζα, πώδη βιομάζα, μη φυτικές καλλιέργειες, αστικά στερεά απόβλητα και ζωικό λίπος. Η παραγωγή βιοαιθανόλης 2^{ης} γενιάς έχει ορισμένα σαφή πλεονεκτήματα σε σχέση με την παραγωγή βιοαιθανόλης 1^{ης} γενιάς. Για παράδειγμα, οι πρώτες ύλες 2^{ης} γενιάς μπορούν να αναπτυχθούν σε οριακές εκτάσεις χαμηλής ποιότητας με λιγότερα ύδατα και λιπάσματα και χωρίς άμεσο ανταγωνισμό με τις καλλιέργειες τροφίμων. Αν και οι πρώτες ύλες βιοαιθανόλης 2^{ης} γενιάς έχουν αντιμετωπίσει ορισμένα από τα θέματα που σχετίζονται με πρώτες ύλες 1^{ης} γενιάς, εξακολουθούν να παρουσιάζουν κάποια μειονεκτήματα. Για παράδειγμα, η παραγωγή βιοαιθανόλης 2^{ης} γενιάς απαιτεί μεγαλύτερο κόστος κεφαλαίου λόγω του εξελιγμένου εξοπλισμού επεξεργασίας και της χαμηλότερης ενεργειακής πυκνότητας σε σύγκριση με τη βιοαιθανόλη 1^{ης} γενιάς. Ωστόσο, η βιοαιθανόλη 2^{ης} γενιάς έχει χαμηλότερες εκπομπές αερίων θερμοκηπίου (CO₂ 2,85 kg/kg) σε σύγκριση με τις άλλες πρώτες ύλες [96].

Με στόχο την αντιμετώπιση των ζητημάτων που σχετίζονται με τη βιοαιθανόλη 1^{ης} και 2^{ης} γενιάς, οι ερευνητές έχουν διερευνήσει μια εναλλακτική πρώτη ύλη για την παραγωγή βιοαιθανόλης. Τυπικά, η βιοαιθανόλη που παράγεται από βιομάζα φυκιών (δηλ. μικροφύκη, μικρόβια) θεωρείται βιοαιθανόλη 3^{ης} γενιάς. Τα τροφοδοτικά αποθέματα βιοαιθανόλης 3^{ης} γενιάς αντιπροσωπεύουν μια πολλά υποσχόμενη πρώτη ύλη εξαιτίας του αριθμού των αξιοσημείωτων πλεονεκτημάτων έναντι των πρώτων και δεύτερων γενεών τροφοδοσίας. Για παράδειγμα, τα μικροφύκη μπορούν να καλλιεργηθούν σε περιθωριακό έδαφος με υδατικό περιβάλλον, χαμηλό κόστος καλλιέργειας, υψηλή απόδοση μετατροπής και υψηλή ενεργειακή πυκνότητα. Ωστόσο, η βιοαιθανόλη που παράγεται από τα φύκια είναι λιγότερο σταθερή σε σύγκριση με τη βιοαιθανόλη που παράγεται από άλλες πηγές [96].

Η βιοαιθανόλη που παράγεται από το δεσμευμένο διοξείδιο του άνθρακα με τη χρήση προηγμένων τεχνολογιών όπως η ηλεκτροχημική σύνθεση, η ηλεκτρόλυση οξειδίων και η υδρογονοεπεξεργασία πετρελαίου ονομάζεται βιοαιθανόλη 4^{ης} γενιάς. Στο περιβαλλοντικό πλαίσιο, η βιοαιθανόλη 4^{ης} γενιάς θεωρείται αρνητική ως προς τον άνθρακα, καθώς ο άνθρακας που παράγεται από αυτή την τεχνολογία είναι μικρότερος σε σύγκριση με τον άνθρακα που συλλέγεται. Ωστόσο, αυτή η τεχνολογία βρίσκεται σε εμβρυϊκό στάδιο [96].

2.3.1.2 Η βιοαιθανόλη ως καύσιμο

Η παραγόμενη βιοαιθανόλη μπορεί να χρησιμοποιηθεί άμεσα ως υποκατάστατο βενζίνης σε κινητήρες. Ο Πίνακας 10 απεικονίζει τις φυσικοχημικές ιδιότητες της βενζίνης και της αιθανόλης (βιοαιθανόλη). Παρατηρείται ότι η αιθανόλη έχει χαμηλότερη κατώτερη θερμογόνο δύναμη LHV (21,1 MJ/L) από τη βενζίνη (30-33 MJ/L), επομένως περισσότερη αιθανόλη απαιτείται για την επίτευξη της ίδιας παραγωγής. Ωστόσο, ο υψηλότερος αριθμός οκτανίων αιθανόλης επιτρέπει υψηλότερη αναλογία συμπίεσης κινητήρα που πρέπει να χρησιμοποιηθεί, πράγμα που οδηγεί σε βελτιωμένη θερμική απόδοση και αυξημένη ισχύ, μειώνοντας έτσι κάπως τη διαφορά στην κατανάλωση καυσίμου.

Παρατηρείται επίσης ότι υπάρχουν σημαντικές διαφορές μεταξύ των άλλων ιδιοτήτων των δύο καυσίμων, για παράδειγμα, το ιξώδες, το ειδικό βάρος, το σημείο πήξης, το σημείο βρασμού, το σημείο ανάφλεξης, την πίεση ατμών, το όριο ευφλεκτότητας, τη θερμοκρασία αυτανάφλεξης, τη στοιχειομετρική αναλογία αέρα/καυσίμου κ.λπ. Για να βελτιωθεί η ποιότητα των καυσίμων, όπως ο αριθμός των οκτανίων, η εκκίνηση με κρύο, η θερμή λειτουργία και η κατανάλωση καυσίμου, η βιοαιθανόλη συνήθως αναμιγνύεται με βενζίνη, για παράδειγμα, σύμφωνα με το πρότυπο E5 (5%

αιθανόλη και βενζίνη 95%) ή το πρότυπο E25 (αιθανόλη 25% και βενζίνη 75%) χωρίς να απαιτούνται αλλαγές στον εξοπλισμό ή τις ρυθμίσεις του κινητήρα [97].

Πίνακας 10: Φυσικοχημικές ιδιότητες της βενζίνης και της αιθανόλης (βιοαιθανόλης) [97]

Μέγεθος	Βενζίνη	Αιθανόλη
Τύπος	C ₄ – C ₁₂	C ₂ H ₅ OH
Μοριακό βάρος	100-105	46.07
Πυκνότητα στους 15 °C (kg/L)	0.69 – 0.79	0.79
Ειδικό βάρος στους 15 °C	91	106 - 110
Σημείο πήξης (°C)	-40	-114
Σημείο βρασμού (°C)	27 – 225	78
Τάση ατμών στους 38 °C (kPa)	48-103	15.9
Ειδική θερμότητα (kJ/kg*K)	2.0	2.4
Ιξώδες στους 20 °C (mPa*s)	0.37 – 0.44	1.19
Κατώτερη θερμογόνος δύναμη, LHV (MJ/L)	30-33	21.1
Σημείο ανάφλεξης (°C)	-43	13
Σημείο αυτανάφλεξης (°C)	257	423
Κάτω όριο αναφλεξιμότητας (vol%)	1.4	4.3
Άνω όριο αναφλεξιμότητας (vol%)	7.6	19.0
Στοιχειομετρική αναλογία αέρα/καυσίμου	14.7	9.0
Αριθμός οκτανίου, RON	88 - 100	108.6
Αριθμός οκτανίου, MON	80 - 90	89.7

Επίσης, η βιοαιθανόλη μπορεί να χρησιμοποιηθεί σε ανεγκυστήρες, αεροπλάνα και σκάφη. Μπορεί να χρησιμοποιηθεί ως ενισχυτής οκτανίου για την αντικατάσταση του τετρααιθυλικού μολύβδου. Μπορεί επίσης να χρησιμοποιηθεί ως πρόσθετο για την αύξηση του ποσοστού οξυγόνου/καυσίμου, γεγονός που μειώνει τις εκπομπές CO και αρωματικών ουσιών [97].

2.3.2 Πηγές βιομάζας για παραγωγή βιοαιθανόλης

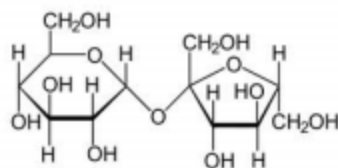
Η πρώτη ύλη που μπορεί να χρησιμοποιηθεί για την παραγωγή βιοαιθανόλης μπορεί να προέρχεται από διάφορες πηγές. Αναλόγως της σύστασης της ύλης και το περιεχόμενο που αξιοποιείται κυρίως κατά την επεξεργασία και την παραγωγή αιθανόλης, οι πρώτες ύλες ταξινομούνται σε τρεις κατηγορίες, όπως παρουσιάζεται παρακάτω.

2.3.2.1 Βιομάζα πλούσια σε σακχαρόζη

Σε αυτή την κατηγορία συγκαταλέγονται τα ζαχαροκάλαμα, τα ζαχαρότευτλα και ο γλυκός σόργος. Τα κύρια πλεονεκτήματά τους είναι υψηλή απόδοση ζάχαρης ανά στρέμμα και το χαμηλό κόστος μετατροπής. Αντίθετα, το μειονέκτημα της χρήσης αυτών των καλλιεργειών είναι η φυσική τους εποχιακή διαθεσιμότητα. Δεδομένου ότι οι ίνες στους μίσχους και τα φύλλα χρησιμοποιούνται για την παραγωγή ατμού και ηλεκτρικής ενέργειας μειώνοντας το κόστος επεξεργασίας του φυτού, ιδιαίτερα το ζαχαροκάλαμο, έγινε οικονομικά αποδοτική πηγή βιοκαυσίμων. Επιπλέον, τα υγρά απόβλητα χρησιμοποιούνται ως λίπασμα και άρδευση στα πεδία ζαχαροκάλαμου, ως εκ τούτου εξαλείφοντας το κόστος της επεξεργασίας λυμάτων.

Τα ζαχαρότευτλα αποτελούν σημαντική πηγή ζάχαρης στην Ευρώπη και την Βόρεια Αμερική, και χρησιμοποιούνται για την παραγωγή βιοκαυσίμων στη Γαλλία. Τα ζαχαρότευτλα παράγουν καλές αποδόσεις (25-50 τόνους ανά στρέμμα) και αναπτύσσονται σε κλίμα με χαμηλότερη βροχόπτωση από ό,τι απαιτείται για τα ζαχαροκάλαμα. Κατά μέσο όρο, η απόδοση αιθανόλης φτάνει τα 25 γαλόνια ανά τόνο ζαχαρότευτλων. Ωστόσο, η παραγωγή αιθανόλης από ζαχαρότευτλα απαιτεί μεγαλύτερη χημική και ενεργειακή κατανάλωση και συνεπώς είναι περισσότερο ακριβή από τη διαδικασία που χρησιμοποιεί ζαχαροκάλαμο.

Οι ποικιλίες γλυκού σόργου είναι λίγες σε αριθμό και δεν έχουν ευρεία ανάπτυξη αν και ορισμένοι έχουν σημαντική περιεκτικότητα σε σακχαρόζη (190 λίτρων ανά στρέμμα). Στο γλυκό σόργο, η ζάχαρη αποθηκεύεται στο κύριο μίσχο και ανακτάται πατώντας τους μίσχους με κυλίνδρους (παρόμοια με τη διαδικασία που χρησιμοποιείται για το ζαχαροκάλαμο). Οι αποδόσεις φτάνουν κατά μέσο όρο τα 75 λίτρα αιθανόλης ανά τόνο μίσχων. Η Κίνα επιδιώκει αυτή τη στιγμή μετάβαση από καλαμπόκι σε γλυκό σόργο ως πρώτη ύλη για την αιθανόλη, δεδομένου ότι ο σόργος είναι περισσότερο ανεκτικός στην ξηρασία και μπορεί να αναπτυχθεί στις ξηρές περιοχές της Κίνας όπου το καλαμπόκι δεν ευδοκιμεί. Ένα επιπλέον όφελος είναι ότι οι αγρότες μπορούν να χρησιμοποιήσουν το σπόρο σόργου, δεδομένου ότι η αιθανόλη παράγεται από το γλυκό χυμό στο μίσχο [98, p. 575].



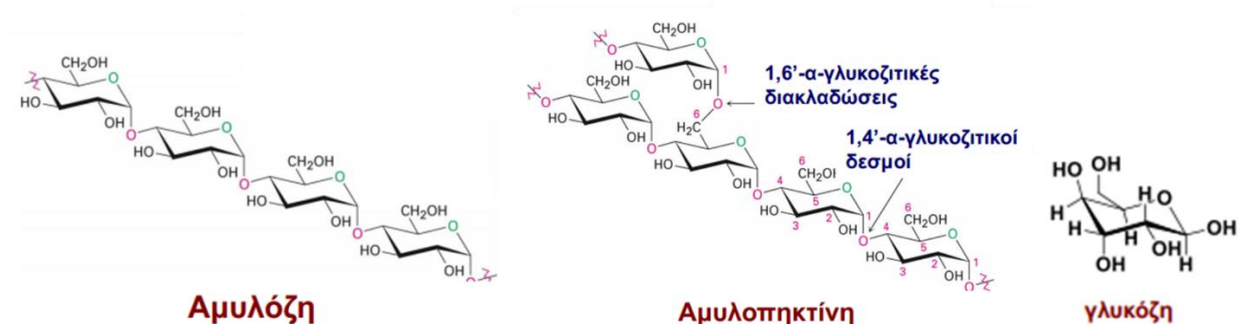
σακχαρόζη
(γλυκόζη-φρουκτόζη)

Σχήμα 5: Δομή σακχαρόζης [99].

2.3.2.2 Βιομάζα πλούσια σε άμυλο

Οι κόκκοι καλαμποκιού, σιταριού και κριθαριού εντάσσονται σε αυτή την κατηγορία καθώς αποτελούν φυτά αποτελούμενα κυρίως από άμυλο. Για παράδειγμα το καλαμπόκι περιέχει 60-70% άμυλο. Το άμυλο απαρτίζεται από μακριές αλυσίδες μονάδων γλυκόζης, περιέχοντας 1000 ή και παραπάνω μονομερή μονάδες ανά δομή αμυλόζης και 1000-6000 ή και παραπάνω μονάδες μονομερών ανά δομή αμυλοπηκτίνης. Για την παραγωγή αιθανόλης από άμυλο είναι απαραίτητη η διάσπαση των αλυσίδων αυτών που συγκρατούν τις μονάδες γλυκόζης στον υδατάνθρακα, ώστε αυτές, στην συνέχεια, να μπορούν να μετατραπούν σε αιθανόλη με ζύμωση. Αυτός ο τύπος πρώτης ύλης είναι ο πλέον χρησιμοποιούμενος για την παραγωγή αιθανόλης στη Βόρεια Αμερική και την Ευρώπη. Καλαμπόκι και σιτάρι χρησιμοποιούνται κυρίως με σκοπό την παραγωγή αιθανόλης. Σε τροπικές χώρες, άλλες αμυλούχες καλλιέργειες, όπως η κασάβα (ξυλώδης θάμνος που ευδοκμεί στην Νότια Αμερική), μπορούν να χρησιμοποιηθούν για εμπορική παραγωγή καυσίμου αιθανόλης.

Στο άμυλο, πολυμερή γλυκόζης διασπώνται σε γλυκόζη μέσω μια υδρολυτικής αντίδρασης καταλυόμενης από το ένζυμο της γλυκοαμυλάσης. Το προκύπτον σάκχαρο είναι γνωστό ως δεξτρόζη ή D-γλυκόζη που είναι ένα ισομερές της γλυκόζης. Εν συνεχεία, ακολουθεί η ενζυμική υδρόλυση, η ζύμωση, η απόσταξη και η αφυδάτωση, ώστε να προκύψει τελικά η άνυδρη αιθανόλη [98, p. 576]. Παρακάτω, στο Σχήμα 6, φαίνονται οι δομές αμυλόζης και αμυλοπηκτίνης. Το άμυλο αποτελείται κυρίως από δομές αμυλοπηκτίνης (περίπου 70-80%), και σε λιγότερο ποσοστό από δομές αμυλόζης (περίπου 20-30%).



Σχήμα 6: Δομές αμυλόζης, αμυλοπηκτίνης και γλυκόζης [99].

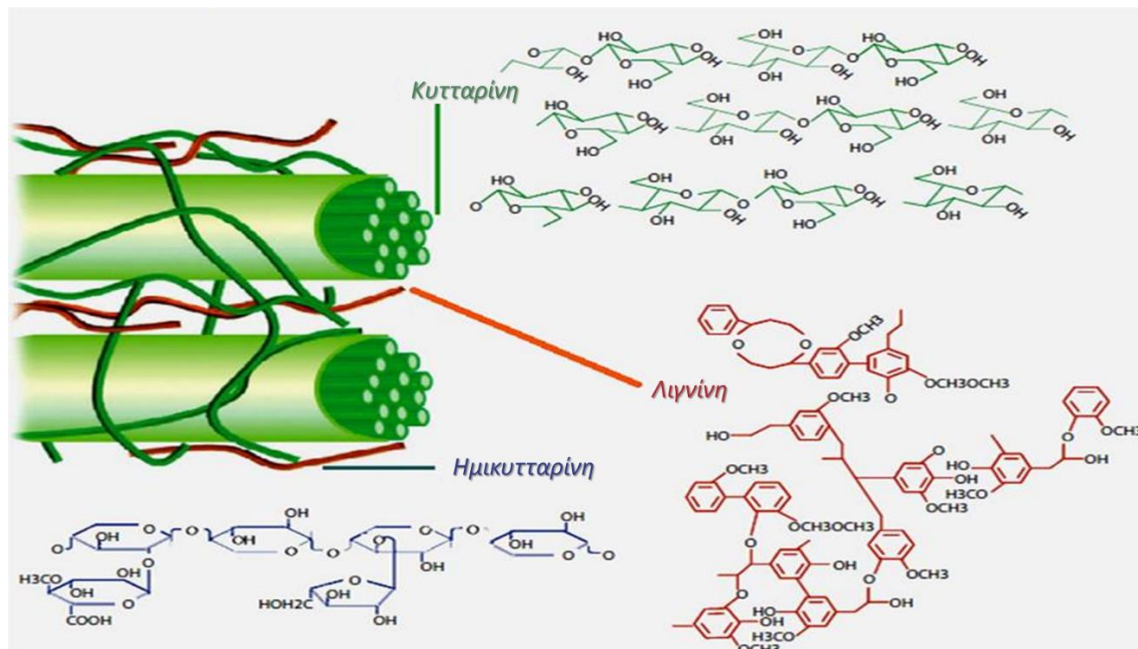
2.3.2.3 Βιομάζα πλούσια σε λιγνοκυτταρινούχες ενώσεις

Η βιοαιθανόλη που μπορεί να παραχθεί και από λιγνοκυτταρινούχες ενώσεις, είναι κοινώς γνωστή και ως βιοαιθανόλη 2^{ης} γενιάς. Οι πρώτες ύλες για τη βιοαιθανόλη 2^{ης} γενιάς περιλαμβάνουν γεωργικά υπολείμματα, χόρτα, και δασικά και υπολείμματα ξυλείας. Έχουν υπάρξει τεράστιες ερευνητικές προσπάθειες για την ανάπτυξη αποδοτικών τεχνολογιών δεύτερης γενιάς ή προηγμένων τεχνολογιών για παραγωγή καυσίμου αιθανόλης. Ωστόσο, υπάρχουν μερικές προκλήσεις για τις εμπορικές εφαρμογές των προηγμένων τεχνολογιών.

Η αναφερόμενη πρώτη ύλη αποτελείται κυρίως από κυτταρίνη, ημικυτταρίνη, λιγνίνη και εκχυλίσμες ουσίες. Η λιγνίνη λειτουργεί ως υλικό συγκόλλησης που δεσμεύει όλα τα άλλα συστατικά μαζί, ενώ παρέχει δομική ακαμψία της ύλης. Η κυτταρίνη είναι ένα πολυμερές επαναλαμβανόμενων μονάδων β-D-γλυκοπυρανόζης και αποτελεί κυρίαρχο συστατικό της λιγνοκυτταρινικής τροφοδοσίας. Η ημικυτταρίνη, όπως η κυτταρίνη, είναι ένας πολυσακχαρίτης αλλά είναι λιγότερο πολύπλοκος και πιο εύκολος στην υδρόλυση. Τα σάκχαρα που υπάρχουν στην κυτταρίνη είναι ως επί το πλείστον γλυκόζη. Ωστόσο, η ημικυτταρίνη είναι ένα μείγμα διαφορετικών τύπων σακχάρων. Η ημικυτταρίνη μπορεί να περιέχει τόσο εξόζες (γλυκόζη, μαννόζη και γαλακτόζη) όσο και πεντόζες (ξυλόζη, αραβινόζη και ραμνόζη).

Η χημική σύνθεση των λιγνοκυτταρινικών υλικών αποτελεί βασικό παράγοντα που επηρεάζει την αποδοτικότητα της παραγωγής βιοκαυσίμων κατά τις διεργασίες μετατροπής. Η δομική και χημική σύνθεση των λιγνοκυτταρινικών υλικών είναι πολύ μεταβλητή λόγω της γενετικής τους αλλά και των περιβαλλοντικών επιρροών και αλληλεπιδράσεων. Μια τυπική χημική σύνθεση των λιγνοκυτταρινικών υλικών είναι 48% κ.β. C, 6% κ.β. H, και 45% κ.β. O, ενώ η ανόργανη ύλη είναι ένα δευτερεύον συστατικό. Οι περιεκτικότητες κυτταρίνης και ημικυτταρίνης είναι υψηλότερες στο σκληρό ξύλο (78.8%) παρά στο

μαλακό ξύλο (70.3%), ενώ η λιγνίνη βρίσκεται σε υψηλότερα ποσοστά σε μαλακά ξύλα (29.2%), από τα σκληρά ξύλα (21.7%). Στο Σχήμα 7 φαίνεται η δομή της λιγνοκυτταρινικής βιομάζας αποτελούμενη κυρίως από κυτταρίνη, ημικυτταρίνη και λιγνίνη.



Σχήμα 7: Τα βασικά συστατικά της βιομάζας και η δομή της κυτταρίνης, ημικυτταρίνης και λιγνίνης [100].

2.3.3 Στάδια παραγωγής βιοαιθανόλης 2^{ης} γενιάς

Η διαδικασία παραγωγής βιοαιθανόλης ποικίλει ανάλογα τις χρησιμοποιούμενες πρώτες ύλες. Η παραγωγή της συνήθως πραγματοποιείται σε 4 κύρια στάδια [68, p. 1268]:

1. Προκατεργασία της πρώτης ύλης.
2. Υδρόλυση για την μετατροπή της κυτταρίνης, ημικυτταρίνης και αμύλου σε ζυμώσιμα σάκχαρα.
3. Μετατροπή των σακχάρων σε αιθανόλη με ζύμωση
4. Διαχωρισμός αιθανόλης και απόσταξη.

Παρακάτω, περιγράφεται αναλυτικά κάθε ένα από αυτά τα 4 στάδια.

2.3.3.1 Μέθοδοι προ-επεξεργασίας

Το πρώτο βήμα στην βιομετατροπή της λιγνοκυτταρινικής ύλης σε βιοαιθανόλη αποτελεί η μείωση του μεγέθους της πρώτης ύλης και η προκατεργασία της. Ο συνδυασμός οποιασδήποτε τεχνολογίας προ-επεξεργασίας είναι να μεταβάλλει ή να απομακρύνει τα κατασκευαστικά και συνθετικά εμπόδια της ύλης, προκειμένου να βελτιωθεί η ταχύτητα της ενζυμικής υδρόλυσης και να αυξηθούν οι αποδόσεις των ζυμώσιμων σακχάρων από την κυτταρίνη και την ημικυτταρίνη. Η προκατεργασία είναι ένα σημαντικό εργαλείο για τις πρακτικές διαδικασίες μετατροπής κυτταρίνης. Μια επιτυχημένη προ-επεξεργασία πρέπει να πληροί τις ακόλουθες απαιτήσεις [101, p. 558]:

1. Να μπορεί να βελτιώσει την μορφή των σακχάρων ή την ικανότητα να σχηματίζονται σάκχαρα έπειτα από υδρόλυση.
2. Να δρα με στόχο την αποφυγή αποικοδόμησης και απώλειας υδατανθράκων.
3. Να μην οδηγεί στον σχηματισμό παρεμποδιστικών παραπροϊόντων που μπορούν να δράσουν αρνητικά στις επακόλουθες διεργασίες υδρόλυσης και ζύμωσης.
4. Να είναι οικονομικά αποδοτική.

Το στάδιο προ-επεξεργασίας προάγει τη φυσική διάσπαση της λιγνοκυτταρινικής μήτρας για να διευκολύνει την υδρόλυση που καταλύεται από οξύ, βάση ή ένζυμο. Οι διάφορες προ-επεξεργασίες μπορούν να έχουν σημαντικές επιπτώσεις στη διαμόρφωση και την αποτελεσματικότητα της υπόλοιπης διαδικασίας και, τελικά, και στην οικονομία. Για το λόγο αυτό έχει αναπτυχθεί μία σειρά φυσικών και χημικών μεθόδων προκατεργασίας της λιγνοκυτταρινικής πρώτης ύλης [101, p. 558].

2.3.3.1.1 Φυσικές μέθοδοι

Μηχανική προ-επεξεργασία

Ο στόχος της μηχανικής προ-επεξεργασίας είναι η μείωση του μεγέθους των σωματιδίων και της κρυσταλλικότητας του λιγνοκυτταρινικού περιεχομένου προκειμένου να αυξηθεί η ειδική επιφάνεια και να μειωθεί ο βαθμός πολυμερισμού. Αυτό μπορεί να επιτευχθεί με ένα συνδυασμό θρυμματισμού, λείανσης ή άλεσης ανάλογα με το τελικό μέγεθος σωματιδίων του υλικού (10-30mm μετά από θραύση και 0,2-2mm μετά από άλεση). Διαφορετικές διεργασίες άλεσης μπορούν να χρησιμοποιηθούν για την βελτίωση της ενζυμικής υδρόλυσης των λιγνοκυτταρινικών υλικών, όπως άλεση με σφαίρα, άλεση δύο κυλίνδρων, κολλοειδής άλεση και άλεση με δονητική ενέργεια. Η απαίτηση ισχύος αυτής της προ-

επεξεργασίας είναι σχετικά υψηλή, ανάλογα με το τελικό μέγεθος σωματιδίων και τα χαρακτηριστικά βιομάζας. Λαμβάνοντας υπόψη τις υψηλές ενεργειακές απαιτήσεις της άλεσης και τη συνεχή άνοδο των τιμών της ενέργειας, είναι πιθανό αυτή η διαδικασία να μην είναι οικονομικά εφικτή [102, p. 4854].

Μηχανική εκβολή

Η διαδικασία εξώθησης είναι μια νέα και πολλά υποσχόμενη μέθοδος φυσικής προεπεξεργασίας για τη μετατροπή της βιομάζας και την παραγωγή αιθανόλης. Στην εξώθηση, τα υλικά υποβάλλονται σε θέρμανση, ανάμιξη και διάτμηση, με αποτέλεσμα διάφορες φυσικές και χημικές μεταβολές να συμβαίνουν όταν η ύλη διαπερνά τον εξωθητήρα. Η ταχύτητα του κοχλία και η θερμοκρασία του κυλίνδρου πιστεύεται ότι διαταράσσουν τη λιγνοκυτταρινική δομή προκαλώντας απινίδωση, μαρμαρυγή και σύμπτυξη των ινών, και, τελικά, μείωση της αντίστασης των υδατανθράκων σε ενζυμική επίθεση. Διαφορετικές παράμετροι του βιο-αντιδραστήρα πρέπει να ληφθούν υπόψη για την επίτευξη της υψηλότερης απόδοσης σε αυτή τη διαδικασία. Σε πρόσφατες μελέτες, η εφαρμογή των ενζύμων κατά τη διαδικασία της εξώθησης θεωρείται ως μια πολλά υποσχόμενη τεχνολογία για την παραγωγή αιθανόλης [102, p. 4854].

2.3.3.1.2 Χημικές μέθοδοι

Αλκαλική προκατεργασία

Η βάση αυτής της μεθόδου σχετίζεται με την επίδραση που έχουν ορισμένες βάσεις στην λιγνοκυτταρινική βιομάζα, οι οποίες είναι αποτελεσματικές ανάλογα το περιεχόμενο της βιομάζας σε λιγνίνη. Η αλκαλική προκατεργασία αυξάνει την ικανότητα πέψης της κυτταρίνης, ενώ επιδρά θετικά στην διαλυτοποίηση της λιγνίνης και σε πολύ μικρότερο βαθμό και στην διαλυτοποίηση της κυτταρίνης και της ημικυτταρίνης, συγκριτικά με την όξινη προκατεργασία.

Η αλκαλική προκατεργασία μπορεί να λάβει χώρα σε συνθήκες περιβάλλοντος και ο χρόνος της διεργασίας κυμαίνεται από δευτερόλεπτα έως και μέρες. Μελέτες έχουν δείξει πως η αλκαλική προκατεργασία αποικοδομεί τα σάκχαρα σε μικρότερο βαθμό συγκριτικά με την όξινη προκατεργασία και η χρήση της ενδείκνυται περισσότερο για γεωργικά υπολείμματα παρά υλικά από ξύλο [103]. Παρόλα αυτά, προκειμένου να ρυθμιστούν σωστά οι συνθήκες προκατεργασίας, θα πρέπει να ληφθούν υπόψη πιθανές απώλειες ζυμώσιμων σακχάρων και παραγωγή ανασταλτικών ενώσεων των μετέπειτα διεργασιών υδρόλυσης και ζύμωσης [102, p. 4854].

Τα υδροξείδια νατρίου, καλίου, ασβεστίου και αμμωνίου είναι κατάλληλες αλκαλικές προ-επεξεργασίες. Το NaOH προκαλεί διόγκωση, αυξάνοντας την εσωτερική επιφάνεια της κυτταρίνης, ενώ μειώνει το βαθμό πολυμερισμού και κρυσταλλικότητας, το οποίο προκαλεί διαταραχή της δομής της λιγνίνης. Έχει αναφερθεί πως το NaOH ευθύνεται για την αύξηση της ικανότητας χώνευσης του σκληρού ξύλου από 14% έως 55% μειώνοντας την περιεκτικότητα της λιγνίνης από 24-55% σε 20% [102, p. 4854].

Η προσθήκη ενός οξειδωτικού παράγοντα (οξυγόνο/H₂O₂) σε αλκαλική προ-επεξεργασία (NaOH/CaOH₂) μπορεί να βελτιώσει την απόδοση ευνοώντας την απομάκρυνση της λιγνίνης [104]. Αποδόσεις αιθανόλης 0.23 g ανά g πρώτης ύλης έχουν ληφθεί με ταυτόχρονη σακχαροποίηση και ζύμωση (SSCF) με *Escherichia coli* FBR5 από σιτάρι προ-επεξεργασμένο με υπεροξείδιο του υδρογόνου. Αξίζει να σημειωθεί πως δεν έχει ανιχνευτεί φουρφουράλη ή υδροξυμεθυλφουρφουράλη (Hydroxymethylfurfural, HMF) σε προϊόντα υδρόλυσης που λαμβάνονται με προ-επεξεργασία με αλκαλικό υπεροξείδιο το οποίο ευνοεί το στάδιο της ζύμωσης σε μια διαδικασία παραγωγής αιθανόλης [105].

Όξινη προκατεργασία

Ο κύριος στόχος των όξινων προκατεργασιών είναι η διαλυτοποίηση του ημικυτταρινικού κλάσματος της βιομάζας και η παραγωγή κυτταρίνης, πιο προσιτής στα ένζυμα. Αυτός ο τύπος προκατεργασίας μπορεί να πραγματοποιηθεί είτε με πυκνό, είτε με αραιό οξύ, αν και η χρήση συμπυκνωμένου οξέος είναι λιγότερο ελκυστική για την παραγωγή αιθανόλης λόγω του σχηματισμού ανασταλτικών ενώσεων. Επιπλέον, τα προβλήματα διάβρωσης του εξοπλισμού και η ανάκτηση οξέος είναι ένα σημαντικό μειονεκτήματα όταν γίνεται χρήση οξέων υψηλής συγκέντρωσης. Το υψηλό λειτουργικό κόστος και τα έξοδα συντήρησης μειώνουν το ενδιαφέρον της εφαρμογής των πυκνών οξέων. Αντίθετα, η προ-επεξεργασία της βιομάζας με αραιό οξύ φαίνεται να είναι μία πιο ευνοϊκή μέθοδος για βιομηχανικές εφαρμογές και έχει μελετηθεί σε λιγνοκυτταρινικές βιομάζες ευρείας κλίμακας [102, p. 4855].

Η όξινη προκατεργασία μπορεί να λάβει χώρα σε υψηλή θερμοκρασία (για παράδειγμα 180 °C) για μικρό χρονικό διάστημα, ή μπορεί να διαρκέσει πολύ περισσότερο (30-90 λεπτά) σε χαμηλότερη θερμοκρασία (για παράδειγμα 120 °C). Η μέθοδος αυτή παρουσιάζει το πλεονέκτημα της διαλυτοποίησης της ημικυτταρίνης, κυρίως της ξυλάνης, καθώς επίσης και της μετατροπής της διαλυτοποιημένης ημικυτταρίνης σε ζυμώσιμα σάκχαρα. Ωστόσο, πρέπει να σημειωθεί πως ανάλογα με την θερμοκρασία της διεργασίας, παράγονται ανασταλτικές ενώσεις όπως φουρφουράλη, HMF και

ενώσεις αποικοδόμησης αρωματικής λιγνίνης οι οποίες επιδρούν αρνητικά στον μεταβολισμό των μικροοργανισμών στο στάδιο της ζύμωσης [102, p. 4855].

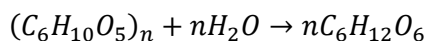
Μελέτες δείχνουν πως το πιο διαδεδομένο οξύ που μπορεί να χρησιμοποιηθεί σε όξινη προκατεργασία βιομάζας είναι το H_2SO_4 , αποδίδοντας πολύ υψηλές αποδόσεις υδρόλυσης. Για την ίδια διαδικασία έχουν επίσης ελεγχθεί και οξέα όπως το υδροχλωρικό, το φωσφορικό και το νιτρικό οξύ. Σε μία μελέτη, βρέθηκε πως μετά από όξινη υδρόλυση άχυρου σιταριού με χρήση H_2SO_4 στους 121 °C για 1 ώρα, η απόδοση σακχαροποίησης έφτασε το 74% [106]. Πρόσφατη έρευνα δείχνει πως μπορεί να επιτευχθεί απόδοση αιθανόλης μετά από ζύμωση φλούδας μήλων που αγγίζει το 0,47g/g γλυκόζης αν η ύλη περάσει αρχικά από όξινη προκατεργασία με χρήση αραιωμένου θειικού οξέος για 15 λεπτά στους 121 °C [107].

Οζονόλυση

Το όζον είναι ένα ισχυρό οξειδωτικό που εμφανίζει υψηλή αποδοτικότητα στην απομάκρυνση λιγνίνης. Αυτή η απομάκρυνση της λιγνίνης αυξάνει την απόδοση στην επακόλουθη ενζυμική υδρόλυση. Η προ-επεξεργασία πραγματοποιείται συνήθως σε θερμοκρασία δωματίου και κανονική πίεση και δεν οδηγεί στο σχηματισμό ανασταλτικών ενώσεων που μπορούν να επηρεάσουν την επακόλουθη υδρόλυση και ζύμωση. Η οζονόλυση εφαρμόζεται σε διάφορα γεωργικά απόβλητα όπως του άχυρου σιταριού και του άχυρου σίκαλης, αυξάνοντας, και στις δυο περιπτώσεις, την απόδοση της μετέπειτα ενζυμικής υδρόλυσης. Παρά τα ελκυστικά αποτελέσματα που έχουν προέλθει από διάφορες μετρήσεις, πρέπει να διεξαχθούν περισσότερες έρευνες σχετικά με την χρήση της οζονόλυσης ως αποτελεσματική μέθοδο προκατεργασίας λιγνοκυτταρινικών υλικών. Ένα σημαντικό μειονέκτημα που πρέπει να ληφθεί υπόψη είναι οι σημαντικές ποσότητες όζοντος που απαιτούνται, πράγμα που μπορεί να καταστήσει τη συνολική διαδικασία οικονομικά μη βιώσιμη [102, p. 4855].

2.3.3.2 Υδρόλυση

Μετά την λήξη της προκατεργασίας της βιομάζας, η περιεχόμενη κυτταρίνη στην ύλη οδηγείται στη διεργασία της υδρόλυσης, δηλαδή τη διάσπαση κάθε μορίου με την προσθήκη μορίων νερού, σύμφωνα με την παρακάτω αντίδραση:



Η αντίδραση αυτή καταλύεται με πυκνό ή αραιό οξύ, αλλά κυρίως επικρατεί η χρήση ενζύμων (ενζυμική υδρόλυση), καθώς σε ήπιες καταστάσεις (pH=4.8 και θερμοκρασία 45-50 °C) είναι δυνατή η επίτευξη υψηλών αποδόσεων. Ένα ακόμη πλεονέκτημα της χρήσης ενζύμων αφορά το κόστος συντήρησης, το οποίο είναι χαμηλότερο συγκριτικά με τις άλλες μεθόδους καθώς δεν αντιμετωπίζονται διαβρωτικά προβλήματα. Η απόδοση της υδρόλυσης χωρίς προκατεργασία της ύλης τυπικά φτάνει το 20%, ενώ με προκατεργασία συνήθως ξεπερνά το 90%.

Τα τελευταία χρόνια έχουν αναπτυχθεί διάφορες διαδικασίες υδρόλυσης της κυτταρίνης για παραγωγή γλυκόζης. Η συντριπτική πλειοψηφία των διεργασιών χρησιμοποιεί είτε κυτταρινολυτικά ένζυμα είτε θειικό οξύ σε ποικίλες συγκεντρώσεις. Ιστορικά, τα ένζυμα ήταν υπερβολικά δαπανηρά για την οικονομική παραγωγή βιοαιθανόλης από βιομάζα, ενώ το θειικό οξύ είναι λιγότερο δαπανηρό από τα ένζυμα, αν και το κόστος διάθεσης που συνδέεται με τη χρήση θειικού οξέος αυξάνει σημαντικά το συνολικό του κόστος. Ωστόσο, το μεγαλύτερο μειονέκτημα στη χρήση θειικού οξέος είναι ότι υποβαθμίζει τη γλυκόζη στις υψηλές θερμοκρασίες που απαιτούνται για την υδρόλυση της κυτταρίνης [101].

2.3.3.2.1 Όξινη υδρόλυση

Η όξινα καταλύομενη υδρόλυση της κυτταρίνης αποτελεί μια πολύπλοκη ετερογενή αντίδραση. Η απόδοσή της σχετίζεται άμεσα με φυσικούς παράγοντες της ύλης όπως επίσης και με τις υδρολυτικές χημικές αντιδράσεις. Τα προϊόντα μονοσακχαριτών που παράγονται με την όξινη υδρόλυση μπορεί να αποικοδομηθούν περαιτέρω σε ανεπιθύμητα χημικά προϊόντα. Ο βαθμός στον οποίο συμβαίνουν αυτές οι παράπλευρες αντιδράσεις εξαρτάται κυρίως από την σύνθεση της ύλης. Το κύριο πλεονέκτημα της όξινης υδρόλυσης είναι ότι τα οξέα μπορούν να διεισδύσουν στην λιγνίνη χωρίς οποιαδήποτε προκατεργασία της βιομάζας, διαλύοντας έτσι τα πολυμερή κυτταρίνης και ημικυτταρίνης για να σχηματίσουν μεμονωμένα μόρια σακχάρου. Μπορούν να χρησιμοποιηθούν διάφοροι τύποι οξέων, πυκνά ή αραιά, όπως θειικό, υδροχλωρικό, υδροφθορικό, φωσφορικό, νιτρικό και μυρμηκικό οξύ. Τα θειικά και τα υδροχλωρικά οξέα είναι οι πιο συχνά χρησιμοποιούμενοι καταλύτες για την όξινη υδρόλυση της λιγνοκυτταρινικής βιομάζας [108]. Οι όξινες υδρολύσεις μπορούν να ταξινομηθούν σε δύο κατηγορίες ανάλογα την φύση του καταλύτη:

Υδρόλυση με πυκνό οξύ

Η διεργασία αυτή παρέχει ταχεία μετατροπή της κυτταρίνης σε γλυκόζη και της ημικυτταρίνης σε διάφορες πεντόζες με μικρή υποβάθμισή τους. Η βελτιστοποίηση των σακχάρων που ανακτώνται, καθώς επίσης και η αποδοτική ανακύκλωση του οξέος που χρησιμοποιείται αποτελούν κρίσιμους παράγοντες που καθορίζουν την οικονομική βιωσιμότητα της συνολικής διεργασίας. Η υδρόλυση με παροχή πυκνού οξέος λαμβάνει χώρα σχετικά σε ήπιες θερμοκρασίες και το μόνο πρόβλημα που υπάρχει είναι η μεταφορά της υγρής φάσης. Όσον αφορά τις ταχύτητες αντίδρασης, αυτές φαίνεται να είναι πολύ μεγαλύτερες από εκείνες που προκύπτουν από τη χρήση αραιού οξέος. Για την διεξαγωγή της υδρόλυσης, συνήθως χρησιμοποιείται θειικό οξύ 70% στους 40-50 °C για 2-4 ώρες παραμονής στον αντιδραστήρα. Οι χαμηλές συνθήκες πίεσης και θερμοκρασίας βοηθούν στην ελαχιστοποίηση αποικοδόμησης των σακχάρων. Η υδρολυμένη μάζα στη συνέχεια πλένεται για να ανακτηθούν τα σάκχαρα. Η μέθοδος της χρήσης πυκνού θειικού ή υδροχλωρικού οξέος είναι μια δύσκολη διαδικασία, η οποία για να μπορεί να θεωρηθεί οικονομικά αποδοτική θα πρέπει το σύνολο του οξέος να ανακτάται πλήρως [101].

Υδρόλυση με αραιό οξύ

Η υδρόλυση με αραιωμένο οξύ αποτελεί την παλαιότερη τεχνολογία μετατροπής της βιομάζας σε βιοαιθανόλη. Στη διεργασία αυτή, το κλάσμα της ημικυτταρίνης αποπολυμερίζεται σε χαμηλότερες θερμοκρασίες από ότι το κλάσμα της κυτταρίνης. Το αραιωμένο θειικό οξύ αναμειγνύεται με τη βιομάζα ώστε να υδρολύσει την ημικυτταρίνη σε ξυλόζη και άλλα σάκχαρα. Η διαδικασία αραιού οξέος περιλαμβάνει διάλυμα περίπου 1% συγκέντρωσης θειικού οξέος σε αντιδραστήρα συνεχούς ροής σε μια υψηλή θερμοκρασία (περίπου 215 °C). Οι διαδικασίες χρήσης αραιού οξέος περιορίζονται σε απόδοση ανάκτησης σακχάρων περίπου 50%. Η κύρια πρόκληση για το αραιό οξύ στις διαδικασίες υδρόλυσης είναι πώς να αυξήσουν τις αποδόσεις γλυκόζης σε εκείνες που ξεπερνούν το 70% σε μια οικονομικά βιώσιμη βιομηχανική διαδικασία, διατηρώντας παράλληλα ένα υψηλό ποσοστό υδρόλυσης κυτταρίνης και ελαχιστοποιώντας την αποσύνθεση της γλυκόζης.

Η αραιή όξινη υδρόλυση λαμβάνει χώρα σε δύο στάδια, αξιοποιώντας τις διαφορές μεταξύ της ημικυτταρίνης και της κυτταρίνης. Το πρώτο στάδιο εκτελείται σε χαμηλές θερμοκρασίες, μεγιστοποιώντας την απόδοση από την ημικυτταρίνη, και το δεύτερο, το στάδιο υψηλότερης θερμοκρασίας, βελτιστοποιείται για την υδρόλυση του τμήματος της κυτταρίνης. Το πρώτο στάδιο

διεξάγεται υπό ήπιες συνθήκες διεργασίας για την ανάκτηση των πεντόζων, ενώ το δεύτερο στάδιο διεξάγεται κάτω από σκληρότερες συνθήκες για την ανάκτηση των εξόζων.

Το μεγαλύτερο πλεονέκτημα των διαδικασιών με αραιό οξύ είναι ο γρήγορος ρυθμός αντίδρασης, που διευκολύνει τη συνεχή επεξεργασία. Το μεγαλύτερο μειονέκτημά τους είναι η χαμηλή απόδοση σε σάκχαρα. Για ταχείες συνεχείς διαδικασίες, προκειμένου να καταστεί επαρκής η διείδυση των οξέων, οι πρώτες ύλες πρέπει επίσης να μειωθούν σε μέγεθος μέχρι η μέγιστη διάσταση των σωματιδίων να βρίσκεται στην περιοχή μόλις λίγων χιλιοστών [101].

2.3.3.2 Ενζυμική υδρόλυση

Μια άλλη βασική μέθοδος υδρόλυσης είναι ενζυμική υδρόλυση. Τα ένζυμα είναι φυσικές φυτικές πρωτεΐνες που προκαλούν ορισμένες χημικές αντιδράσεις. Υπάρχουν δύο τεχνολογικές εξελίξεις: Οι μέθοδοι ενζυμικής μετατροπής και οι μέθοδοι άμεσης μικροβιακής μετατροπής.

Η ενζυμική υδρόλυση φυσικών λιγνοκυτταρινικών υλικών είναι μια πολύ αργή διαδικασία, καθώς η υδρόλυση κυτταρίνης εμποδίζεται από δομικές παραμέτρους του υποστρώματος, όπως την περιεκτικότητα σε λιγνίνη και ημικυτταρίνη, την επιφάνεια, και την κρυσταλλικότητα κυτταρίνης. Καθώς η ενζυμική υδρόλυση της φυσικής λιγνοκυτταρίνης συνήθως έχει ως αποτέλεσμα τη διαλυτοποίηση του 20% της αρχικής, υπάρχουσας γλυκάνης, κάποια μορφή προ-επεξεργασίας, για την αύξηση της ευπάθειας στην ενζυμική υδρόλυση, περιλαμβάνεται στις περισσότερες διαδικασίες βιολογικής μετατροπής της λιγνοκυτταρίνης.

Το κόστος χρήσης της ενζυμικής υδρόλυσης είναι χαμηλό σε σύγκριση με την όξινη υδρόλυση επειδή η ενζυμική υδρόλυση διεξάγεται συνήθως σε ήπιες συνθήκες ($\text{pH} \approx 4,8$ και θερμοκρασία $45\text{-}50^\circ\text{C}$) και δεν οδηγεί σε προβλήματα διάβρωσης. Η ενζυμική υδρόλυση είναι ελκυστική διότι παράγει καλύτερες αποδόσεις από ό,τι η καταλυόμενη με οξύ υδρόλυση και οι κατασκευαστές ενζύμων έχουν πρόσφατα μειώσει το κόστος χρησιμοποιώντας ουσιαστικά μεθόδους σύγχρονης βιοτεχνολογίας [101, p. 563].

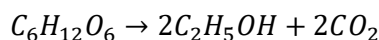
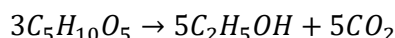
Η ενζυμική υδρόλυση της κυτταρίνης διεξάγεται από ένζυμα κυτταρινασών τα οποία είναι ιδιαίτερα εξειδικευμένα. Τα προϊόντα της υδρόλυσης είναι συνήθως αναγωγικά σάκχαρα συμπεριλαμβανομένης της γλυκόζης. Το ένζυμο κυτταρινάση είναι στην ουσία ένα σύνθετο σύστημα ενζύμων που δρουν συνεργιστικά για να αποικοδομήσουν την κυτταρίνη. Υπάρχουν τρεις διαφορετικές ενζυμικές δράσεις που συμμετέχουν στην υδρόλυση της κυτταρίνης [109, p. 44]:

- Οι ενδο-1,4-β-γλουκανάσες, οι οποίες υδρολύουν τυχαία εσωτερικούς 1,4-β-D-γλυκοζιτικούς δεσμούς της κυτταρίνης.
- Οι έξω-1,4-β-D-γλουκανάσες, οι οποίες απελευθερώνουν μόρια κελλοβιόζης από τα άκρα της κυτταρίνης.
- Οι β-γλυκοζιδάσες, οι οποίες δρουν απελευθερώνοντας D-γλυκόζη από την κελλοβιόζη.

Αρχικά, η ενδο-γλουκανάση δρα τυχαία στις άμορφες περιοχές της κυτταρινικής αλυσίδας, δημιουργώντας νέα «ελεύθερα άκρα», όπου μπορεί να δράσει η εξω-γλουκανάση, απελευθερώνοντας μόρια κελλοβιόζης. Η κελλοβιόζη τελικά υδρολύεται σε γλυκόζη με την δράση της β-γλυκοζιδάσης. Η δράση της β-γλυκοζιδάσης είναι πολύ σημαντική, καθώς η κελλοβιόζη είναι πολύ ισχυρότερος παρεμποδιστής της εξω-γλουκανάσης από την γλυκόζη. Η συσσώρευση της κελλοβιόζης μπορεί να επηρεάσει αρνητικά τη συνολική υδρολυτική απόδοση του συστήματος των κυτταρινασών.

2.3.3.3 Ζύμωση

Το προϊόν της παραπάνω διεργασίας υδρόλυσης στη συνέχεια χρησιμοποιείται για ζύμωση από μικροοργανισμούς όπως ζυμομύκητες. Η υδρολυμένη λιγνοκυτταρινική βιομάζα δεν περιέχει μόνο σάκχαρα γλυκόζης, αλλά αποτελείται και από σάκχαρα όπως ξυλόζη, μαννόζη, γαλακτόζη, αραβινόζη καθώς και διάφορους ολιγοσακχαρίτες. Επομένως, πρέπει να επιλέγονται μικροοργανισμοί, που απαιτούνται για την αποτελεσματική ζύμωση αυτών των σακχάρων σε βιοαιθανόλη. Σύμφωνα με τις παρακάτω αντιδράσεις, η θεωρητική μέγιστη απόδοση φτάνει τα 0.51kg βιοαιθανόλης και 0.49kg διοξείδιο του άνθρακα ανά kg ξυλόζης και γλυκόζης:



Η ζύμωση περιλαμβάνει μικροοργανισμούς που χρησιμοποιούν τα ζυμώσιμα σάκχαρα ως τροφή και παράγουν αιθυλική αλκοόλη και άλλα υποπροϊόντα. Αυτοί οι μικροοργανισμοί μπορούν τυπικά να χρησιμοποιήσουν τα σάκχαρα 6 ατόμων άνθρακα (εξόζες), από τα οποία το πιο κοινό είναι η γλυκόζη. Ως εκ τούτου, κυτταρινική βιομάζα που περιέχει υψηλά επίπεδα γλυκόζης ή πρόδρομων ουσιών της γλυκόζης αποτελεί την ευκολότερη δίοδο για παραγωγή βιοαιθανόλης. Οι μικροοργανισμοί αυτοί, σήμερα, μετατρέπουν μια ανεπαρκή μερίδα των σακχάρων από τη βιομάζα σε βιοαιθανόλη. Υπάρχουν ορισμένοι μικροοργανισμοί που παράγουν σημαντικές ποσότητες (μεγαλύτερες από 1% w/v) βιοαιθανόλης [101, p. 566].

Μικροοργανισμοί που ζυμώνουν την ξυλόζη σε βιοαιθανόλη είναι συνήθως βακτήρια, μύκητες και νηματοειδείς μύκητες. Σήμερα, στα βακτήρια ζύμωσης της ξυλόζης περιλαμβάνονται τόσο φυσικά όσο και γενετικά κατασκευασμένοι μικροοργανισμοί, και πολλοί έχουν χαρακτηριστικά χρήσιμα για ταυτόχρονη σακχαροποίηση (υδρόλυση) και ζύμωση. Μία από τις πιο αποτελεσματικές ζύμες βιοαιθανόλης, ο σακχαρομύκητας *Saccharomyces cerevisiae*, έχει πολλά πλεονεκτήματα λόγω της υψηλής παραγωγής βιοαιθανόλης από τις εξόζες (κυρίως γλυκόζη) και υψηλή ανοχή σε παρεμποδιστικές ενώσεις. Ωστόσο, καθώς ο αυτός ο μύκητας δεν έχει την δυνατότητα να αξιοποιήσει τις πεντόζες όπως την ξυλόζη και την αραβινόζη, και έτσι η παραγωγή βιοαιθανόλης από λιγνοκυτταρινική βιομάζα δεν είναι συχνά επαρκής.

Τα αιθανολογενή βακτήρια που υπόσχονται τις μεγαλύτερες αποδόσεις και μπορούν να χρησιμοποιηθούν για βιομηχανική αξιοποίηση βιομάζας είναι το *Escherichia coli*, το *Klebsiella oxytoca* και το *Zygomonas mobilis*. Το τελευταίο είναι γνωστό για την ικανότητά του να παράγει βιοαιθανόλη ταχέως και αποτελεσματικά από πρώτες ύλες με βάση τη γλυκόζη, ενώ συγκριτικές δοκιμές απόδοσης δείχνουν ότι ο *Z. mobilis* μπορεί να επιτύχει μέχρι και 5% υψηλότερες αποδόσεις και μέχρι πέντε φορές υψηλότερη ογκομετρική παραγωγικότητα σε σύγκριση με την παραδοσιακή ζύμωση. Ο *Z. mobilis* έχει αποδείξει ότι μπορεί να παράγει βιοαιθανόλη με απόδοση μέχρι και 97% της θεωρητικής, με συγκέντρωση βιοαιθανόλης μέχρι και 12% w/v σε ζύμωση γλυκόζης. Το βακτήριο *Z. mobilis* παράγει αποτελεσματικά βιοαιθανόλη από εξόζες όπως η γλυκόζη και η φρουκτόζη αλλά αδυνατεί να αξιοποιήσει τις πεντόζες.

Οι ζυμομύκητες ζύμωσης φυσικής ξυλόζης, όπως ο *Pichia stipitis*, ο *Candida shehatae* και ο *Candida parapsilosis*, μπορούν να μεταβολίσουν την ξυλόζη μέσω της δράσης της αναγωγάσης ξυλόζης (xylose reductase, XR), η οποία μετατρέπει την ξυλόζη σε ξυλιτόλη και έπειτα με την αφυδρογονάση της ξυλιτόλης (XDH) αυτή μετατρέπεται σε ξυλουλόζη. Ως εκ τούτου, η ζύμωση βιοαιθανόλης από ξυλόζη μπορεί να πραγματοποιηθεί με συνδιασμένο *S. cerevisiae* που φέρει ετερόλογο XR και XDH από *P. stipitis* και ξυλουλοκινάση (XK) από το *S. cerevisiae* [101, p. 567].

2.3.3.4 Απόσταξη

Η παραλαβή της βιοαιθανόλης δεν σταματά με την ολοκλήρωση της ζύμωσης, αλλά απαιτεί τον διαχωρισμό της από την ύλη και τον καθαρισμό της από το νερό. Η διαδικασία αυτή γίνεται μέσω της κλασματικής απόσταξης. Κλασματική απόσταξη ή απλώς απόσταξη καλείται η διεργασία διαχωρισμού ενός μίγματος στα συστατικά του με βάση τη διαφορετική πτητικότητά τους. Ο διαχωρισμός

πραγματοποιείται σε στήλη επαφής ατμών-υγρού, όπου οι ατμοί ανερχόμενοι έρχονται σε καλή επαφή με το υγρό που κατέρχεται και επιτυγχάνεται καλή προσέγγιση ισορροπίας μεταξύ των δύο φάσεων σε όλο το ύψος της στήλης. Αυτή η διαδικασία συνίσταται απλώς στο βρασμό του μείγματος αιθανόλης-νερού. Επειδή το σημείο βρασμού του νερού (100 °C) είναι υψηλότερο από το σημείο βρασμού αιθανόλης (78.3 °C), η αιθανόλη θα μετατραπεί σε ατμό πριν από το νερό. Έτσι, το νερό μπορεί να διαχωριστεί μέσω μιας διαδικασίας συμπύκνωσης και το απόσταγμα αιθανόλης να ανακτηθεί σε συγκέντρωση 95-96%, ποσοστό το οποίο περιορίζεται από το σχηματισμό αζεότροπου αιθανόλης-νερού με χαμηλό σημείο ζέσης. Τυπικά, οι περισσότερες βιομηχανίες μεγάλης κλίμακας και οι βιοτεχνίες χρησιμοποιούν ένα σύστημα συνεχούς απόσταξης. Τα υγρά μείγματα θερμαίνονται και αφήνονται να ρέουν συνεχώς καθ' όλη τη στήλη. Στην κορυφή της στήλης, τα πτητικά διαχωρίζονται ως απόσταγμα, ενώ το υπόλειμμα ανακτάται στον πυθμένα της στήλης [110].

3 Πειραματικό Μέρος

Στο κεφάλαιο αυτό περιγράφονται αναλυτικά η πειραματική διαδικασία που ακολουθήθηκε, οι πρώτες ύλες και η προετοιμασία τους καθώς και οι μέθοδοι ανάλυσης με τις οποίες έγιναν διάφοροι φυσικοχημικοί χαρακτηρισμοί των δειγμάτων σε κάθε πειραματικό στάδιο. Στόχος της πειραματικής διαδικασίας είναι η παραγωγή βιοαιθανόλης από μίγματα εξαντλημένων κόκκων καφέ και εξαντλημένων σπόρων κριθαριού.

3.1 Πειραματική διάταξη

Οι πειραματικές διατάξεις που χρησιμοποιήθηκαν για την προετοιμασία των δειγμάτων SCG και BSG, καθώς και των μιγμάτων τους χωρίζονται σε 2 είδη, μικρής και μεσαίας εργαστηριακής κλίμακας.

Η πειραματική διάταξη μεσαίας κλίμακας απαρτίζεται από 2 αντιδραστήρες διαλείποντος έργου (batch reactors), ενωμένους σε σειρά, με αναδευτήρα, φιλτροσακούλα διαχωρισμού στερεής και υγρής φάσης και ένα σύστημα θέρμανσης με ανακυκλοφορία ρεύματος θερμού νερού. Η απαιτούμενη τάση για θέρμανση του αντιδραστήρα και ανάδευση του περιεχομένου παρέχεται μέσω ηλεκτρικού κυκλώματος. Η πειραματική διάταξη φαίνεται στην παρακάτω Εικόνα 4.



Εικόνα 4: Πειραματική διάταξη για την προετοιμασία των δειγμάτων SCG και BSG.

Όσον αφορά τα πειράματα σε μικρή εργαστηριακή κλίμακα, για την διεξαγωγή όλων των σταδίων επεξεργασίας της ύλης χρησιμοποιήθηκαν γυάλινα μπουκαλάκια των 100, 250 και 500 mL. Για τη θέρμανση και την ανάδευσή τους είναι υπεύθυνο το ανακινούμενο υδατόλουτρο (IKA KS 3000i control) όπως φαίνεται στην παρακάτω εικόνα:



Εικόνα 5: Ανακινούμενο υδατόλουτρο (IKA KS 3000i control).

3.1.1 Περιγραφή πειραματικής διάταξης μεσαίας κλίμακας

Στην πειραματική διάταξη μεσαίας κλίμακας, ο κάθε αντιδραστήρας είναι ένα κυλινδρικό δοχείο όγκου 5 λίτρων. Τόσο το δοχείο όσο και το καπάκι του είναι κατασκευασμένα από ανοξείδωτο ατσάλι, γεγονός που το καθιστά ανθεκτικό απέναντι σε όξινες και αλκαλικές διεργασίες που μπορούν να λαμβάνουν χώρα εσωτερικά. Το δοχείο είναι εξοπλισμένο με στεγανωτικό, λαστιχένιο δακτύλιο (o-ring) στην περιοχή επαφής του δοχείου με το καπάκι του, ενώ αυτό συγκρατείται με την βοήθεια 8 αντιδιαμετρικών βιδών. Ο αντιδραστήρας αποτελεί δοχείο διπλού τοιχώματος, μεταξύ των οποίων ανακυκλοφορεί ρεύμα νερού που μπορεί να προσαρμόσει την θερμοκρασία στο εσωτερικό αναλόγως με την απαίτηση (ρύθμιση) που υπάρχει. Για τη διεργασία αυτή, υπάρχουν 2 ακροφύσια στο πλαϊνό εξωτερικό τοίχωμα του δοχείου, το ένα στο πάνω και το άλλο στο κάτω μέρος. Στο κέντρο της κάτω βάσης του αντιδραστήρα υπάρχει ένα ακόμη ακροφύσιο από το οποίο συλλέγονται τα προϊόντα υγρής φάσης μετά την λήξη ενός κύκλου αντίδρασης. Το καπάκι του αντιδραστήρα διαθέτει ακόμη 2 ακροφύσια. Το ένα ακροφύσιο, το οποίο βρίσκεται στο κέντρο της βάσης, το διαπερνά ο αναδευτήρας, ενώ στο δεύτερο διέρχεται το θερμοστοιχείο που καταγράφει την θερμοκρασία αντίδρασης.

3.1.2 Περιγραφή συστήματος θέρμανσης

Το σύστημα θέρμανσης που χρησιμοποιείται στη συγκεκριμένη πειραματική διαδικασία περιλαμβάνει ένα μεγάλο κυλινδρικό δοχείο το οποίο γεμίζεται με νερό, έναν ρυθμιστή θερμοκρασίας και μια ηλεκτρική αντλία νερού. Το δοχείο (boiler) αποτελείται από διάφορους αντιστάτες στους οποίους διοχετεύεται ηλεκτρικό ρεύμα και αυτοί με την σειρά τους παράγουν θερμότητα και την μεταφέρουν στο νερό. Με την βοήθεια του ρυθμιστή θερμοκρασίας, ο οποίος βρίσκεται ενσωματωμένος στο επάνω μέρος του boiler, είναι δυνατή η επιλογή της επιθυμητής θερμοκρασίας. Παράλληλα, η ηλεκτρική αντλία νερού, με την οποία είναι εξοπλισμένο το δοχείο νερού, είναι υπεύθυνη για την ανακυκλοφορία του θερμού νερού στο εξωτερικό τοίχωμα του αντιδραστήρα. Για το λόγο αυτό, στο επάνω μέρος του boiler υπάρχουν 2 ακροφύσια, τα οποία είναι συνδεδεμένα, με χρήση εργαστηριακών σωλήνων σιλικόνης, με τα 2 ακροφύσια που βρίσκονται στην εξωτερική πλαϊνή επιφάνεια του αντιδραστήρα, όπως αναφέρεται και παραπάνω. Από το ένα ακροφύσιο του boiler εξέρχεται το θερμό ρεύμα νερού με κατεύθυνση προς το κέλυφος του αντιδραστήρα, ενώ στην άλλη οπή εισέρχεται το ρεύμα νερού που έχει περάσει από τα τοιχώματα του αντιδραστήρα και έχει αφήσει μέρος του θερμικού περιεχομένου του.

3.1.3 Φιλτροσακούλα διαχωρισμού στερεής/υγρής φάσης

Η φιλτροσακούλα διαχωρισμού στερεής/υγρής φάσης αποτελεί ένα είδος φίλτρου το οποίο έχει διαστάσεις ίσες με αυτές του αντιδραστήρα και τοποθετείται στο εσωτερικό του πριν από οποιαδήποτε επεξεργασία των βιοαποβλήτων. Το πορώδες της σακούλας της δίνει την δυνατότητα να κατακρατά την στερεή φάση μετά την λήξη ενός κύκλου αντίδρασης, ενώ το υγρό την διαπερνά εύκολα και συλλέγεται από την οπή της κάτω βάσης του αντιδραστήρα. Είναι σημαντικό να σημειωθεί πως η φιλτροσακούλα δεν αλληλοεπιδρά με τα αντιδρώντα καθ' όλη την διάρκεια της αντίδρασης. Ο ρόλος της είναι να διευκολύνει τόσο την συλλογή όλης της ποσότητας της στερεής φάσης, αλλά και την συλλογή της υγρής φάσης καθώς εμποδίζει την συγκέντρωση στερεών στην οπή της κάτω βάσης.

3.2 Περιγραφή πειραματικής διαδικασίας

Τα δείγματα βιομάζας που χρησιμοποιούνται ως τροφοδοσία για ανάλυση και χαρακτηρισμό, καθώς και για την διεργασία της ζύμωσης για παραγωγή βιοαιθανόλης είναι μίγματα αποτελούμενα από εξαντλημένους κόκκους καφέ, SCG, και εξαντλημένους σπόρους κριθαριού, BSG. Τα υπολείμματα SCG προέρχονται από μηχανή Espresso που χρησιμοποιείται στο κυλικείο της σχολής Χημικών Μηχανικών, ΕΜΠ. Τα υπολείμματα BSG προέρχονται από την *Ελληνική Ζυθοποιία Αταλάντης*, τα οποία μεταφέρθηκαν στη σχολή Χημικών Μηχανικών ΕΜΠ και συγκεκριμένα στη Μονάδα Περιβαλλοντικής Επιστήμης και Τεχνολογίας. Μετά τη μεταφορά τους στις εγκαταστάσεις του ΕΜΠ, τα νωπά BSG τοποθετήθηκαν στο εμπορικό σύστημα αποκεντρωμένης ξήρανσης *Gaia GC-100* (Εικόνα 6), όπου ξηράθηκαν.



Εικόνα 6: Ξηραντήριο *Gaia GC-100*

Ο ξηραντήρας *Gaia* είναι ένα σύστημα μείωσης του όγκου των οργανικών απορριμμάτων και απορριμμάτων φαγητού σε ποσοστό που φτάνει μέχρι και το 90%. Γενικά, τα ξηραντήρια *Gaia* είναι απλά αυτόματα συστήματα ξήρανσης που στηρίζονται στη θέρμανση και τη μηχανική ανάδευση. Εξαιτίας του γεγονότος ότι τα ποσοστά υγρασίας στα οργανικά απορρίμματα και τα απορρίμματα φαγητού είναι πολύ υψηλά (έως και 98%), η μείωση του όγκου και του βάρους επιτυγχάνεται με την εξάτμιση του νερού. Τα ξηραντήρια *Gaia* διαφοροποιούνται από άλλες τεχνολογίες ξήρανσης λόγω του συστήματος closed loop.



Εικόνα 7: Οι πρώτες ύλες εξαντλημένων κόκκων καφέ και εξαντλημένων σπόρων κριθαριού που χρησιμοποιήθηκαν ως τροφοδοσία.

Όπως αναλύθηκε και στο Κεφάλαιο 2.3, η πειραματική διαδικασία αποτελείται από 3 στάδια:

1. Προκατεργασία της πρώτης ύλης
2. Υδρόλυση
3. Ζύμωση.

Πριν και μετά από κάθε στάδιο ακολουθεί ανάλυση και χαρακτηρισμός δειγμάτων της ύλης ώστε να προσδιοριστούν βασικά συστατικά όπως το περιεχόμενο σε λιγνίνη, κυτταρίνη, ημικυτταρίνη, άμυλο και φαινόλες και πώς αυτά μεταβάλλονται σε κάθε στάδιο. Μετά το τελευταίο στάδιο της ζύμωσης, ακολουθεί και ανάλυση για τον προσδιορισμό της παραγόμενης αιθανόλης που σχετίζεται με τη συνολική απόδοση της διεργασίας.

3.2.1 Προκατεργασία μιγμάτων SCG και BSG

3.2.1.1 Ξήρανση

Βασική αρχή για την οποιαδήποτε επεξεργασία της πρώτης ύλης που χρησιμοποιείται αποτελεί η ξήρανση της. Για τον λόγο αυτό χρησιμοποιείται φούρνος ξήρανσης Carbolite (Εικόνα 9) με θερμό ρεύμα αέρα. Αφού συλλεχθεί σημαντική ποσότητα δείγματος από τα 2 είδη πρώτων υλών σε ποτήρια ζέσεως του 1L, τα δείγματα τοποθετούνται στο πυριατήριο προς ξήρανση στους 105 °C για 24 ώρες. Μετά από αυτή την διαδικασία, τα δείγματα μπορούν να αναλυθούν και να χαρακτηριστούν σύμφωνα με τις μεθόδους ανάλυσης που αναφέρονται στη συνέχεια.

3.2.1.2 Αφαίρεση των λιπών – ελαίων

Προκειμένου τα δείγματα να υποστούν διεργασίες υδρόλυσης και ζύμωσης για την παραγωγή βιοαιθανόλης αφαιρούνται προηγουμένως τα λίπη και τα έλαια. Σημαντικές ποσότητες λιπαρών ουσιών μπορούν να δράσουν παρεμποδιστικά κατά την διεργασία της ενζυμικής υδρόλυσης. Η αφαίρεση των λιπαρών ουσιών επιτυγχάνεται με την βοήθεια εκχύλισης με οργανικό διαλύτη, και συγκεκριμένα με κ-εξάνιο, σύμφωνα με τα παρακάτω βήματα:

1. Στον αντιδραστήρα μεσαίας εργαστηριακής κλίμακας εισέρχεται κ-εξάνιο σε αναλογία 10:1 mL/g με την ποσότητα δείγματος.
2. Το μίγμα αναδεύεται σταθερά με κλειστό καπάκι σε θερμοκρασία 25 °C για 5 ώρες.
3. Ακολουθεί εκχύλιση του μίγματος εξανίου-λιπαρών ουσιών από το ακροφύσιο της κάτω βάσης του αντιδραστήρα.
4. Το δείγμα που βρίσκεται εντός του αντιδραστήρα θερμαίνεται ώστε να εξατμιστεί η ποσότητα εξανίου που απομένει ακόμη εντός του αντιδραστήρα.

3.2.2 Αλκαλική και όξινη προ-επεξεργασία μιγμάτων

SCG και BSG

Μετά την παραγωγή ξηραμένων και απολιπανθέντων αποβλήτων (dry, defatted SCG και BSG), ακολουθεί επεξεργασία τους είτε με αλκαλικό είτε με όξινο διάλυμα. Η διαδικασία αυτή αυξάνει την ικανότητα αποικοδόμησης της κυτταρίνης, ενώ επιδρά θετικά στη διαλυτοποίηση της λιγνίνης, έτσι ώστε στην συνέχεια, να αυξηθεί η απόδοση των διεργασιών ενζυμικής υδρόλυσης και ζύμωσης. Για τις ανάγκες της παρούσας εργασίας ελέγχθηκε η χρήση δύο διαφορετικών μεθόδων προ-επεξεργασίας:

- Η αλκαλική μέθοδος με την χρήση αραιού διαλύματος NaOH, στους 50 °C
- Η όξινη μέθοδος με την χρήση αραιού διαλύματος H₂SO₄, στους 50 °C

Η προ-επεξεργασία της πρώτης ύλης επιτυγχάνεται ως εξής:

- a. Από το δείγμα εντός του αντιδραστήρα μεσαίας εργαστηριακής κλίμακας από το οποίο έχουν αφαιρεθεί τα λίπη και έλαια λαμβάνονται 5-10 g.
- b. Σε αυτό επιλέγεται και προστίθεται είτε NaOH, είτε H₂SO₄ σε αναλογία 10:1 mL/g με την ποσότητα δείγματος.

- c. Το μίγμα αναδεύεται σταθερά σε θερμοκρασία 50 °C για συγκεκριμένο χρονικό διάστημα στη συσκευή ανάδευσης (Εικόνα 5).

3.2.3 Ενζυμική υδρόλυση μιγμάτων SCG και BSG

Αφού η πρώτη ύλη υποστεί αλκαλική ή όξινη προεπεξεργασία σε κάθε περίπτωση, ακολουθεί η υδρόλυσή της με ένζυμο. Ο πρωταρχικός στόχος της ενζυμικής υδρόλυσης είναι η μετατροπή της κυτταρίνης του λιγνοκυτταρινούχου υποστρώματος σε μονομερή σάκχαρα. Αυτό επιτυγχάνεται με την προσθήκη κυτταρινασών. Καλό μέτρο της αποτελεσματικότητας ενός ενζύμου είναι η % μετατροπή της κυτταρίνης, η οποία ορίζεται ως το ποσό της κυτταρίνης μετατρέπεται σε γλυκόζη, διαιρεμένη με το αρχικό ποσό της κυτταρίνης. Υψηλότερα ποσοστά μετατροπής κυτταρίνης μπορούν να εξασφαλιστούν είτε με αύξηση της δόσης του ενζύμου ή του χρόνου της υδρόλυσης. Στην εργασία, μελετήθηκε η χρήση 2 κυτταρινολυτικών ενζύμων, ένα εμπορικό και ένα μη εμπορικό, το Cellic CTec2 και το NS 22177 αντίστοιχα. Το ένζυμο Cellic CTec2 (Novozymes, Denmark) αποτελεί ένα σύμπλεγμα επιθετικών κυτταρινασών, με β-γλυκοζιδάσες και ημικυτταρινάση. Η χρήση του εξασφαλίζει υψηλά ποσοστά μετατροπής, είναι αποτελεσματικό σε υποστρώματα με υψηλό περιεχόμενο σε στερεά, είναι ανθεκτικό σε αναστολείς και συμβατό με μια ποικιλία υποστρωμάτων. Λόγω της υψηλής του συγκέντρωσης δίνει τη δυνατότητα χαμηλότερης δόσης ενζύμου έως και 50%. Παρόμοια, το NS 22177 αποτελεί ένζυμο κυτταρινασών το οποίο δρα σε στερεά υποστρώματα όπως και το Cellic CTec2 και το οποίο έχει αναπτυχθεί από την εταιρεία για την ενζυμική υδρόλυση διατροφικών απορριμμάτων.

Σε κάθε περίπτωση ελέγχθηκε η χρήση Cellic CTec2 σε αναλογία 400 και 800 μL/g αρχικής κυτταρίνης καθώς και η χρήση NS 22177 σε αναλογία 175 και 250 μL/g αρχικής κυτταρίνης. Τα βήματα της ενζυμικής υδρόλυσης είναι τα εξής:

- a. Τα δείγματα ελέγχονται ως προς το pH και ρυθμίζονται με κατάλληλη ποσότητα H₂SO₄ ή NaOH μέχρις ότου το pH να κυμαίνεται μεταξύ 5 – 5.5.
- b. Στα μπουκαλάκια με τα δείγματα της προηγούμενης υδρόλυσης προστίθεται κατάλληλη ποσότητα ενζύμου.
- c. Τα δείγματα αναδεύονται σταθερά σε θερμοκρασία 50 °C για συγκεκριμένο χρονικό διάστημα στην συσκευή ανάδευσης (Εικόνα 5).

3.2.4 Ζύμωση μιγμάτων SCG και BSG

Μετά το πέρας της ενζυμικής υδρόλυσης ακολουθεί η διεργασία της ζύμωσης σύμφωνα με τα παρακάτω βήματα:

1. Τα δείγματα ελέγχονται ξανά ως προς το pH και ρυθμίζονται με κατάλληλη ποσότητα H_2SO_4 ή $NaOH$ μέχρις ότου το pH να κυμαίνεται μεταξύ 5 – 6.
2. Στα δείγματα προστίθεται η μαγιά *Saccharomyces cerevisiae* η οποία εμπεριέχεται στη συμβατική μαγιά ξηρή αρτοποιίας σε ποσοστό 2% κατά βάρος αρχικής ποσότητας πρώτης ύλης.
3. Τα δείγματα αναδεύονται σταθερά στην συσκευή ανάδευσης (Εικόνα 5) και σε θερμοκρασία 30 °C για χρονικό διάστημα 24 ωρών.

3.3 Μέθοδοι ανάλυσης

Ο καθορισμός της σύστασης των προξηραμένων βιοαποβλήτων που αποτελούν την πρώτη ύλη στην πειραματική διαδικασία αποτελεί μια κρίσιμη παράμετρο σχεδιασμού της διεργασίας παραγωγής βιοαιθανόλης. Με εφαρμογή μεθόδων που αναλύονται παρακάτω, ποσοτικοποιήθηκαν τα βασικά συστατικά τόσο των SCG και των BSG, όσο και των μιγμάτων αυτών που κρίνονται απαραίτητα για την διεξαγωγή της πειραματικής διαδικασίας. Επιπλέον, παρακάτω παρατίθενται και οι μέθοδοι ανάλυσης των προϊόντων που παράγονται μετά από κάθε στάδιο επεξεργασίας έως των τελικών προϊόντων της ζύμωσης. Οι φυσικοχημικές παράμετροι που προσδιορίστηκαν είναι οι εξής:

Στερεά δείγματα

- Η υγρασία, H
- Τα ολικά στερεά, TS
- Τα ολικά πτητικά στερεά, VS
- Ο ολικός οργανικός άνθρακας, TOC
- Τα ολικά υδατοδιαλυτά στερεά, WS
- Η κυτταρίνη
- Η ημικυτταρίνη
- Το ολικό άμυλο
- Τα λίπη και έλαια
- Η λιγνίνη
 - Η διαλυτή λιγνίνη, ASL
 - Η μη διαλυτή λιγνίνη, AIL

Υγρά δείγματα

- Τα ολικά αναγωγικά σάκχαρα, TRS
- Η ελεύθερη γλυκόζη
- Τα πτητικά λιπαρά οξέα, VFAs
- Οι φαινόλες
- Η αιθανόλη
- Ο ολικός οργανικός άνθρακας, TOC

- Το ολικό άζωτο, TN

3.3.1 Προσδιορισμός υγρασίας (H)

Για τον προσδιορισμό της περιεχόμενης υγρασίας H των εξαντλημένων κόκκων καφέ και των εξαντλημένων σπόρων κριθαριού, ζυγίζεται ποσότητα 2g για κάθε δείγμα σε αναλυτικό ζυγό ακριβείας τεσσάρων δεκαδικών ψηφίων (Εικόνα 8).



Εικόνα 8: Αναλυτικός ζυγός ακριβείας 4 δεκαδικών ψηφίων.

Στην συνέχεια, τα δείγματα τοποθετούνται σε δοχεία ζέσεως και εισάγονται σε φούρνο ξήρανσης Carbolite με ρεύμα αέρα στους 80 °C, όπου και παραμένουν για χρονικό διάστημα περίπου 16 ωρών (Εικόνα 9).



Εικόνα 9: Φούρνος ξήρανσης Carbolite με ρεύμα αέρα.

Μετά το πέρας των 16 ωρών τα δείγματα τοποθετούνται σε ξηραντήρα για χρονικό διάστημα περίπου 20 λεπτών, ώστε να αποκτήσουν θερμοκρασία δωματίου και ζυγίζονται ξανά.

Η (% κ.β.) υγρασία υπολογίζεται από την διαφορά μάζας πριν και μετά την ξήρανση στους 80 °C, σύμφωνα με την παρακάτω εξίσωση:

$$\text{Υγρασία } H (\% \text{ κ.β.}) = \frac{\text{Initial solid} - \text{Final solid}}{\text{Initial solid}} * 100\%$$

Όπου,

Initial solid = η αρχική μάζα του δείγματος, σε g

Final solid = η τελική μάζα του δείγματος μετά από ξήρανση στους 80 °C, σε g

3.3.2 Προσδιορισμός ολικών στερεών (TS)

Για τον προσδιορισμό των ολικών στερεών TS ζυγίζεται ποσότητα 10g για κάθε δείγμα εξαντλημένων κόκκων καφέ και εξαντλημένων σπόρων κριθαριού σε αναλυτικό ζυγό ακριβείας τριών δεκαδικών ψηφίων. Στη συνέχεια, τα δείγματα τοποθετούνται σε προζυγισμένες κάψες πορσελάνης και εισάγονται σε φούρνο ξήρανσης με ρεύμα αέρα (Εικόνα 9) στους 105°C για 24 ώρες. Μετά το πέρας των 24 ωρών τα δείγματα τοποθετούνται στον αφυγραντήρα για περίπου 15 λεπτά, ώστε να αποκτήσουν θερμοκρασία δωματίου, και ζυγίζονται ξανά. Στην παρακάτω Εικόνα 10 απεικονίζονται οι κάψες πορσελάνης με τα περιεχόμενα δείγματα:



Εικόνα 10: Κάψες πορσελάνης που περιέχουν δείγματα εξαντλημένων κόκκων καφέ SCG.

Το ποσοστό των ολικών στερεών υπολογίζεται από το λόγο της τελικής μάζας προς την αρχική σύμφωνα με την εξίσωση:

$$\text{Ολικά στερεά TS (\% κ. β.)} = \frac{m_f}{m_i} * 100\%$$

Όπου,

m_i = αρχική μάζα δείγματος, σε g

m_f = τελική μάζα μετά το πέρας των 24 ωρών στους 105°C, σε g

3.3.3 Προσδιορισμός ολικών πτητικών στερεών (VS)

Ο προσδιορισμός του περιεχόμενου οργανικού φορτίου στα στερεά δείγματα των πρώτων υλών που χρησιμοποιούνται γίνεται μέσω της καύσης τους σε υψηλή θερμοκρασία για συγκεκριμένο χρονικό διάστημα.

Αρχικά, ζυγίζεται περίπου 0,5-1 g για κάθε δείγμα ολικών στερεών TS και αυτά τοποθετούνται σε προζυγισμένες κάψες πορσελάνης. Μετά, τα δείγματα τοποθετούνται στο φούρνο Barnstead Thermolyne στους 550 °C για 4-5 ώρες. Ο φούρνος που χρησιμοποιείται για τη μέτρηση των πτητικών στερεών απεικονίζεται στην παρακάτω Εικόνα 11:



Εικόνα 11: Φούρνος μέτρησης πτητικών στερεών Barnstead Thermolyne.

Μετά το πέρας των 4 ωρών, οι κάψες τοποθετούνται στον αφυγραντήρα για περίπου 15 λεπτά, ώστε να έρθουν σε θερμοκρασία δωματίου. Τέλος ζυγίζονται ξανά οι κάψες μαζί με τα περιεχόμενα δείγματα και καταγράφεται η τελική μάζα.

Ο υπολογισμός των πτητικών στερεών προκύπτει με βάση την αρχική και την τελική μάζα του ξηρού δείγματος και υπολογίζεται για όλα τα δείγματα, όπως ακριβώς και με την υγρασία με βάση τη σχέση:

$$\text{Ολικά πτητικά στερεά VS (\% κ. β.)} = \frac{m_i - m_f}{m_i} * 100\%$$

Όπου,

m_i = αρχική μάζα δείγματος, σε g

m_f = τελική μάζα μετά το πέρας των 4 ωρών στους 550°C, σε g

3.3.4 Προσδιορισμός ολικού οργανικού άνθρακα (TOC) για στερεά δείγματα

Για τον προσδιορισμό της επί τις εκατό κατά όγκο περιεκτικότητας ολικού οργανικού άνθρακα TOC, χρησιμοποιείται η συσκευή TOC της εταιρείας Shimadzu η οποία απεικονίζεται στην παρακάτω Εικόνα 12:



Εικόνα 12: Συσκευή μέτρησης ολικού οργανικού άνθρακα TOC

3.3 Πειραματικό Μέρος: Μέθοδοι ανάλυσης

Η πειραματική διαδικασία προσδιορισμού TOC ξεκινά αρχικά με ζύγιση 40mg δείγματος, το οποίο έχει προηγουμένως υποστεί λειοτρίβηση σε μέγεθος 1 mm και ξήρανση στους 80 °C. Τα 40 mg, αφού ζυγιστούν, τοποθετούνται σε κάψες πορσελάνης σύμφωνα με την Εικόνα 13.



Εικόνα 13: Κάψες πορσελάνης που χρησιμοποιούνται στην συσκευή μέτρησης TOC.

Στη συνέχεια, οι κάψες τοποθετούνται στον ειδικό φούρνο του οργάνου όπου το δείγμα θερμαίνεται στους 900 °C (Εικόνα 14).



Εικόνα 14: Φούρνος (Solid Sample Module SSM 5000A)

Στη θερμοκρασία αυτή γίνεται καύση του οργανικού άνθρακα και τα καυσαέρια αυτής οδηγούνται στην κεντρική μονάδα TOCVCSH (Εικόνα 15).



Εικόνα 15: Κεντρική μονάδα TOCVC SH

Στη μονάδα αυτή υπολογίζεται η μάζα του οργανικού άνθρακα (σε mg) από το CO₂ που παράγεται κατά την καύση. Το (%) ποσοστό του οργανικού άνθρακα δίνεται από την εξίσωση:

$$\text{Ολικός οργανικός άνθρακας TOC (\%)} = \frac{\left(\frac{m_1}{M_1}\right) + \left(\frac{m_2}{M_2}\right)}{2} * 100\%$$

Όπου,

m_1 : η μετρούμενη μάζα του οργανικού άνθρακα του πρώτου δείγματος, σε mg

m_2 : η μετρούμενη μάζα του οργανικού άνθρακα του δεύτερου δείγματος, σε mg

M_1 : η αρχική μάζα του πρώτου δείγματος, σε mg

M_2 : η αρχική μάζα του δεύτερου δείγματος, σε mg

3.3.5 Προσδιορισμός ολικού οργανικού άνθρακα (TOC) και ολικού αζώτου (TN) για υγρά δείγματα

Για τον προσδιορισμό του ολικού οργανικού άνθρακα (TOC) και του ολικού αζώτου (TN) σε υγρά δείγματα χρησιμοποιείται η συσκευή TOC-TN της εταιρίας Shimadzu (Εικόνα 15). Το δείγμα εισάγεται απ' ευθείας στο σωλήνα καύσης που περιέχει τον καταλύτη αφού προηγουμένως έχει αραιωθεί καταλλήλως. Ο συνολικός άνθρακας καίγεται στους 720 °C στο σωλήνα καύσης και σχηματίζεται διοξείδιο του άνθρακα. Το φέρον αέριο, ο υπερκάθαρος αέρας, ρέει μέσα στον σωλήνα καύσης και παραλαμβάνει το διοξείδιο και τα υπόλοιπα προϊόντα καύσης, τα οποία μεταφέρει σε έναν αφυγραντήρα όπου

απομακρύνεται η υγρασία, με ταυτόχρονη ψύξη των αερίων καύσης. Στην συνέχεια, το φέρον αέριο διέρχεται μέσα από μία παγίδα αλογόνων, και καταλήγει στην κυψελίδα ανιχνευτή NDIR (Non dispersive infra red gas analyzer), όπου ανιχνεύεται το διοξείδιο του άνθρακα και κατ' επέκταση ο ολικός οργανικός άνθρακας, TOC. Παράλληλα, ανιχνεύεται και η συγκέντρωση ολικού αζώτου, TN.

3.3.6 Προσδιορισμός ολικών υδατοδιαλυτών στερεών

(WS)

Για τον προσδιορισμό των ολικών υδατοδιαλυτών στερεών WS αρχικά ζυγίζονται 1.25g από κάθε δείγμα μετά από διαδικασία προσδιορισμού TS. Αυτά τοποθετούνται μαζί με 50mL απιονισμένου νερού σε γυάλινα μπουκαλάκια τα οποία σφραγίζονται. Στη συνέχεια, τα γυάλινα μπουκαλάκια τοποθετούνται στο ανακινούμενο υδατόλουτρο IKA KS 30001 control σε θερμοκρασία 50 °C με ταχύτητα ανάδευσης 130 rpm για 1 ώρα.

Μετά το πέρας της 1 ώρας, τα δείγματα φυγοκεντρούνται για να συλλεχθεί η στερεή φάση. Η στερεή φάση των δειγμάτων ζυγίζεται και τοποθετείται σε προζυγισμένες κάψες οι οποίες μπαίνουν στον φούρνο ξήρανσης (Εικόνα 9) στους 105°C για 24 ώρες. Μετά το πέρας των 24 ωρών, τα δείγματα τοποθετούνται σε αφυγραντήρα για περίπου 15 λεπτά και ακολούθως ζυγίζονται.

Τα ολικά υδατοδιαλυτά στερεά υπολογίζονται σύμφωνα με την εξίσωση:

$$\text{Ολικά υδατοδιαλυτά στερεά WS (\% κ. β.)} = \frac{m_i - m_f}{m_i} * 100\%$$

Όπου,

m_i = αρχική μάζα ξηρού δείγματος

m_f = τελική μάζα μετά το πέρας των 24 ωρών στους 105°C

3.3.7 Προσδιορισμός ολικών αναγωγικών σακχάρων

(TRS)

Παρασκευή διαλύματος 3,5-δινιτροσαλικυλικού οξέος

1. Παρασκευάζεται υδατικό διάλυμα NaOH συγκέντρωσης 22.86 g/L και όγκου 700 mL.
2. Στο διάλυμα NaOH (Στάδιο 1) προστίθενται 10 g άνυδρου 3,5-δινιτροσαλικυλικού οξέος (αν το αντιδραστήριο είναι ένυδρο υπολογίζεται η ανάλογη ποσότητα).
3. Το προκύπτον διάλυμα τίθεται υπό ανάδευση και ελαφρά θέρμανση, μέχρι την πλήρη διάλυση του 3,5-δινιτροσαλικυλικού οξέος.
4. Στο προκύπτον διάλυμα του Σταδίου 2 προστίθενται σταδιακά 300 g άνυδρου τρυγικού καλιονατρίου (αν το αντιδραστήριο είναι ένυδρο υπολογίζεται η ανάλογη ποσότητα). Το διάλυμα εξακολουθεί να αναδεύεται υπό ελαφρά θέρμανση.
5. Μετά την ολοκλήρωση της προσθήκης του τρυγικού καλιονατρίου και την πλήρη διάλυσή του, το προκύπτον διάλυμα ογκομετρείται μέχρι το 1 L (με χρήση της κατάλληλης ογκομετρικής φιάλης).
6. Το τελικό διάλυμα φυλάσσεται σε φιάλη σκούρου χρώματος, σε θερμοκρασία περιβάλλοντος και ο χρόνος ζωής του είναι περίπου 6 μήνες.

Προσδιορισμός των ολικών αναγωγικών σακχάρων (TRS)

1. Σε δοκιμαστικό σωλήνα τοποθετείται 0.5 mL δείγματος προς προσδιορισμό. Ακολουθεί προσθήκη 0.5 mL διαλύματος 3,5-δινιτροσαλικυλικού οξέος και το προκύπτον μίγμα αναμιγνύεται σε συσκευή vortex. Επιπλέον σε άλλον ένα δοκιμαστικό σωλήνα τοποθετείται 0.5 mL απιονισμένου νερού, 0.5 mL διαλύματος 3,5-δινιτροσαλικυλικού οξέος και το προκύπτον μίγμα αναμιγνύεται σε συσκευή vortex.
2. Ακολουθεί βρασμός για χρόνο 5 min προκειμένου να αναγωγή του 3,5-δινιτροσαλικυλικού οξέος.
3. Μετά το βρασμό προστίθενται 4 mL απιονισμένου νερού και ανάμιξη σε συσκευή vortex.
4. Τα δείγματα φωτομετρώνται σε μήκος κύματος 540 nm. Για το μηδενισμό του φωτόμετρου χρησιμοποιείται το δείγμα που περιέχει απιονισμένο νερό.
5. Οι μετρήσεις πραγματοποιούνται εις τριπλούν.

Ποσοτικοποίηση των αναγωγικών σακχάρων (κατασκευή καμπύλης αναφοράς γλυκόζης)

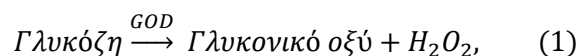
1. Χρησιμοποιείται πρότυπο διάλυμα γλυκόζης συγκέντρωσης 2.0 mg/mL. Πραγματοποιούνται αραιώσεις του παραπάνω διαλύματος με απιονισμένο νερό έτσι ώστε να προκύψουν διαλύματα γλυκόζης τελικής συγκέντρωσης 0.2, 0.4, 0.6, 0.8, 1.0 και 2.0 mg/mL.

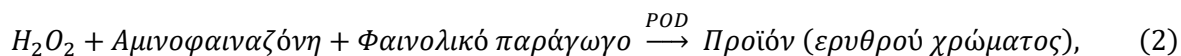
2. Σε δοκιμαστικούς σωλήνες προστίθενται 0.5 mL διαλύματος 3,5-δινιτροσαλικυλικού οξέος και 0.5 mL από το κάθε διάλυμα γλυκόζης. Τα προκύπτοντα διαλύματα αναμιγνύονται καλά σε συσκευή vortex.
3. Σε τρεις ακόμα δοκιμαστικούς σωλήνες προστίθενται 0.5 mL απιονισμένου νερού και 0.5 mL διαλύματος 3,5-δινιτροσαλικυλικού οξέος.
4. Όλοι οι δοκιμαστικοί σωλήνες τοποθετούνται σε νερό που βράζει. Μετά από ακριβώς 5 min απομακρύνονται οι δοκιμαστικοί σωλήνες από το νερό και προστίθεται σε κάθε ένα από αυτούς 4 mL απιονισμένο νερό.
5. Επιλέγεται στο φωτόμετρο το μήκος κύματος των 540 nm. Μηδενίζεται το όργανο με το διάλυμα που περιέχει το απιονισμένο νερό, και μετρούνται οι απορροφήσεις των διαλυμάτων γνωστής συγκέντρωσης γλυκόζης.
6. Υπολογίζονται οι μέσοι όροι των λαμβανόμενων απορροφήσεων και κατασκευάζεται η καμπύλη αναφοράς της γλυκόζης (απορρόφηση ως προς την αντίστοιχη συγκέντρωση του προτύπου διαλύματος). Υπολογίζεται η βέλτιστη ευθεία με τη μέθοδο των ελαχίστων τετραγώνων.
7. Με εφαρμογή της παραπάνω μεθόδου μπορεί να κατασκευαστεί καμπύλη αναφοράς οποιουδήποτε αναγωγικού σακχάρου.

Θα πρέπει να σημειωθεί ότι απαιτείται κατασκευή νέας καμπύλης αναφοράς αναγωγικών σακχάρων κάθε φορά που παρασκευάζεται νέο διάλυμα 3,5-δινιτροσαλικυλικού οξέος.

3.3.8 Προσδιορισμός ελεύθερης γλυκόζης

Η μέθοδος προσδιορισμού της γλυκόζης βασίζεται στη μετατροπή της γλυκόζης σε ένα προϊόν ερυθρού χρώματος, που είναι αποτέλεσμα της διαδοχικής δράσης των ενζύμων οξειδάση και υπεροξειδάση της γλυκόζης. Αρχικά, η γλυκόζη με τη δράση της οξειδάσης μετατρέπεται σε γλυκονικό οξύ με ταυτόχρονη παραγωγή υπεροξειδίου του υδρογόνου. Στη συνέχεια, το υπεροξείδιο του υδρογόνου παρουσία αμινοφαιναζόνης και κάποιου φαινολικού παραγωγού με τη δράση της υπεροξειδάσης μετατρέπεται σε κάποιο προϊόν ερυθρού χρώματος το οποίο παρουσιάζει μέγιστη απορρόφηση στα 510nm. Οι 2 αντιδράσεις που αναφέρθηκαν παρουσιάζονται παρακάτω (GOD=οξειδάση, POD=υπεροξειδάση):





Το διάλυμα εργασίας παρασκευάζεται μεταφέροντας ποσοτικά ένα φιαλίδιο ενζύμων σε ένα φιαλίδιο ρυθμιστικού διαλύματος και είναι σταθερό 45 ημέρες στους 4 °C.

Κατασκευή καμπύλης αναφοράς με τη μέθοδο GOD/PAP

Για τον προσδιορισμό της ελεύθερης γλυκόζης με τη μέθοδο GOD/PAP κατασκευάζεται πρώτα η καμπύλη αναφοράς της γλυκόζης, με την εν λόγω μέθοδο. Τα βήματα κατασκευής της καμπύλης αναφοράς με τη μέθοδο DNS είναι τα ακόλουθα:

1. Χρησιμοποιείται πρότυπο διάλυμα γλυκόζης 10 mg/mL. Πραγματοποιούνται αραιώσεις του παραπάνω διαλύματος με απιονισμένο νερό, έτσι ώστε να προκύψουν διαλύματα γλυκόζης 0,1 , 0,2 , 0,4 , και 0,6 mg/mL.
2. Σε οχτώ δοκιμαστικούς σωλήνες (δύο για κάθε συγκέντρωση γλυκόζης) προστίθενται 2 mL διαλύματος εργασίας και 0,1 mL από το κάθε διάλυμα γλυκόζης.
3. Στη συνέχεια σε δύο ακόμα δοκιμαστικούς σωλήνες προστίθενται 2 mL διαλύματος εργασίας και 0,1 mL απιονισμένου νερού (τυφλό).
4. Όλοι οι δοκιμαστικοί σωλήνες επάζονται σε υδατόλουτρο θερμοκρασίας 37 °C για 15 min.
5. Επιλέγεται στο φωτόμετρο το μήκος κύματος των 510 nm. Το όργανο μηδενίζεται με απιονισμένο νερό, οι δοκιμαστικοί σωλήνες αναδεύονται στη συσκευή Vortex- Genie 2, της εταιρείας Scientific Industries, και μετρούνται οι απορροφήσεις των διαλυμάτων γνωστής συγκέντρωσης.

Ελεύθερη γλυκόζη σε δείγματα άγνωστης συγκέντρωσης

Για τον προσδιορισμό της ελεύθερης γλυκόζης στα μελετόμενα υλικά άγνωστης συγκέντρωσης, χρησιμοποιούνται τα διηθήματα και τα εκπλύματα που προκύπτουν από την εκχύλιση κατά τον προσδιορισμό των ολικών υδατοδιαλυτών σακχάρων.

Τα εκπλύματα χρησιμοποιούνται χωρίς αραιώση, ενώ τα διηθήματα αραιώνονται αναλόγως του εκάστοτε σταδίου. Για τη μέτρηση της γλυκόζης μετά την αρχική προκατεργασία των δειγμάτων πραγματοποιείται αραιώση 1:100, ενώ μετά την επεξεργασία για τον προσδιορισμό της κυτταρίνης και του αμύλου επιλέγεται αραιώση 1:5. Σε δοκιμαστικούς σωλήνες (Εικόνα 16), αντίστοιχα πλέον με τα

3.3 Πειραματικό Μέρος: Μέθοδοι ανάλυσης

βήματα της μεθόδου για την κατασκευή της καμπύλης αναφοράς, προστίθενται 2 mL του διαλύματος εργασίας και 0.1 mL του εκάστοτε διαλύματος (διήθημα ή έκπλυμα) και απιονισμένου νερού, για την περίπτωση του τυφλού, και εν συνεχεία οι δοκιμαστικοί σωλήνες τοποθετούνται για επώαση στο υδατόλουτρο Polyscience σε θερμοκρασία 37 °C για 15 min.



Εικόνα 16: Προσδιορισμός ελεύθερης γλυκόζης με τη μέθοδο GOD/PAP

Μετά το πέρας της επώασης κάθε ένας δοκιμαστικός σωλήνας αναδεύεται στη συσκευή Vortex-Genie 2 και ακολουθεί η φωτομέτρηση, σε φωτόμετρο Spectroquant Pharo 300 Merck, σε μήκος κύματος 510 nm. Το φωτόμετρο πριν την έναρξη της φωτομέτρησης των δειγμάτων μηδενίζεται με απιονισμένο νερό.

Σημείωση: Η παρουσία γλυκόζης στο δείγμα φαίνεται στον χρωματισμό του σακχάρου από άχρωμο σε ελαφρύ ροζ κατά την προσθήκη δείγματος. Στην περίπτωση που το δείγμα δε χρωματίζεται, αυτό σημαίνει ή ότι το δείγμα δεν περιέχει γλυκόζη ή ότι η γλυκόζη έχει καταναλωθεί από μικροοργανισμούς αν τυχόν το διήθημα έχει προηγουμένως μείνει αρκετή ώρα εκτός ψυγείου.

Τέλος, η ελεύθερη γλυκόζη υπολογίζεται με βάση τη σχέση που ακολουθεί:

$$\text{Ελεύθερη γλυκόζη (\% κ. β.)} = \frac{0.71 * ABS_{mean} * D * V_{tot} * 10^{-3}}{\text{initial solid}} * 100\%$$

Όπου,

ABS_{mean} = ο μέσος όρος απορρόφησης

D = η αραίωση που έχει πραγματοποιηθεί στο διάλυμα ($D=1$ όταν το διάλυμα παραμένει χωρίς αραίωση, $D=5$ όταν η αραίωση είναι 1:5 και $D=10$ όταν η αραίωση είναι 1:10)

V_{tot} = ο συνολικός όγκος του διηθήματος

initial solid = η αρχική μάζα του δείγματος

3.3.9 Προσδιορισμός κυτταρίνης

Η διαδικασία προσδιορισμού της κυτταρίνης συνίσταται στην όξινη υδρόλυση του στερεού υπολείμματος που προκύπτει κατά τον προσδιορισμό των ολικών υδατοδιαλυτών στερεών και περιλαμβάνει τα εξής βήματα:

1. Λαμβάνονται 300 mg από το κάθε δείγμα στερεού υπολείμματος που προέκυψε κατά τον προσδιορισμό WS και τοποθετούνται σε γυάλινα μπουκαλάκια. Εκεί προστίθενται 3 mL H_2SO_4 72% w/w.
2. Τα γυάλινα μπουκαλάκια σφραγίζονται και τοποθετούνται σε ανακινούμενο υδατόλουτρο σε θερμοκρασία 30°C και ταχύτητα ανάδευσης 150 rpm για 1 ώρα.
3. Μετά το πέρας 1 ώρας προστίθενται σε κάθε μπουκαλάκι 84 mL απιονισμένου νερού και τα δείγματα τοποθετούνται στον αποστειρωτή ISOLAB Laborgerate GmbH Autoclave για 1 ώρα και σε θερμοκρασία 121 °C. Στην παρακάτω Εικόνα 17 φαίνεται ο αποστειρωτής:



Εικόνα 17: Κλίβανος αποστείρωσης ISOLAB Laborgerate GmbH Autoclave

3.3 Πειραματικό Μέρος: Μέθοδοι ανάλυσης

4. Μετά την αποστείρωση, τα δείγματα αφήνονται να έρθουν σε θερμοκρασία δωματίου και εν συνεχεία διηθούνται. Τα διηθήματα αποθηκεύονται σε falcon tubes των 50 mL, ενώ τα στερεά υπολείμματα σε πορσελάνινες κάψες.
5. Από τα διηθήματα που προκύπτουν λαμβάνονται 20 mL από το καθένα και εξουδετερώνονται, υπό ανάδευση, με χρήση CaCO_3 έως ότου το pH να κυμαίνεται μεταξύ 5 και 5,5.
6. Μετά την εξουδετέρωση τα δείγματα αφήνονται να ηρεμήσουν και συλλέγεται το υπερκείμενο υγρό μέσω φυγοκέντρησης.
7. Το συλλεχθέν υπερκείμενο υγρό κάθε δείγματος αραιώνεται κατάλληλα και ακολουθεί η μέθοδος προσδιορισμού της ελεύθερης γλυκόζης GOD/PAP. Από το υπερκείμενο υγρό λαμβάνονται 100 μL τα οποία τοποθετούνται σε γυάλινα φιαλίδια στα οποία προστίθενται και 2 mL αντιδραστηρίου σακχάρου. Ακολούθως, τα φιαλίδια τοποθετούνται στο υδατόλουτρο σε θερμοκρασία 37 °C για 15 λεπτά. Τέλος, λαμβάνει χώρα φωτομέτρηση σε μήκος κύματος 510 nm, σε φωτόμετρο Spectroquant Pharo 300 Merck.

Οι μετρούμενες απορροφήσεις εισάγονται στη κατασκευασμένη καμπύλη αναφοράς της γλυκόζης με τη μέθοδο GOD/PAP και στη συνέχεια με βάση τις σχέσεις που ακολουθούν προσδιορίζεται η συγκέντρωση κυτταρίνης. Πιο συγκεκριμένα, εφαρμόζεται η παρακάτω σχέση:

$$Total\ gluc\ (\% \kappa. \beta.) = \frac{0.71 * ABS_{mean} * D * 86.73 * 10^{-3}}{initial\ solid} * \frac{100}{0.897} \%$$

Όπου,

ABS_{mean} = ο μέσος όρος απορρόφησης

D = η αραιώση που έχει πραγματοποιηθεί στο διάλυμα (D=1 όταν το διάλυμα παραμένει χωρίς αραιώση, D=5 όταν η αραιώση είναι 1:5 και D=10 όταν η αραιώση είναι 1:10)

86.73 (mL): προκαθορισμένη τιμή

initial solid = η μάζα του δείγματος που λήφθηκε από τα στερεά υπολείμματα που προέκυψαν κατά τον προσδιορισμό της κυτταρίνης

0.897: συντελεστής διόρθωσης της συγκέντρωσης της γλυκόζης

Τέλος, η ποσότητα της κυτταρίνης υπολογίζεται από τη σχέση:

$$\text{Κυτταρίνη (\% κ. β.)} = \text{Total gluc (\% κ. β.)} * 0.9$$

Όπου,

$$0.9 = \frac{162}{180} = \text{συντελεστής διόρθωσης της συγκέντρωσης της γλυκόζης.}$$

3.3.10 Προσδιορισμός ημικυτταρίνης

Ο προσδιορισμός της ημικυτταρίνης λαμβάνει χώρα στο υπερκείμενο υγρό που προκύπτει μετά την εξουδετέρωση του κατά τον προσδιορισμό της κυτταρίνης (Στάδιο 5). Συγκεκριμένα, λαμβάνονται 0.5 mL από κάθε δείγμα και τοποθετούνται σε γυάλινα φιαλίδια. Σε αυτά προστίθενται 0.5 mL αντιδραστηρίου DNS και τα δείγματα αφήνονται σε βραστό νερό για 5 λεπτά. Στην συνέχεια, προστίθενται 4 mL νερού στο καθένα και ακολουθεί φωτομέτρηση σε μήκος κύματος 540 nm, σε φωτόμετρο Spectroquant Pharo 300 Merck.

Οι μετρούμενες απορροφήσεις εισάγονται στη κατασκευασμένη καμπύλη αναφοράς της ημικυτταρίνης και στη συνέχεια με βάση τις σχέσεις που ακολουθούν προσδιορίζεται η συγκέντρωση ημικυτταρίνης.

Αρχικά υπολογίζεται η απορρόφηση της ξυλόζης στα 540 nm:

$$ABS_{\xi\upsilon\lambda} = ABS_{\eta\mu\kappa\upsilon\tau} - \left(\frac{0.71 * ABS_{\kappa\upsilon\tau}}{1.664} \right)$$

Όπου,

$ABS_{\xi\upsilon\lambda}$ = η απορρόφηση της ξυλόζης σε μήκος κύματος 540 nm

$ABS_{\eta\mu\kappa\upsilon\tau}$ = ο μέσος όρος απορρόφησης της ημικυτταρίνης (η απορρόφηση που μετρήθηκε στο συγκεκριμένο στάδιο)

$ABS_{\kappa\upsilon\tau}$ = ο μέσος όρος απορρόφησης της κυτταρίνης (όπως βρέθηκε κατά τον προσδιορισμό της κυτταρίνης)

Κατόπιν, υπολογίζεται η συνολική περιεκτικότητα σε ξυλόζη (% κ.β.):

$$\text{Ολική ξυλόζη (\% κ. β.)} = \frac{1.3861 * ABS_{\xi\upsilon\lambda}}{0.86}$$

Όπου,

$ABS_{\xi\lambda}$ = η απορρόφηση της ξυλόζης σε μήκος κύματος 540 nm

0,86 = συντελεστής διόρθωσης της συγκέντρωσης της ξυλόζης

Τέλος, η ποσότητα της ημικυτταρίνης υπολογίζεται από τη σχέση:

$$\text{Ημικυτταρίνη (\% κ. β.)} = \frac{(\text{Ολική ξυλόζη (\% κ. β.)}) * \left(\frac{132}{150}\right) * 0.08673 * \left(\frac{1}{1000}\right) * 100}{\text{initial solid}}$$

Όπου,

$\frac{132}{150}$ = συντελεστής διόρθωσης της συγκέντρωσης της ξυλόζης

86,73 mL = προκαθορισμένη τιμή

Initial solid = η μάζα του δείγματος που λήφθηκε από τα στερεά υπολείμματα που προέκυψαν κατά τον προσδιορισμό της κυτταρίνης

3.3.11 Προσδιορισμός λιγνίνης

3.3.11.1 Προσδιορισμός διαλυτής λιγνίνης (ASL)

Από τα διηθήματα που προκύπτουν μετά την όξινη υδρόλυση κατά τον προσδιορισμό της κυτταρίνης (Στάδιο 4), λαμβάνονται 2.5 mL από κάθε δείγμα και στη συνέχεια τα δείγματα υφίστανται φωτομέτρηση σε μήκος κύματος 320 nm, σε φωτόμετρο Spectroquant Pharo 300 Merck.

Οι μετρούμενες απορροφήσεις εισάγονται στη κατασκευασμένη καμπύλη αναφοράς της λιγνίνης και στη συνέχεια με βάση τις σχέσεις που ακολουθούν προσδιορίζεται η συγκέντρωση λιγνίνης:

$$\text{Διαλυτή λιγνίνη (\% κ. β.)} = \left(\frac{ABS_{\text{mean}} * D * 0.08673}{\varepsilon * \text{initial solid}} \right) * 100\%$$

Όπου,

ABS_{mean} = ο μέσος όρος απορρόφησης

D = η αραιώση που έχει πραγματοποιηθεί στο διάλυμα (D=1 όταν το διάλυμα παραμένει χωρίς αραιώση, D=5 όταν η αραιώση είναι 1:5 και D=10 όταν η αραιώση είναι 1:10)

86,73 mL = προκαθορισμένη τιμή

initial solid = η μάζα του δείγματος που λήφθηκε από τα στερεά υπολείμματα που προέκυψαν κατά τον προσδιορισμό της κυτταρίνης

ε = σταθερά που εξαρτάται από το είδος της πρώτης ύλης, $\varepsilon = 30 \frac{L}{g*cm}$ για τους εξαντλημένους κόκκους καφέ, και $\varepsilon = 12 \frac{L}{g*cm}$ για τα κλαδέματα

3.3.11.2 Προσδιορισμός μη διαλυτής λιγνίνης (AIL)

Οι πορσελάνινες κάψες με τα στερεά υπολείμματα, που έχουν προκύψει κατά τον προσδιορισμό της κυτταρίνης (Στάδιο 4), τοποθετούνται στο φούρνο ξήρανσης στους 105 °C για 24 ώρες. Μετά το πέρας των 24 ωρών, οι κάψες αφήνονται στον αφυγραντήρα για περίπου 15 λεπτά και κατόπιν ζυγίζονται. Στη συνέχεια, τοποθετούνται στο φούρνο στους 575 °C για 24 ώρες. Μετά το πέρας των 24 ωρών, οι κάψες αφήνονται στον αφυγραντήρα για περίπου 15 λεπτά και ξαναζυγίζονται. Από τη διαφορά των δυο μαζών που μετρήθηκαν προκύπτει το ποσοστό της μη διαλυτής λιγνίνης, όπως φαίνεται και στην παρακάτω εξίσωση:

$$\text{Μη διαλυτή λιγνίνη (\% κ. β.)} = \left(\frac{m_{575} - m_{105}}{\text{initial solid}} \right) * 100\%$$

Όπου,

m_{575} = η μάζα του δείγματος που βγήκε από το φούρνο στους 575 °C

m_{105} = η μάζα του δείγματος που βγήκε από το φούρνο στους 105 °C

initial solid = η μάζα του δείγματος που λήφθηκε από τα στερεά υπολείμματα που προέκυψαν κατά τον προσδιορισμό της κυτταρίνης ($\approx 300\text{mg}$)

3.3.12 Προσδιορισμός ολικού αμύλου

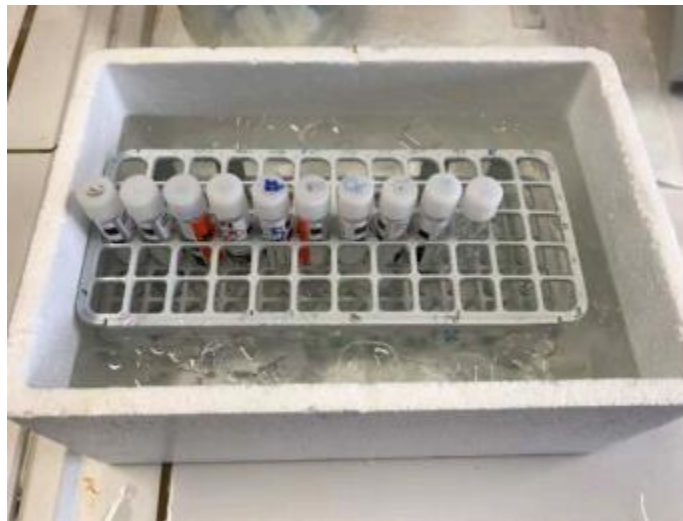
Η διαδικασία προσδιορισμού του ολικού αμύλου βασίζεται στην ενζυμική μέθοδο η οποία κάνει χρήση των ενζύμων αμυλογλυκοζοξειδάση και α -αμυλάση. Τα εν λόγω χρησιμοποιούμενα ένζυμα

3.3 Πειραματικό Μέρος: Μέθοδοι ανάλυσης

περιλαμβάνονται στο σετ αντιδραστηρίων που παρέχει η εταιρεία Megazyme για τον προσδιορισμό του ολικού αμύλου.

Τα βήματα της διαδικασίας που ακολουθούνται βρίσκονται παρακάτω (Megazyme, 2016):

1. Από τα στερεά υπολείμματα τα οποία προκύπτουν από τη διαδικασία προσδιορισμού των ολικών υδατοδιαλυτών στερεών λαμβάνεται μάζα ίση με 100 mg και τοποθετείται σε γυάλινα φιαλίδια.
2. Εκτός από τα ανωτέρω γυάλινα φιαλίδια ετοιμάζονται και δύο ακόμα με την πρόσθεση 100 mg απιονισμένου νερού (τυφλό).
3. Στα γυάλινα φιαλίδια προστίθενται 0.2 mL αιθανόλης (80% v/v) και τα φιαλίδια αναδεύονται στη συσκευή ανάδευσης Vortex Genie 2.
4. Στα γυάλινα φιαλίδια προστίθενται 2 mL KOH 2M και τα φιαλίδια τοποθετούνται σε παγόλουτρο (Εικόνα 18) για 20 min, με παράλληλη ανάδευση κάθε 5 min.



Εικόνα 18: Παγόλουτρο που χρησιμοποιείται στον προσδιορισμό του ολικού αμύλου

5. Μετά την αφαίρεση τους από το παγόλουτρο ακολουθεί η προσθήκη 8 mL ρυθμιστικού διαλύματος οξικού νατρίου (sodium acetate buffer) με pH = 3.8, 0.1 mL α -αμυλάσης (α -amylase) και 0,1 mL αμυλογλουκοσιδάσης (AMG: amyloglucosidase).
6. Τα δείγματα αναδεύονται και τοποθετούνται σε υδατόλουτρο σε θερμοκρασία 50 °C για 30 min με παράλληλη ανάδευση τους κάθε 10 min. Μετά το πέρας των 30 min τα δείγματα τοποθετούνται για φυγοκέντρηση για 10 min, με ταχύτητα φυγοκέντρησης 3000 rpm, στη συσκευή φυγοκέντρησης IEC/ CENTRA CL2 (Εικόνα 19).



Εικόνα 19: Συσκευή φυγοκέντρησης IEC/Centra CL2

7. Μετά τη φυγοκέντρηση ακολουθείται η μέθοδος προσδιορισμού της ελεύθερης γλυκόζης GOD/PAP στο υπερκείμενο υγρό: Το υπερκείμενο υγρό αραιώνεται με λόγο αραιώσης 1:5 και στη συνέχεια για κάθε δείγμα συμπεριλαμβανομένων και των τυφλών, ετοιμάζονται δύο δοκιμαστικοί σωλήνες στους οποίους προστίθενται 0.1 mL αραιωμένου διαλύματος και 2 mL διαλύματος εργασίας. Οι δοκιμαστικοί σωλήνες επάζονται για 15 min σε υδατόλουτρο και τέλος φωτομετρώνται σε μήκος κύματος 510 nm, μετά από ανάδευση στη συσκευή ανάδευσης Vortex Genie 2 και μηδενισμό του φωτόμετρου με απιονισμένο νερό.

Οι μετρούμενες απορροφήσεις εισάγονται στην κατασκευασθείσα καμπύλη αναφοράς της γλυκόζης, με τη μέθοδο GOD/PAP, και στη συνέχεια υπολογίζεται η συγκέντρωση του αμύλου, με βάση τις σχέσεις που ακολουθούν.

$$\text{Γλυκόζη (\% κ. β.)} = \frac{(0.71 * ABS_{mean} * D * 10.4) * 10^{-3}}{initial\ solid} * 100\%$$

$$\text{Ολικό άμυλο (\% κ. β.)} = 0.9 * \text{Γλυκόζη (\% κ. β.)}$$

Όπου,

ABS_{mean} = ο μέσος όρος απορρόφησης

D = η αραιώση που έχει πραγματοποιηθεί στο διάλυμα (D=1 όταν το διάλυμα παραμένει χωρίς αραιώση, D=5 όταν η αραιώση είναι 1:5 και D=10 όταν η αραιώση είναι 1:10)

10.4 mL = προκαθορισμένη τιμή

initial solid = η μάζα του δείγματος, η οποία προκύπτει μετά από αναγωγή, στο δείγμα πριν την εκχύλιση, της μάζας του στερεού υπολείμματος (μετά την εκχύλιση)

$$0.9 = \frac{Mr_{glucose}}{Mr_{starch}}$$

3.3.13 Προσδιορισμός λιπών και ελαίων

Τα όργανα και τα αντιδραστήρια που απαιτούνται για τον προσδιορισμό των λιπαρών του δείγματος είναι: Διάταξη Soxhlet, αναλυτικός ζυγός με ακρίβεια 0.1 mg, ξηραντήρας (με silica gel), πυρήνες βρασμού, γυάλινοι ηθμοί, οργανικός διαλύτης (n-εξάνιο), στήλη απόσταξης, σφαιρική φιάλη.

Η συσκευή Soxhlet αποτελείται από (α) τον υποδοχέα, (β) τον εκχυλιστήρα και (γ) το συμπυκνωτήρα/ψυκτήρα.

Τα βήματα της διαδικασίας που ακολουθούνται βρίσκονται παρακάτω:

1. Ζυγίζεται αρχική ποσότητα δείγματος και τοποθετείται στην χαρτούσα. Παράλληλα με την ζύγιση της πρώτης ύλης, ζυγίζεται η σφαιρική φιάλη που θα χρησιμοποιηθεί μαζί με πυρήνες βρασμού.
2. Η χαρτούσα τοποθετείται στην διάταξη εκχύλισης Soxhlet, η οποία λειτουργεί με διάλυμα κανονικού εξανίου.
3. Η διεργασία της εκχύλισης τίθεται σε λειτουργία διαβιβάζοντας νερό στον ψυκτήρα και θερμαίνοντας τον υποδοχέα.
4. Η εκχύλιση των λιπαρών διαρκεί 5 ώρες οι οποίες μετρούνται μετά τον πρώτο σιφονισμό του διαλύτη.
5. Μετά το πέρας των 5 ωρών απομακρύνεται η χαρτούσα από τη συσκευή και ακολουθεί απόσταξη του εξανίου για διαχωρισμό των λιπών και ελαίων.
6. Η σφαιρική φιάλη, που περιέχει πλέον τα λίπη και έλαια, τοποθετείται σε φούρνο με ρεύμα αέρα (Εικόνα 9) στους 80 °C για 10 λεπτά.
7. Στην συνέχεια, η σφαιρική φιάλη τοποθετείται σε ξηραντήρα με silica gel για 5 λεπτά και ζυγίζεται ξανά.

Η συγκέντρωση των λιπών και ελαίων (wt %) στην πρώτη ύλη υπολογίζεται ως εξής:

$$\% \text{Λιπαρά} = \frac{(W\varphi, \text{μετά} - W\varphi, \text{πριν})}{W\text{δείγμα}} * 100\%$$

Όπου,

$W\varphi, \text{πριν}$ = Η μάζα της σφαιρικής φιάλης μαζί με τους πυρήνες βρασμού αρχικά.

Wφ,μετά = Η μάζα της σφαιρικής φιάλης μαζί με τους πυρήνες βρασμού και τα έλαια που συλλέχθηκαν μετά την διεργασία.

Wδείγμα = Η μάζα του δείγματος που ζυγίστηκε αρχικά.

3.3.14 Προσδιορισμός πτητικών λιπαρών οξέων (VFAs)

Η μέτρηση αυτή πραγματοποιείται στο φωτόμετρο Spectroquant Pharo 300 Merck όπου μετριέται η συγκέντρωση των VFAs με χρήση του κατάλληλου πακέτου αντιδραστηρίων του εργαστηρίου Spectroquant Volatile Organic Acids Test 1018909 (Merck KGaA, Mellipore, Germany). Κάθε δείγμα είναι αραιωμένο 50 φορές.

Αρχή της μεθόδου: η μέθοδος βασίζεται στην αντίδραση των πτητικών οργανικών οξέων που περιέχονται στο δείγμα με διόλη, σε όξινο μέσο, προς σχηματισμό εστέρων λιπαρών οξέων. Αυτοί, στη συνέχεια, μετατρέπονται σε υδροξαμικά οξέα, αντιδρώντας με υδροξυλαμίνη. Ακολούθως αντιδρούν με ιόντα σιδήρου προς σχηματισμό κοκκινόχρωμων συμπλεγμάτων, τα οποία προσδιορίζονται φωτομετρικά. Η περιοχή μέτρησης κυμαίνεται στα 50- 3000mg/L VFAs, υπολογισμένα ως οξικό οξύ.

Τα βήματα της μεθόδου περιλαμβάνουν:

1. Έλεγχο του pH του δείγματος, ώστε να είναι pH 2-12.
2. Προσθήκη με πιπέτα σε μια καθαρή κυλινδρική κυψελίδα 0,75mL αντιδραστηρίου OA-1.
3. Προσθήκη με πιπέτα στην κυψελίδα 0,5mL αντιδραστηρίου OA-2.
4. Προσθήκη με πιπέτα στην κυψελίδα 0,5mL δείγματος. Βιδώνεται το καπάκι και αναμιγνύεται.
5. Η κυψελίδα τοποθετείται σε θερμοαντιδραστήρα στους 100°C για 15 λεπτά. Κατόπιν, ψύχεται κάτω από τρεχούμενο νερό στη θερμοκρασία του περιβάλλοντος χώρου.
6. Προσθήκη με πιπέτα στην κυψελίδα από 1 mL αντιδραστηρίου OA-3, OA-4 και OA-5.
7. Χρόνος αντίδρασης 1 λεπτό.
8. Η κυψελίδα εισάγεται στον υποδοχέα του φωτόμετρου και μετράται βάσει της καταχωρημένης μεθόδου με αριθμό 223.

3.3.15 Προσδιορισμός φαινολών

Η μέτρηση αυτή πραγματοποιείται στο φωτόμετρο Spectroquant Pharo 300 Merck όπου μετριέται η συγκέντρωση των VFAs με χρήση του κατάλληλου πακέτου αντιδραστηρίων του εργαστηρίου Spectroquant Phenol Test 100856 (Merck KGaA, Mellipore, Germany). Κάθε δείγμα αραιώνεται 50 ή 250 φορές, ανάλογα με το δείγμα.

Σε ρυθμισμένο διάλυμα, παρουσία οξειδωτικού παράγοντα, οι φαινόλες και τα συστατικά της, αντιδρούν με 4-αμινο-αντιπυρίνη προς σχηματισμό κοκκινόχρωμου συστατικού, το οποίο προσδιορίζεται φωτομετρικά. Περιοχή μέτρησης 0,025- 5,000 mg/L C₆H₅OH. Τα βήματα της μεθόδου περιλαμβάνουν:

1. Έλεγχο της τιμής pH του δείγματος, ώστε να είναι pH 2-11.
2. Εισαγωγή 10 mL δείγματος με μια πιπέτα σε ένα δοκιμαστικό σωλήνα.
3. Προσθήκη με πιπέτα 1 mL αντιδραστηρίου Ph-1, και ακόλουθη ανάμιξη.
4. Προσθήκη 1 κοφτό κουταλάκι του αντιδραστηρίου Ph-2.
5. Καλή ανακίνηση για τη διάλυση της στερεάς ουσίας.
6. Προσθήκη 1 κοφτό μικρό κουταλάκι του αντιδραστηρίου Ph-3 και καλή ανακίνηση για διάλυση της στερεάς ουσίας.
7. Αντίδραση των δειγμάτων για 10 λεπτά.
8. Μεταφορά του δείγματος στην ειδική κυψελίδα.

Επιλέγεται η μέθοδος 0,025-5,00mg/l με τον AutoSelector του φωτόμετρου, η κυψελίδα τοποθετείται στον υποδοχέα και ακολουθεί φωτομέτρηση.

3.3.16 Προσδιορισμός αιθανόλης

Ο προσδιορισμός της αιθανόλης λαμβάνει χώρα σε δείγματα μετά το στάδιο της ζύμωσης. Η μέθοδος περιλαμβάνει την χρήση του κατάλληλου πακέτου αντιδραστηρίων του εργαστηρίου (Megazyme 2018). Τα βήματα είναι τα εξής:

1. Εισαγωγή 2 mL αντιδραστηρίου Reagent 1 σε ένα δοκιμαστικό σωλήνα.
2. Προσθήκη με πιπέτα 0.10 mL του υγρού δείγματος ή απιονισμένου νερού στην περίπτωση του λευκού (Blank).
3. Προσθήκη με πιπέτα 0.5 mL του αντιδραστηρίου Reagent 2 ύστερα από αναμονή 3 λεπτών.
4. Μεταφορά του δείγματος σε κυψελίδα και φωτομέτρηση σε μήκος κύματος 340 nm.

4 Πειραματικές δοκιμές και Αποτελέσματα

Η σύνθεση των δειγμάτων και η απόδοση της συνολικής διεργασίας της ζύμωσης για την παραγωγή αιθανόλης εξαρτάται σε μεγάλο βαθμό από τις συστάσεις της βιομάζας καθώς επίσης και τις συνθήκες που επικρατούν τόσο κατά την διαδικασία της προκατεργασίας των δειγμάτων όσο και κατά την ενζυμική υδρόλυση. Οι παράμετροι που μελετήθηκαν στην πειραματική διαδικασία αφορούν την χρήση οξέος ή βάσης για την προ-επεξεργασία των δειγμάτων, τον χρόνο όξινης ή αλκαλικής υδρόλυσης, τη συγκέντρωση του οξέος ή της βάσης που χρησιμοποιείται κάθε φορά, το είδος και τη δοσολογία του ενζύμου καθώς και το χρόνο της ενζυμικής υδρόλυσης.

4.1 Χαρακτηριστικά πρώτης ύλης

Σε πρώτο στάδιο γίνεται χαρακτηρισμός της πρώτης ύλης που χρησιμοποιήθηκε για την διεξαγωγή των πειραμάτων. Στον παρακάτω πίνακα παρουσιάζεται η σύσταση τόσο των εξαντλημένων κόκκων καφέ όσο και των εξαντλημένων κόκκων κριθαριού όπως μετρήθηκε σύμφωνα με τις μεθόδους ανάλυσης που αναφέρονται στο Κεφάλαιο 3:

Πίνακας 11: Σύσταση πρώτης ύλης SCG και BSG.

Σύσταση (%wt)	SCG	BSG
Υδατοδιαλυτά στερεά (WSS)	9.85	11.42
Κυτταρίνη	9.17	19.19
Ημικυτταρίνη	50.54	29.62
Άμυλο	0.14	4.28
Διαλυτή λιγνίνη (ASL)	1.79	1.59
Μη διαλυτή λιγνίνη (AIL)	24.07	4.28
Λίπη και έλαια	17.55	6.22
Πτητικά στερεά (VS)	99.40	97.90

Αξίζει να σημειωθεί πως τα αποτελέσματα που απεικονίζονται στον Πίνακα 11 βρίσκονται μέσα στα όρια που έχουν αντληθεί από βιβλιογραφικές πηγές (Πίνακες 1, 6 και 8).

4.2 Πρωτογενή πειραματικά αποτελέσματα

Με την διαθέσιμη πρώτη ύλη, η οποία χαρακτηρίστηκε ως προς την σύσταση της, πραγματοποιούνται οι επιμέρους πειραματικές δοκιμές για την μελέτη των διαφορετικών πειραματικών παραμέτρων που επηρεάζουν την συνολική απόδοση της διεργασίας ως προς την παραγωγή βιοαιθανόλης.

4.2.1 Πρώτη σειρά πειραματικών δοκιμών

Αρχικά χρησιμοποιήθηκε ως μεταβλητή παράμετρος η αναλογία της πρώτης ύλης σε εξαντλημένους κόκκους καφέ και εξαντλημένους σπόρους κριθαριού. Έτσι χρησιμοποιώντας σταθερή ποσότητα διαλύματος προ-επεξεργασίας NaOH 0.5 M καθώς και με ίδιες ποσότητες ενζύμου Cellic CTec2, αναλύθηκαν ξεχωριστά δείγματα διαφορετικών μιγμάτων SCG και BSG με ή χωρίς την χρήση ενζύμου ως προς την παραγωγή αιθανόλης σε διάταξη μικρής εργαστηριακής κλίμακας (Εικόνα 5). Παρακάτω παρουσιάζεται ο συγκεντρωτικός πίνακας των πειραματικών συνθηκών που επικρατούν σε κάθε δείγμα που μελετήθηκε στην πρώτη σειρά πειραμάτων:

Πίνακας 12: Σειρά πειραματικών δοκιμών για τροφοδοσία διαφορετικών μιγμάτων BSG/SCG προ-επεξεργασμένη με NaOH 0.5M.

A/A	Πρώτη ύλη	1ο στάδιο: Προ-επεξεργασία 5hr στους 50 οC	2ο Στάδιο: Ενζυμική υδρόλυση	3ο Στάδιο: Ζύμωση
A11	Defatted dry BSG	10 mL/g πρώτης ύλης NaOH 0.5M	Όχι	Όχι
A12	Defatted dry BSG	10 mL/g πρώτης ύλης NaOH 0.5M	Όχι	Όχι
A13	Defatted dry BSG	10 mL/g πρώτης ύλης NaOH 0.5M	Όχι	2% wt ξηρή μαγιά
A14	Defatted dry BSG	10 mL/g πρώτης ύλης NaOH 0.5M	Όχι	2% wt ξηρή μαγιά
A15	Defatted dry BSG	10 mL/g πρώτης ύλης NaOH 0.5M	Cellic Ctec2, 400μL/g αρχ. κυτταρίνης	2% wt ξηρή μαγιά
A16	Defatted dry BSG	10 mL/g πρώτης ύλης NaOH 0.5M	Cellic Ctec2, 400μL/g αρχ. κυτταρίνης	2% wt ξηρή μαγιά
A21	Defatted SCG	10 mL/g πρώτης ύλης NaOH 0.5M	Όχι	Όχι
A22	Defatted SCG	10 mL/g πρώτης ύλης NaOH 0.5M	Όχι	Όχι

4.2 Πειραματικές δοκιμές και Αποτελέσματα: Πρωτογενή πειραματικά αποτελέσματα

A23	Defatted SCG	10 mL/g πρώτης ύλης NaOH 0.5M	Όχι	2% wt ξηρή μαγιά
A24	Defatted SCG	10 mL/g πρώτης ύλης NaOH 0.5M	Όχι	2% wt ξηρή μαγιά
A25	Defatted SCG	10 mL/g πρώτης ύλης NaOH 0.5M	Cellic Ctec2, 400μL/g αρχ. κυτταρίνης	2% wt ξηρή μαγιά
A26	Defatted SCG	10 mL/g πρώτης ύλης NaOH 0.5M	Cellic Ctec2, 400μL/g αρχ. κυτταρίνης	2% wt ξηρή μαγιά
A31	BSG/SCG 50:50	10 mL/g πρώτης ύλης NaOH 0.5M	Όχι	Όχι
A32	BSG/SCG 50:50	10 mL/g πρώτης ύλης NaOH 0.5M	Όχι	Όχι
A33	BSG/SCG 50:50	10 mL/g πρώτης ύλης NaOH 0.5M	Όχι	2% wt ξηρή μαγιά
A34	BSG/SCG 50:50	10 mL/g πρώτης ύλης NaOH 0.5M	Όχι	2% wt ξηρή μαγιά
A35	BSG/SCG 50:50	10 mL/g πρώτης ύλης NaOH 0.5M	Cellic Ctec2, 400μL/g αρχ. κυτταρίνης	2% wt ξηρή μαγιά
A36	BSG/SCG 50:50	10 mL/g πρώτης ύλης NaOH 0.5M	Cellic Ctec2, 400μL/g αρχ. κυτταρίνης	2% wt ξηρή μαγιά
A41	BSG/SCG 80:20	10 mL/g πρώτης ύλης NaOH 0.5M	Όχι	Όχι
A42	BSG/SCG 80:20	10 mL/g πρώτης ύλης NaOH 0.5M	Όχι	Όχι
A43	BSG/SCG 80:20	10 mL/g πρώτης ύλης NaOH 0.5M	Όχι	2% wt ξηρή μαγιά
A44	BSG/SCG 80:20	10 mL/g πρώτης ύλης NaOH 0.5M	Όχι	2% wt ξηρή μαγιά
A45	BSG/SCG 80:20	10 mL/g πρώτης ύλης NaOH 0.5M	Cellic Ctec2, 400μL/g αρχ. κυτταρίνης	2% wt ξηρή μαγιά
A46	BSG/SCG 80:20	10 mL/g πρώτης ύλης NaOH 0.5M	Cellic Ctec2, 400μL/g αρχ. κυτταρίνης	2% wt ξηρή μαγιά
A51	BSG/SCG 20:80	10 mL/g πρώτης ύλης NaOH 0.5M	Όχι	Όχι
A52	BSG/SCG 20:80	10 mL/g πρώτης ύλης NaOH 0.5M	Όχι	Όχι
A53	BSG/SCG 20:80	10 mL/g πρώτης ύλης NaOH 0.5M	Όχι	2% wt ξηρή μαγιά
A54	BSG/SCG 20:80	10 mL/g πρώτης ύλης NaOH 0.5M	Όχι	2% wt ξηρή μαγιά
A55	BSG/SCG 20:80	10 mL/g πρώτης ύλης NaOH 0.5M	Cellic Ctec2, 400μL/g αρχ. κυτταρίνης	2% wt ξηρή μαγιά
A56	BSG/SCG 20:80	10 mL/g πρώτης ύλης NaOH 0.5M	Cellic Ctec2, 400μL/g αρχ. κυτταρίνης	2% wt ξηρή μαγιά

4.2 Πειραματικές δοκιμές και Αποτελέσματα: Πρωτογενή πειραματικά αποτελέσματα

Μετά την ολοκλήρωση κάθε πειράματος, τα δείγματα διαχωρίστηκαν με την χρήση συσκευής φυγοκέντρησης (Εικόνα 19) σε υγρό και στερεό κλάσμα και αναλύθηκαν ξεχωριστά σύμφωνα με τις μεθόδους ανάλυσης που αναφέρονται στο Κεφάλαιο 3. Σημειώνεται πως στα μίγματα που χρησιμοποιήθηκαν έχουν προηγουμένως αφαιρεθεί τα λίπη και έλαια σύμφωνα με την διαδικασία που περιγράφεται στην Παράγραφο 3.2.1.2. Τα πρωτογενή αποτελέσματα αναλύσεων τόσο του υγρού όσο και του στερεού κλάσματος, καθώς και η σύσταση των μιγμάτων σε λίπη και έλαια, βρίσκονται παρακάτω:

Πίνακας 13: Σύσταση μιγμάτων σε λίπη και έλαια.

A/A	Λίπη και έλαια
A1	3.43%
A2	9.57%
A3	7.08%
A4	4.58%
A5	8.26%

Πίνακας 14: Ανάλυση υγρού κλάσματος της πρώτης σειράς πειραμάτων.

A/A	Όγκος υγρού (mL)	Γλυκόζη (mg/mL)	TRS (mg/mL)	VFA (mg/L)	Φαινόλες (mg/L)	TOC (mg/L)	TN (mg/L)	Αιθανόλη (mg/mL)
A11	130	0.12	1.14	8860	202	18570	1696	0
A12	130	0.10	0.93	7690	173	16170	1487	0
A13	130	0.19	0.80	4920	146	11030	1036	0.46
A14	130	0.24	0.81	5210	142	11710	1166	0.46
A15	132	0.31	2.02	9460	192	0	0	0.65
A16	114	0.32	2.24	9700	195	0	0	0.75
A21	100	0.57	2.36	11170	296	13830	927.9	0
A22	100	0.62	2.34	9860	282	13010	871.8	0
A23	100	0.38	2.33	7930	279	11360	877.4	0.87
A24	100	0.42	1.96	7860	267	10870	813.6	0.89
A25	100	0.55	2.99	12480	78	15930	1449	0.99
A26	100	0.52	2.87	11770	122	15170	1421	1.1
A31	90	0.06	0.45	1550	52	4359	213.4	0
A32	95	0.07	0.42	1620	60	4299	207.5	0
A33	104	0.04	0.41	1380	43	0	0	0.13
A34	104	0.04	0.43	1370	40	0	0	0.14
A35	88	0.04	2.74	1870	42	0	0	1.45
A36	85	0.05	2.50	2290	42	0	0	1.35

4.2 Πειραματικές δοκιμές και Αποτελέσματα: Πρωτογενή πειραματικά αποτελέσματα

A41	80	0.04	0.36	1490	28	3848	171.3	0
A42	95	0.03	0.21	1530	26	3491	154.2	0
A43	118	0.05	0.36	1720	35	2906	209.7	0.11
A44	104	0.04	0.44	1690	32	2751	195.6	0.13
A45	112	0.04	2.49	2640	37	6128	310.5	1.4
A46	98	0.06	2.72	2440	33	6384	360	1.2
A51	120	0.17	1.07	3630	119	5799	270.6	0
A52	124	0.26	1.03	5070	135	6254	294.3	0
A53	128	0.15	0.96	2770	127	4820	298.7	0.19
A54	178	0.13	0.72	2080	82	3728	214.7	0.16
A55	128	0.14	3.07	2950	119	6335	319.9	2.1
A56	138	0.16	2.74	2960	113	6248	328.6	0.9

Πίνακας 15: Ανάλυση στερεού κλάσματος της πρώτης σειράς πειραμάτων.

A/A	Αρχική ποσότητα στερεού (g)	Τελική ποσότητα στερεού (g)	WSS (%wt)	Κυτταρίνη (g/100g TS)	Ημικυτταρίνη (g/100g TS)	Άμυλο (g/100g TS)	AIL (g/100g TS)	ASL (g/100g TS)
A11	9.98	7.14	35.77	26.76	24.35	0.95	21.67	1.23
A12	10.05	7.33	33.56	26.79	23.93	0.49	21.73	1.25
A13	9.95	7.93	28.53	25.07	23.07	1.38	23.79	1.68
A14	10.13	7.77	25.26	26.65	24.38	1.29	22.98	1.79
A15	10.03	8.30	47.90	16.68	22.43	0.49	14.15	0.87
A16	9.94	7.28	33.81	15.56	19.70	0.62	29.23	0.63
A21	9.98	8.31	23.96	32.43	29.99	0.07	20.06	1.02
A22	10.01	8.29	30.26	30.89	28.58	0.07	14.83	0.90
A23	10.00	8.71	23.10	32.19	29.78	0.08	19.07	1.03
A24	9.97	8.67	19.75	33.15	30.64	0.04	19.79	1.05
A25	9.93	8.29	18.80	14.70	57.01	0.04	20.82	0.76
A26	10.27	8.60	20.30	11.05	45.85	0.14	31.97	0.60
A31	10.02	9.59	9.69	12.99	43.89	2.67	20.30	1.59
A32	9.99	9.40	11.58	15.83	36.89	2.13	19.13	1.58
A33	9.98	9.80	8.48	21.93	48.09	2.81	20.36	1.48
A34	10.02	10.12	13.19	17.75	38.20	2.47	21.10	1.25
A35	10.01	10.84	20.75	14.63	29.73	1.93	21.39	1.53
A36	10.03	9.44	35.78	9.59	27.52	0.82	16.35	1.22
A41	10.06	10.01	17.20	13.39	33.63	4.40	15.61	1.80
A42	10.05	9.94	15.81	14.19	37.13	3.87	17.68	1.65
A43	10.03	9.76	10.75	17.64	45.24	3.02	19.84	1.57
A44	9.98	9.75	6.31	20.64	42.38	4.01	23.82	1.81
A45	10.06	9.20	10.52	17.37	34.02	3.46	21.18	1.72

A46	10.01	9.43	11.87	16.39	34.35	4.19	22.66	1.68
A51	10.07	9.20	16.56	15.03	39.76	0.93	20.04	1.17
A52	10.00	9.14	15.85	14.11	43.35	0.79	20.77	1.11
A53	10.01	9.26	9.97	13.99	41.93	1.08	23.64	1.49
A54	10.04	9.25	9.00	14.50	41.45	0.71	24.37	1.55
A55	10.00	8.78	12.77	11.36	37.95	0.59	26.11	1.40
A56	10.01	8.84	13.90	10.25	37.35	0.51	26.19	1.37

4.2.2 Δεύτερη σειρά πειραματικών δοκιμών

Στην δεύτερη σειρά πειραμάτων, μελετήθηκε η ξεχωριστή προ-επεξεργασία των πρώτων υλών SCG και BSG και η ανάμειξη τους μετά το 1^ο αυτό στάδιο καθώς και η χρήση των ενζύμων κυτταρινάσης Cellic CTec2 και NS 22177 στα μίγματα που προέκυψαν στο 2^ο στάδιο της ενζυμικής υδρόλυσης. Η πρώτη ύλη που χρησιμοποιήθηκε είναι ίδια με εκείνη που χρησιμοποιήθηκε στα πειράματα A1 και A2 της πρώτης σειράς πειραμάτων, ενώ οι πειραματικές δοκιμές έλαβαν χώρα σε μικρή εργαστηριακή κλίμακα (Εικόνα 5). Η δεύτερη σειρά πειραματικών δοκιμών παρουσιάζεται αναλυτικά στον επόμενο Πίνακα:

4.2 Πειραματικές δοκιμές και Αποτελέσματα: Πρωτογενή πειραματικά αποτελέσματα

Πίνακας 16: Δεύτερη σειρά πειραματικών δοκιμών για τα μίγματα SCG/BSG μετά από ξεχωριστή προ-επεξεργασία.

A/A	Πρώτη ύλη	1ο στάδιο: Προ-επεξεργασία 5h στους 50 °C	2ο Στάδιο: Ενζυμική υδρόλυση 5h στους 50 °C	3ο Στάδιο: Ζύμωση
B11	10g Defatted dry SCG	10 mL/g πρώτης ύλης NaOH 0.5M	Όχι	Όχι
B12	10g Defatted dry BSG	10 mL/g πρώτης ύλης H ₂ SO ₄ 0.25M	Όχι	Όχι
B21	10g Defatted dry SCG	10 mL/g πρώτης ύλης NaOH 0.5M	Όχι	2% wt ξηρή μαγιά
B22	10g Defatted dry BSG	10 mL/g πρώτης ύλης H ₂ SO ₄ 0.25M		
B31	10g Defatted dry SCG	10 mL/g πρώτης ύλης NaOH 0.5M	Cellic Ctec2, 400μL/g αρχ. κυτταρίνης	2% wt ξηρή μαγιά
B32	10g Defatted dry BSG	10 mL/g πρώτης ύλης H ₂ SO ₄ 0.25M		
B41	10g Defatted dry SCG	10 mL/g πρώτης ύλης NaOH 0.5M	NS 22177, 175μL/g αρχ. κυτταρίνης	2% wt ξηρή μαγιά
B42	10g Defatted dry BSG	10 mL/g πρώτης ύλης H ₂ SO ₄ 0.25M		

Στην δεύτερη σειρά πειραμάτων τα δείγματα B21 και B22, B31 και B32, B41 και B42 αναμειχθηκαν μετά το πέρας του 1^{ου} σταδίου και τα 3 μίγματα που προέκυψαν συνέχισαν στο 2^ο και 3^ο στάδιο. Μετά το πέρας όλων των πειραμάτων ακολούθησε χαρακτηρισμός τόσο του στερεού όσο και του υγρού κλάσματος όπως έγινε και μετά το τέλος της πρώτης σειράς πειραμάτων. Τα αποτελέσματα παρουσιάζονται παρακάτω:

Πίνακας 17: Ανάλυση υγρού κλάσματος της δεύτερης σειράς πειραμάτων.

A/A	Όγκος υγρού (mL)	Γλυκόζη (mg/mL)	TRS (mg/mL)	VFA (mg/L)	Φαινόλες (mg/L)	TOC (mg/L)	TN (mg/L)	Αιθανόλη (mg/mL)
B11	125	0.72	N.D.	7280	2.38	12170	696.9	0
B12	100	0.02	0.13	1060	0.26	3824	146	0
B2	214	0.21	0.97	470	0.99	6923	480.9	0.4
B3	194	0.25	5.13	4610	1.16	12510	695.3	2.6
B4	190	0.25	5.38	5110	1.19	12670	677.9	2

Πίνακας 18: Ανάλυση στερεού κλάσματος της δεύτερης σειράς πειραμάτων.

A/A	Αρχική ποσότητα στερεού (g)	Τελική ποσότητα στερεού (g)	WSS (%wt)	Κυτταρίνη (g/100g TS)	Ημικυτταρίνη (g/100g TS)	Άμυλο (g/100g TS)	AIL (g/100g TS)	ASL (g/100g TS)
B11	10.03	7.87	29.13	12.72	39.60	0.01	16.25	0.84
B12	10.02	8.70	21.04	13.25	4.94	0.73	43.41	1.26
B2	20.23	16.84	13.97	14.93	36.01	3.01	27.09	1.52
B3	20.01	14.57	14.33	11.44	28.30	2.32	29.28	1.84
B4	20.17	14.76	15.67	15.33	29.96	1.79	29.17	1.61

4.2.3 Τρίτη σειρά πειραματικών δοκιμών

Στην τρίτη σειρά πειραμάτων, μελετήθηκε η επίδραση που έχουν διάφορες παράμετροι ξεχωριστά στην συνολική διεργασία της ζύμωσης. Συγκεκριμένα, διεξήχθησαν τέσσερις διαφορετικές δοκιμές όμοιες με την δεύτερη σειρά πειραμάτων, μόνο που σε κάθε δοκιμή μεταβλήθηκε μία από τις παρακάτω παραμέτρους:

1. Μεταβολή διάρκειας προ-επεξεργασίας της πρώτης ύλης με NaOH (για το SCG) ή H₂SO₄ (για το BSG) από 5h σε 16h.
2. Μεταβολή διάρκειας ενζυμικής υδρόλυσης από 5h σε 16h.
3. Αύξηση χρησιμοποιούμενης ποσότητας ενζύμου για το στάδιο της ενζυμικής υδρόλυσης (800μL/g αρχικής κυτταρίνης από 400μL/g Cellic CTec2 και 250 μL/g αρχικής κυτταρίνης από 175μL/g NS 22177).
4. Προ-επεξεργασία πρώτης ύλης με πυκνότερα διαλύματα (NaOH 1M και H₂SO₄ 0.5M).

Η πρώτη ύλη που χρησιμοποιήθηκε για την διεξαγωγή της τρίτης σειράς πειραμάτων είναι ίδια με εκείνη που χρησιμοποιήθηκε και για την δεύτερη σειρά, ενώ τα πειράματα έλαβαν χώρα σε μικρή εργαστηριακή κλίμακα (Εικόνα 5). Οι πειραματικές δοκιμές της τρίτης σειράς παρουσιάζονται αναλυτικά στον επόμενο Πίνακα:

4.2 Πειραματικές δοκιμές και Αποτελέσματα: Πρωτογενή πειραματικά αποτελέσματα

Πίνακας 19: Τρίτη σειρά πειραματικών δοκιμών για τα μίγματα SCG/BSG μετά από ξεχωριστή προ-επεξεργασία και με αλλαγή μίας μεταβλητής κάθε φορά.

A/A	Πρώτη ύλη	1ο στάδιο: Προ-επεξεργασία στους 50 °C	2ο Στάδιο: Ενζυμική υδρόλυση στους 50 °C	3ο Στάδιο: Ζύμωση
C1.11	Defatted dry SCG	10 mL/g πρώτης ύλης NaOH 0.5M για 16 h	Όχι	Όχι
C1.12	Defatted dry BSG	10 mL/g πρώτης ύλης H ₂ SO ₄ 0.25M για 16 h	Όχι	Όχι
C1.21	Defatted dry SCG	10 mL/g πρώτης ύλης NaOH 0.5M για 16 h	Όχι	2% wt ξηρή μαγιά
C1.22	Defatted dry BSG	10 mL/g πρώτης ύλης H ₂ SO ₄ 0.25M για 16 h		
C1.31	Defatted dry SCG	10 mL/g πρώτης ύλης NaOH 0.5M για 16 h	Cellic Ctec2, 400μL/g αρχ. Κυτταρίνης, 5h	2% wt ξηρή μαγιά
C1.32	Defatted dry BSG	10 mL/g πρώτης ύλης H ₂ SO ₄ 0.25M για 16 h		
C1.41	Defatted dry SCG	10 mL/g πρώτης ύλης NaOH 0.5M για 16 h	NS 22177, 175μL/g αρχ. Κυτταρίνης, 5h	2% wt ξηρή μαγιά
C1.42	Defatted dry BSG	10 mL/g πρώτης ύλης H ₂ SO ₄ 0.25M για 16 h		
C2.11	Defatted dry SCG	10 mL/g πρώτης ύλης NaOH 0.5M για 5h	Όχι	Όχι
C2.12	Defatted dry BSG	10 mL/g πρώτης ύλης H ₂ SO ₄ 0.25M για 5h	Όχι	Όχι
C2.21	Defatted dry SCG	10 mL/g πρώτης ύλης NaOH 0.5M για 5h	Όχι	2% wt ξηρή μαγιά
C2.22	Defatted dry BSG	10 mL/g πρώτης ύλης H ₂ SO ₄ 0.25M για 5h		
C2.31	Defatted dry SCG	10 mL/g πρώτης ύλης NaOH 0.5M για 5h	Cellic Ctec2, 400μL/g αρχ. Κυτταρίνης, 16h	2% wt ξηρή μαγιά
C2.32	Defatted dry BSG	10 mL/g πρώτης ύλης H ₂ SO ₄ 0.25M για 5h		
C2.41	Defatted dry SCG	10 mL/g πρώτης ύλης NaOH 0.5M για 5h	NS 22177, 175μL/g αρχ. Κυτταρίνης, 16h	2% wt ξηρή μαγιά
C2.42	Defatted dry BSG	10 mL/g πρώτης ύλης H ₂ SO ₄ 0.25M για 5h		
C3.11	Defatted dry SCG	10 mL/g πρώτης ύλης NaOH 0.5M για 5h	Όχι	Όχι
C3.12	Defatted dry BSG	10 mL/g πρώτης ύλης H ₂ SO ₄ 0.25M για 5h	Όχι	Όχι
C3.21	Defatted dry SCG	10 mL/g πρώτης ύλης NaOH 0.5M για 5h	Όχι	2% wt ξηρή μαγιά
C3.22	Defatted dry BSG	10 mL/g πρώτης ύλης H ₂ SO ₄ 0.25M για 5h		
C3.31	Defatted dry SCG	10 mL/g πρώτης ύλης NaOH 0.5M για 5h	Cellic Ctec2, 800μL/g αρχ. Κυτταρίνης, 5h	2% wt ξηρή μαγιά
C3.32	Defatted dry BSG	10 mL/g πρώτης ύλης H ₂ SO ₄ 0.25M για 5h		
C3.41	Defatted dry SCG	10 mL/g πρώτης ύλης NaOH 0.5M για 5h	NS 22177, 250μL/g αρχ. Κυτταρίνης, 5h	2% wt ξηρή μαγιά
C3.42	Defatted dry BSG	10 mL/g πρώτης ύλης H ₂ SO ₄ 0.25M για 5h		
C4.11	Defatted dry SCG	10 mL/g πρώτης ύλης NaOH 1M για 5h	Όχι	Όχι
C4.12	Defatted dry BSG	10 mL/g πρώτης ύλης H ₂ SO ₄ 0.5M για 5h	Όχι	Όχι
C4.21	Defatted dry SCG	10 mL/g πρώτης ύλης NaOH 1M για 5h	Όχι	2% wt ξηρή μαγιά
C4.22	Defatted dry BSG	10 mL/g πρώτης ύλης H ₂ SO ₄ 0.5M για 5h		
C4.31	Defatted dry SCG	10 mL/g πρώτης ύλης NaOH 1M για 5h	Cellic Ctec2, 400μL/g αρχ. κυτταρίνης	2% wt ξηρή μαγιά
C4.32	Defatted dry BSG	10 mL/g πρώτης ύλης H ₂ SO ₄ 0.5M για 5h		
C4.41	Defatted dry SCG	10 mL/g πρώτης ύλης NaOH 1M για 5h	NS 22177, 175μL/g αρχ. κυτταρίνης	2% wt ξηρή μαγιά
C4.42	Defatted dry BSG	10 mL/g πρώτης ύλης H ₂ SO ₄ 0.5M για 5h		

Όπως και στην δεύτερη σειρά πειραματικών δοκιμών, τα δείγματα προ-επεξεργάστηκαν ξεχωριστά. Η πρώτη ύλη SCG υδρολύθηκε βασικά με NaOH, ενώ οι BSG όξινα με H₂SO₄. Μετά το 1^ο αυτό στάδιο, τα δείγματα αναμείχθηκαν και συνέχισαν στο 2^ο και το 3^ο στάδιο σύμφωνα με τις συνθήκες που

4.2 Πειραματικές δοκιμές και Αποτελέσματα: Πρωτογενή πειραματικά αποτελέσματα

αναφέρονται στον παραπάνω Πίνακα. Μετά το πέρας και των τριών σταδίων, ακολούθησε χαρακτηρισμός τόσο του στερεού όσο και του υγρού κλάσματος όπως έγινε και μετά το τέλος της πρώτης και δεύτερης σειράς πειραμάτων. Τα αποτελέσματα παρουσιάζονται παρακάτω:

Πίνακας 20: Ανάλυση υγρού κλάσματος της τρίτης σειράς πειραμάτων.

A/A	Όγκος υγρού (mL)	Γλυκόζη (mg/mL)	TRS (mg/mL)	VFA (mg/L)	Φαινόλες (mg/L)	TOC (mg/L)	TN (mg/L)	Αιθανόλη (mg/mL)
C1.11	108	0.75	1.81	11240	283	13110	898.2	0
C1.12	117	0.08	4.66	1910	46	5281	222.5	0
C1.2	176	0.43	3.14	7650	157	9986	721.6	0.6
C1.3	176	0.44	8.19	8860	172	14180	822.5	4.8
C1.4	174	0.44	8.54	6420	137	14480	856.5	4
C2.11	100	0.70	N.D.	7450	227	12150	688.6	0
C2.12	100	0.08	1.28	4440	134	5381	298.7	0
C2.2	100	0.30	1.39	7050	77	6533	426.3	1.2
C2.3	69	0.37	6.75	8990	146	14900	784.2	5.2
C2.4	80	0.34	6.72	9080	146	12210	612.5	4
C3.11	100	0.86	N.D.	7280	238	12170	613.5	0
C3.12	100	0.08	0.06	1060	26	3824	614.5	0
C3.2	100	0.28	1.39	6950	103	6282	398.2	1.4
C3.3	73	0.28	7.20	8660	151	14640	791.4	6.4
C3.4	72	0.82	6.39	7110	127	13080	671.1	4.8
C4.11	64	0.96	1.55	10280	251	10420	647.5	0
C4.12	52	0.18	2.49	8290	32	3167	95.9	0
C4.2	96	0.21	3.25	6200	132	7808	561.4	0.4
C4.3	89	0.17	7.25	6600	130	14222	614.2	3.6
C4.4	92	0.21	7.20	6230	140	13023	575.3	0

Πίνακας 21: Ανάλυση στερεού κλάσματος της τρίτης σειράς πειραμάτων.

A/A	Αρχική ποσότητα στερεού (g)	Τελική ποσότητα στερεού (g)	WSS (%wt)	Κυτταρίνη (g/100g TS)	Ημικυτταρίνη (g/100g TS)	Άμυλο (g/100g TS)	AIL (g/100g TS)	ASL (g/100g TS)
C1.11	10.12	7.93	27.38	15.80	49.11	0.05	21.86	1.07
C1.12	10.12	8.78	20.97	19.98	10.81	0.10	30.31	2.47
C1.2	20.45	17.00	13.82	16.34	34.09	4.33	24.64	1.70
C1.3	20.38	17.51	36.28	11.76	18.07	1.32	20.11	1.73
C1.4	20.15	18.11	28.19	10.58	17.60	0.17	25.08	2.26
C2.11	5.01	3.99	16.22	12.65	39.58	0.01	16.20	0.79
C2.12	5.08	8.07	15.42	15.40	26.03	0.35	22.09	1.68
C2.2	9.97	8.19	11.76	16.77	24.47	0.27	27.84	1.75
C2.3	10.09	7.38	18.51	14.59	36.55	0.15	27.56	2.48
C2.4	10.06	7.48	20.25	15.18	34.80	0.18	29.68	2.08
C3.11	5.01	3.93	29.13	12.24	41.72	0.01	18.41	1.23
C3.12	5.02	4.36	21.04	12.73	7.27	0.77	40.68	1.47
C3.2	10.12	8.18	10.95	12.55	24.91	3.39	21.77	1.78
C3.3	10.15	7.48	19.61	12.42	27.74	0.22	97.74	1.88
C3.4	10.09	7.55	23.80	11.35	29.34	0.13	26.32	2.84
C4.11	5.02	3.87	50.16	12.77	33.92	0.07	6.62	0.94
C4.12	5.01	4.65	37.65	2.30	0.15	0.00	49.10	0.50
C4.2	9.97	8.52	22.28	20.97	35.08	0.32	91.65	1.68
C4.3	9.98	7.62	29.92	13.98	27.93	0.14	24.22	1.85
C4.4	10.04	7.89	25.48	14.85	30.20	0.18	23.61	1.45

4.2.4 Τέταρτη σειρά πειραμάτων

Στην τέταρτη και τελευταία σειρά πειραμάτων, χρησιμοποιήθηκε ο συνδυασμός παραμέτρων που μελετήθηκαν στην τρίτη σειρά πειραμάτων, ενώ αυξήθηκε η κλίμακα από μικρή σε μεσαία εργαστηριακή. Τα πειράματα έλαβαν χώρα στην διάταξη των αντιδραστήρων τύπου Batch, όπως φαίνεται στην Εικόνα 5. Για την διεξαγωγή των πειραμάτων, επαναλήφθηκε η χρήση μιγμάτων σε αναλογία BSG/SCG 50:50. Όσο για την πρώτη ύλη που χρησιμοποιήθηκε στην πρώτη πειραματική δοκιμή, D1, χρησιμοποιήθηκε η ήδη υπάρχουσα πρώτη ύλη των πειραμάτων A1 και A2. Αντίθετα, για τις ξηραμένες πρώτες ύλες BSG SCG του πειράματος D2, έχουν προηγουμένως αφαιρεθεί τα λίπη και τα έλαια σύμφωνα με την διαδικασία που περιγράφεται στην Παράγραφο 3.2.1.2. Τα αποτελέσματα της σύστασης των πρώτων υλών σε λίπη και έλαια, πριν την χρήση τους στο πείραμα D2, βρίσκονται παρακάτω:

4.2 Πειραματικές δοκιμές και Αποτελέσματα: Πρωτογενή πειραματικά αποτελέσματα

Πίνακας 22: Σύσταση πρώτων υλών του πειράματος D2 σε λίπη και έλαια.

Πρώτη ύλη	Λίπη και έλαια
SCG	10.79%
BSG	4.76%

Στα πειράματα της τέταρτης σειράς μελετήθηκαν οι παρακάτω συνθήκες:

Πίνακας 23: Τέταρτη σειρά πειραματικών δοκιμών για τα μίγματα SCG/BSG μετά από ξεχωριστή προ-επεξεργασία.

A/A	Πρώτη ύλη	1ο στάδιο: Προ-επεξεργασία στους 50 °C	2ο Στάδιο: Ενζυμική υδρόλυση στους 50 °C	3ο Στάδιο: Ζύμωση
D1.1	150g Defatted dry SCG	10 mL/g πρώτης ύλης NaOH 0.5M για 5h	Cellic Ctec2, 800μL/g αρχ. Κυτταρίνης, 5h	2% wt ξηρή μαγιά, 24h
D1.2	150g Defatted dry BSG	10 mL/g πρώτης ύλης H ₂ SO ₄ 0.25M για 5h		
D2.1	150g Defatted dry SCG	10 mL/g πρώτης ύλης NaOH 0.5M για 16h	Cellic Ctec2, 800μL/g αρχ. Κυτταρίνης, 16h	2% wt ξηρή μαγιά, 72h
D2.2	150g Defatted dry BSG	10 mL/g πρώτης ύλης H ₂ SO ₄ 0.25M για 16h		

Οι δύο αντιδραστήρες λειτούργησαν σε σειρά παράγοντας ξεχωριστά τα προ-επεξεργασμένα δείγματα SCG και BSG. Στην συνέχεια αυτά αναμείχθηκαν και ακολούθησε το 2^ο και 3^ο στάδιο. Οι συνθήκες επιλέχθηκαν μετά από την ολοκλήρωση και την αξιολόγηση των προηγούμενων τριών σειρών πειραμάτων. Όσον αφορά το πείραμα D1, επιλέχθηκε να μην γίνει αλλαγή στον χρόνο της ενζυμικής υδρόλυσης καθώς επίσης και στη διάρκεια της ζύμωσης. Η πειραματική δοκιμή D2, η οποία σχετίζεται και με το υψηλότερο ενεργειακό κόστος, έχει αυξημένη κάθε παράμετρο που σχετίζεται με το χρόνο. Τόσο η προ-επεξεργασία όσο και η ενζυμική υδρόλυση λειτούργησαν για 16 αντί για 5 ώρες. Επιπλέον, στο στάδιο της ενζυμικής υδρόλυσης, χρησιμοποιήθηκε διπλάσια ποσότητα ενζύμου κυτταρινάσης Cellic CTec2, δηλαδή 800 μL/g αρχικής κυτταρίνης. Τέλος, το στάδιο της ζύμωσης έλαβε χώρα για 72 αντί για 24 ώρες. Σημειώνεται πως και στις δύο πειραματικές δοκιμές του τέταρτου κύκλου, δεν συμπεριλήφθηκε η χρήση πυκνότερων διαλυμάτων προ-επεξεργασίας, όπως έγινε στα πειράματα C4.

4.3 Δευτερογενή πειραματικά αποτελέσματα

Για την εκτίμηση της αποτελεσματικότητας της προ-επεξεργασίας και της ενζυμικής υδρόλυσης σε κάθε στάδιο, υπολογίστηκε το ποσοστό της υδρόλυσης των επιμέρους πολυσακχαριτών της κυτταρίνης, της ημικυτταρίνης και της λιγνίνης. Επιπλέον, προσδιορίστηκε η απόδοση της αιθανόλης μετά την ολοκλήρωση του 3^{ου} σταδίου, της ζύμωσης. Οι υπολογισμοί πραγματοποιήθηκαν για κάθε σειρά πειραματικών δοκιμών.

4.3.1 Απόδοση υδρολυτικών διεργασιών

Η απόδοση της υδρόλυσης είναι ένα μέγεθος που προσδιορίζει σε πόσο βαθμό διασπάται ένα συστατικό μετά την διαδικασία της προ-επεξεργασίας καθώς και τη ενζυμικής υδρόλυσης. Στην εργασία αυτή, γίνεται ο προσδιορισμός της υδρόλυσης των βασικών πολυσακχαριτών της πρώτης ύλης (κυτταρίνη, λιγνίνη, ημικυτταρίνη) μετά το πέρας κάθε πειραματικής δοκιμής. Επιπλέον, προσδιορίζεται και το ποσοστό διάσπασης του συνολικού στερεού. Η απόδοση της υδρόλυσης κάθε συστατικού υπολογίστηκε με βάση την παρακάτω σχέση:

$$\%Υδρόλυση(i) = \frac{M_{i\text{αρχικό}} - M_{i\text{τελικό}}}{M_{i\text{αρχικό}}} * 100\%$$

Όπου,

$M_{i\text{αρχικό}}$ = Η μάζα του συστατικού (i) πριν το 1^ο στάδιο της προ-επεξεργασίας με NaOH ή H₂SO₄, δηλαδή η μάζα του συστατικού της αρχικής πρώτης ύλης.

$M_{i\text{τελικό}}$ = Η μάζα του συστατικού (i) μετά το πέρας της συνολικής διεργασίας.

Τα ποσοστά διάσπασης των συστατικών αποτελούν μια πολύ σημαντική ένδειξη για την πορεία της συνολικής διεργασίας της ζύμωσης. Στους παρακάτω πίνακες παρουσιάζονται τα αποτελέσματα που προκύπτουν για κάθε σειρά πειραματικών δοκιμών, έπειτα από αξιοποίηση της παραπάνω σχέσης:

Πίνακας 24: Αποικοδόμηση των ολικών στερεών καθώς και των δομικών συστατικών (κυτταρίνη, ημικυτταρίνη, λιγνίνη) της πρώτης σειράς πειραματικών δοκιμών.

A/A	% Υδρόλυση ολικών στερεών	% Διάσπαση Κυτταρίνης	% Διάσπαση Ημικυτταρίνης	% Διάσπαση Αμύλου	% Διάσπαση AIL	% Διάσπαση ASL
A11	28.51	0.33	41.24	84.20	12.51	44.51

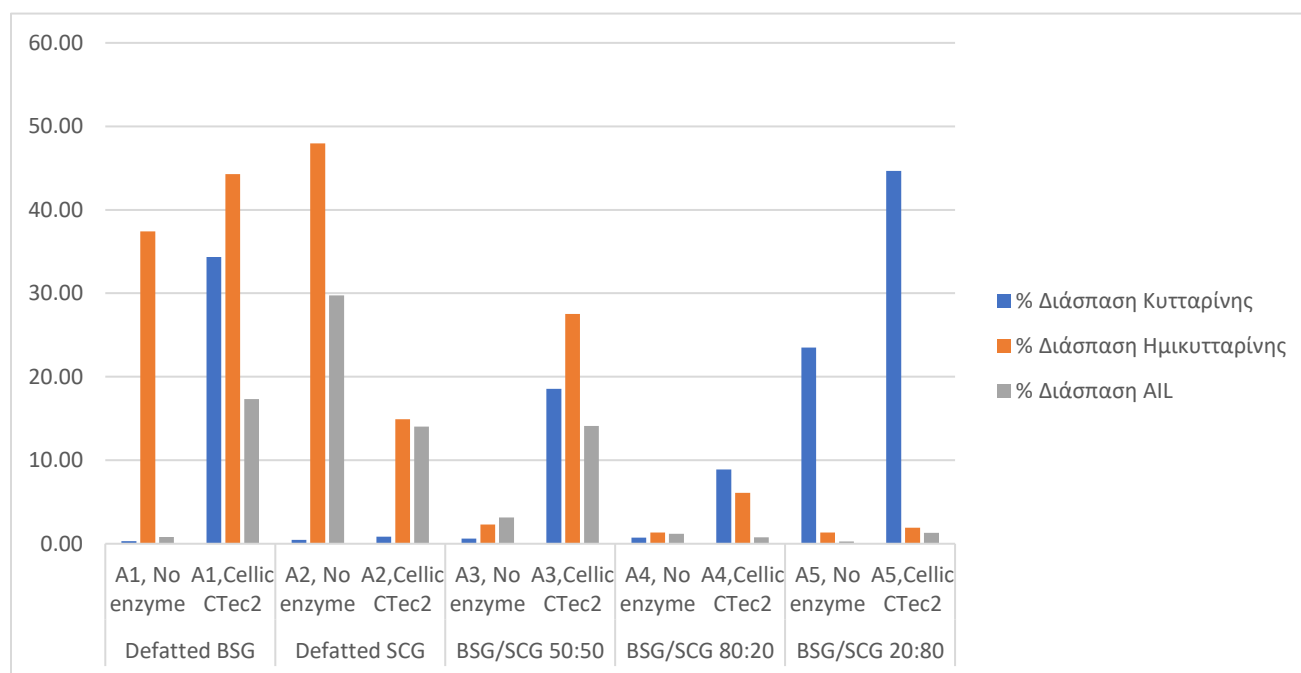
4.3 Πειραματικές δοκιμές και Αποτελέσματα: Δευτερογενή πειραματικά αποτελέσματα

A12	27.07	1.80	41.09	91.60	10.51	42.89
A13	20.27	0.14	37.92	74.31	1.13	15.96
A14	23.33	0.46	36.90	76.95	0.48	13.73
A15	17.21	28.07	37.30	90.56	33.84	54.49
A16	26.78	40.63	51.29	89.40	0.84	70.95
A21	16.74	0.27	50.60	60.24	30.61	52.51
A22	17.12	1.07	53.14	55.15	48.94	58.18
A23	12.90	0.62	48.67	51.46	30.99	49.72
A24	13.03	0.28	47.27	72.98	28.51	48.74
A25	16.50	0.78	5.81	77.14	27.79	64.70
A26	16.23	0.91	24.00	13.01	0.26	72.10
A31	4.29	12.34	1.80	0.69	6.98	10.11
A32	5.91	2.03	13.39	9.23	13.85	12.18
A33	1.80	0.83	0.82	1.10	4.29	13.80
A34	1.00	0.37	3.75	1.99	2.03	25.04
A35	0.29	0.69	19.68	5.60	1.87	2.09
A36	5.88	36.39	35.38	64.99	26.32	31.81
A41	0.50	22.48	1.03	2.84	18.16	1.20
A42	1.10	18.38	0.63	1.96	7.89	1.16
A43	2.69	0.12	0.23	14.94	1.73	6.41
A44	2.31	1.31	2.48	0.43	0.62	2.45
A45	8.55	7.61	7.96	8.39	1.06	3.67
A46	5.79	10.20	4.27	0.42	0.48	3.02
A51	8.64	20.12	0.44	75.43	3.54	34.31
A52	8.60	24.98	0.20	79.22	2.03	37.76
A53	7.49	24.71	1.74	71.06	0.23	15.53
A54	7.87	22.29	0.96	81.07	0.31	12.63
A55	12.20	41.98	1.43	84.92	0.76	24.79
A56	11.69	47.33	2.42	86.94	1.85	26.01

Όπως φαίνεται και στον Πίνακα 11, τόσο η πρώτη ύλη BSG όσο και η πρώτη ύλη SCG περιέχουν πολύ μικρές ποσότητες αμύλου (0.14 %wt για το SCG και 4.28 %wt για το BSG). Αυτό υποδηλώνει πως παρόλο που οι υδρολύσεις του αμύλου είναι γενικά πολύ υψηλές σχεδόν σε όλες τις πειραματικές δοκιμές της πρώτης σειράς, στην πραγματικότητα οι διασπάσεις αυτές είναι αμελητέες και δεν αντιπροσωπεύουν την συνολική απόδοση της διεργασίας. Επιπλέον, αξίζει να σημειωθεί πως το Cellic CTec2 είναι ένζυμο κυτταρίνης και όχι αμυλάσης και επομένως δεν μπορεί να γίνει κάποια σύγκριση. Ομοίως, η μέγιστη διάσπαση διαλυτής λιγνίνης, σύμφωνα με τον Πίνακα 24, αγγίζει το 72.10%. Παρόλα αυτά, τόσο το SCG όσο και το BSG χαρακτηρίζονται από περιεκτικότητα διαλυτής λιγνίνης κάτω από 2%.

4.3 Πειραματικές δοκιμές και Αποτελέσματα: Δευτερογενή πειραματικά αποτελέσματα

Αντίθετα, οι πρώτες ύλες είναι πλούσιες σε κυτταρίνη, ημικυτταρίνη και μη διαλυτή λιγνίνη. Με βάση τα δεδομένα του Πίνακα 24, δημιουργήθηκαν τα αντίστοιχα διαγράμματα, στα οποία φαίνεται πώς μεταβάλλονται οι επιμέρους αποικοδομήσεις αυτών των συστατικών. Σημειώνεται πως για την κατασκευή των διαγραμμάτων έχουν υπολογιστεί οι μέσοι όροι των μετρήσεων καθώς κάθε διεργασία αποτελείται από 2 επαναλήψεις. Έτσι προκύπτει:



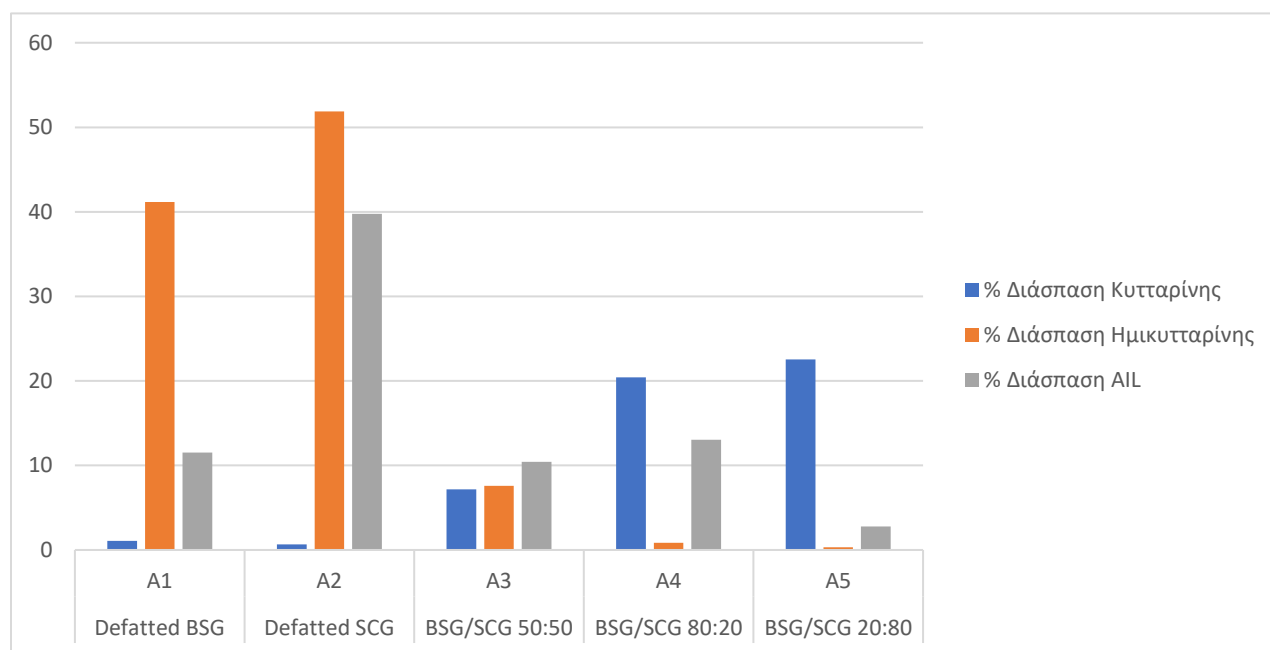
Διάγραμμα 1: Υδρόλυση κυτταρίνης, ημικυτταρίνης και λιγνίνης στα δείγματα μετά από ζύμωση της πρώτης σειράς πειραματικών δοκιμών.

Στο Διάγραμμα 1 παρατηρείται πως η ημικυτταρίνη διασπάται αρκετά όταν χρησιμοποιούνται τα δείγματα BSG και SCG ξεχωριστά καθώς επίσης και όταν βρίσκονται στην ίδια αναλογία σε μίγμα. Το ίδιο φαίνεται να συμβαίνει και με την διάσπαση της μη διαλυτής λιγνίνης. Αντίθετα, η ημικυτταρίνη διασπάται πολύ λιγότερο όταν κάποια από τις 2 πρώτες ύλες βρίσκεται σε περίσσεια στο μίγμα. Όσο για την κυτταρίνη, η πορεία διάσπασης της δεν φαίνεται να ακολουθεί κάποια αναλογική σχέση με την αναλογία των μιγμάτων. Ωστόσο, παρατηρείται πως με την χρήση ενζύμου η διάσπαση της είναι αποτελεσματική και αυτό φαίνεται ιδιαίτερα στις ζυμώσεις των μιγμάτων που απεικονίζονται στο Διάγραμμα 1.

Στη σειρά πειραμάτων A4 και A5 φαίνεται πως παρόλο που δεν υπάρχει εμφανής απόδοση στην υδρόλυση της ημικυτταρίνης και της μη διαλυτής λιγνίνης, η ενζυμική υδρόλυση με κυτταρινάση προχωράει και εξασφαλίζει υψηλή απόδοση διάσπασης της κυτταρίνης. Το γεγονός αυτό επισημαίνει

4.3 Πειραματικές δοκιμές και Αποτελέσματα: Δευτερογενή πειραματικά αποτελέσματα

πως το ένζυμο Cellic CTec2 επιτέλεσε το στόχο του, που είναι η υδρόλυση των πολυσακχαρικών δομών προς τα μονομερή τους σάκχαρα.



Διάγραμμα 2: Μέση υδρόλυση κυτταρίνης, ημικυτταρίνης και λιγνίνης στα δείγματα μετά από ζύμωση της πρώτης σειράς πειραματικών δοκιμών.

Όπως και στο προηγούμενο Διάγραμμα 1, η ημικυτταρίνη δεν φαίνεται να διασπάται αρκετά όταν πρόκειται για μίγματα BSG/SCG, ενώ η διάσπαση της μπορεί να αγγίξει και το 53.14% για το SCG και το 41.09% για το BSG όταν αυτά υπόκεινται σε ξεχωριστή προ-επεξεργασία με NaOH 0.5M. Περίπου όμοια συμπεράσματα λαμβάνονται και για την διάσπαση της μη διαλυτής λιγνίνης καθώς τα ποσοστά είναι ιδιαίτερα χαμηλά στα πειράματα A3, A4 και A5. Αντίθετα, η κυτταρίνη παρουσιάζει υψηλή διάσπαση όταν η πρώτη ύλη αποτελείται από μίγματα SCG/BSG και όχι ξεχωριστά. Η κυτταρίνη αποτελεί το πιο βασικό πολυσακχαρίτη, η διάσπαση του οποίου καθορίζει στο μεγαλύτερο βαθμό την απόδοση της ζύμωσης σε αιθανόλη. Έτσι, παρόλο που η προ-επεξεργασία με NaOH 0.5M καταφέρνει να διασπάσει αρκετά την ημικυτταρίνη και την μη διαλυτή λιγνίνη, φαίνεται πως σε ανάμειξη των δυο πρώτων υλών η προ-επεξεργασία επεμβαίνει και στην διάσπαση της κυτταρίνης που είναι ο απώτερος στόχος πριν το στάδιο της ζύμωσης.

Η υδρόλυση της ύλης με NaOH έγινε με σκοπό κυρίως την αποικοδόμηση της ημικυτταρίνης και της λιγνίνης, έτσι ώστε στο μετέπειτα στάδιο της ενζυμικής υδρόλυσης, η κυτταρίνη να μπορεί να διασπαστεί σε μεγαλύτερο βαθμό. Στο Διάγραμμα 2 είναι εμφανές πως η προ-επεξεργασία της τροφοδοσίας επιτυγχάνεται πολύ πιο αποτελεσματικά όταν αυτή πρόκειται για SCG ή BSG ξεχωριστά και

4.3 Πειραματικές δοκιμές και Αποτελέσματα: Δευτερογενή πειραματικά αποτελέσματα

όχι ως μίγματα. Επίσης, η πρώτη ύλη BSG φαίνεται να παρουσιάζει πολύ χαμηλά ποσοστά διάσπασης τόσο της ημικυτταρίνης (περίπου 41%) όσο και της μη διαλυτής λιγνίνης (περίπου 11%) σε σύγκριση με το SCG (το οποίο παρουσιάζει διάσπαση ημικυτταρίνης περίπου 52% και διάσπαση μη διαλυτής λιγνίνης περίπου 40%), όπως φαίνεται στα πειράματα A1 και A2 του Διαγράμματος 2. Προκειμένου να αντιμετωπιστούν αυτά τα δύο βασικά προβλήματα, επιλέχθηκε η χρήση διαφορετικού χημικού μέσου επεξεργασίας. Για το SCG το είδος της προ-επεξεργασίας παρέμεινε αμετάβλητο με χρήση NaOH 0.5M. Όσο για το BSG, επιλέχθηκε η χρήση αραιού οξέος H_2SO_4 0.25M. Οι δυο πρώτες ύλες προ-επεξεργάστηκαν ξεχωριστά και στην συνέχεια ακολούθησε η ανάμειξη τους και η δημιουργία μίγματος SCG/BSG 50:50 το οποίο συνέχισε στις διεργασίες ενζυμικής υδρόλυσης και ζύμωσης.

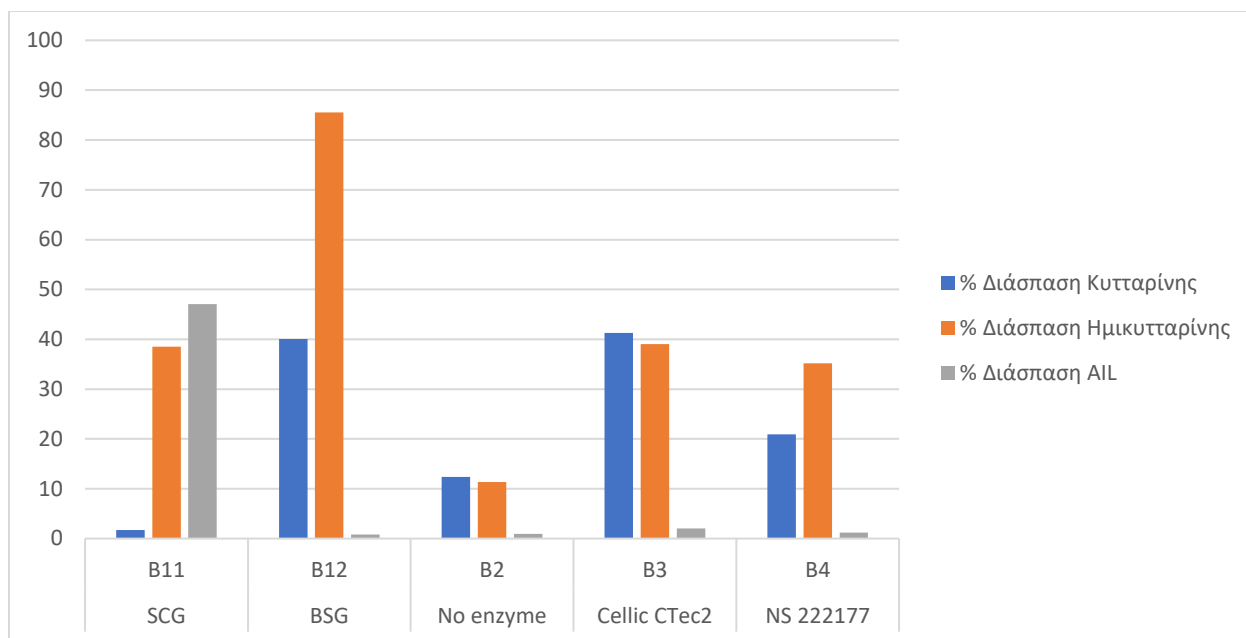
Έτσι, προσδιορίστηκαν τα νέα ποσοστά υδρόλυσης που αφορούν την δεύτερη σειρά πειραματικών δοκιμών. Τα αποτελέσματα αυτά βρίσκονται παρακάτω:

Πίνακας 25: Αποικοδόμηση των ολικών στερεών καθώς και των δομικών συστατικών (κυτταρίνη, ημικυτταρίνη, λιγνίνη) της δεύτερης σειράς πειραματικών δοκιμών.

A/A	% Υδρόλυση ολικών στερεών	% Διάσπαση Κυτταρίνης	% Διάσπαση Ημικυτταρίνης	% Διάσπαση Αμύλου	% Διάσπαση AIL	% Διάσπαση ASL
B11	21.55	1.74	38.53	91.93	47.04	63.33
B12	13.17	40.06	85.53	85.22	0.85	30.98
B2	16.76	12.36	11.33	1.48	0.97	25.07
B3	27.19	41.26	39.05	23.47	2.04	20.50
B4	26.82	20.90	35.16	40.83	1.18	30.20

Από τα δεδομένα του παραπάνω Πίνακα 25, δημιουργήθηκε το αντίστοιχο διάγραμμα με τις αποικοδομήσεις των επιμέρους συστατικών της τροφοδοσίας.

4.3 Πειραματικές δοκιμές και Αποτελέσματα: Δευτερογενή πειραματικά αποτελέσματα



Διάγραμμα 3: Υδρόλυση κυτταρίνης, ημικυτταρίνης και λιγνίνης στα δείγματα μετά από ζύμωση της δεύτερης σειράς πειραματικών δοκιμών.

Αρχικά, αξίζει να σημειωθεί πως η επιλογή για την χρήση αραιού οξέος H_2SO_4 0.25M ως μέσο προ-επεξεργασίας της ύλης BSG είχε σημαντικά αποτελέσματα στην απόδοση της υδρόλυσης. Η ημικυτταρίνη φαίνεται να έχει διασπαστεί σε πολύ μεγαλύτερο βαθμό από ότι συνέβη στην πρώτη σειρά πειραματικών δοκιμών. Στο πείραμα B12 η ημικυτταρίνη εμφανίζει ποσοστό διάσπασης περίπου 86%, ενώ στα πειράματα A1, η ημικυτταρίνη διασπάται σε ποσοστό περίπου 41%. Παρόλο που η διάσπαση της μη διαλυτής λιγνίνης βρίσκεται κάτω από το 1%, σε σύγκριση με την πρώτη σειρά πειραμάτων όπου με την χρήση $NaOH$ 0.5M έφτασε το 11% (Πίνακας 24), φαίνεται πως η χρήση οξέος συμβάλει στην σημαντική διάσπαση της κυτταρίνης από το πρώτο κιόλας στάδιο (κοντά στο 40% διάσπαση κυτταρίνης σύμφωνα με τον Πίνακα 25). Το γεγονός αυτό επιδρά θετικά στο 2^ο στάδιο της ενζυμικής υδρόλυσης, καθώς η διάσπαση της κυτταρίνης έχει ήδη αρχίσει να συμβαίνει. Η επίδραση αυτή του οξέος διακρίνεται και από την διαφορά που υπάρχει μεταξύ των πειραμάτων B3 και A35, A36. Στα πειράματα αυτά, η αναλογία τροφοδοσίας είναι SCG/BSG 50:50 και ως ένζυμο έχει χρησιμοποιηθεί Cellic CTec2 ίσης ποσότητας. Όμως, το πείραμα B3 προέρχεται από BSG το οποίο είναι προ-επεξεργασμένο με H_2SO_4 0.25M, ενώ τα A35 και A36 έχουν επεξεργαστεί με $NaOH$ 0.5M. Στα Διαγράμματα 1 και 3, φαίνεται πως η διάσπαση της κυτταρίνης μετά από ενζυμική υδρόλυση βρίσκεται κοντά στο 18.5% για τα A35 και A36, ενώ βρίσκεται κοντά στο 41% για το B3. Συμπερασματικά, η αυξημένη αυτή απόδοση της υδρόλυσης της ημικυτταρίνης και της κυτταρίνης οδηγεί στο συμπέρασμα πως η χρήση αραιού οξέος H_2SO_4 ως διάλυμα προ-επεξεργασίας είναι προτιμότερη όσον αφορά την πρώτη ύλη BSG.

4.3 Πειραματικές δοκιμές και Αποτελέσματα: Δευτερογενή πειραματικά αποτελέσματα

Επιπλέον, από το Διάγραμμα 3 γίνεται εμφανές πως η χρήση ενζύμων κυτταρινάσης επιδρούν θετικά στην συνολική απόδοση της διεργασίας. Το ένζυμο Cellic CTec2 σε ποσότητα 400 $\mu\text{L/g}$ αρχικής κυτταρίνης της τροφοδοσίας συνέβαλε στην αύξηση της διάσπασης της κυτταρίνης από 12.36% στο 41.26% και στην αύξηση της διάσπασης της ημικυτταρίνης από 11.33% στο 39.05% (Πειράματα B2 και B3). Αντίστοιχα, η κυτταρινάση NS 22177 σε ποσότητα 175 $\mu\text{L/g}$ αρχικής κυτταρίνης της τροφοδοσίας συνέβαλε σε αύξηση από 12.36% στο 20.09% για την κυτταρίνη και από 11.33% στο 35.16% για την ημικυτταρίνη. Με βάση τα αποτελέσματα αυτά, η χρήση του Cellic CTec2 κρίνεται καλύτερη καθώς συμβάλει περισσότερο στην αποικοδόμηση των πολυσακχαριτών της τροφοδοσίας.

Με βάση τα αποτελέσματα της πρώτης και δεύτερης σειράς πειραματικών δοκιμών, επιλέχθηκε η χρήση μίγματος ίσης αναλογίας BSG και SCG για την τρίτη σειρά. Επίσης, κρίθηκε αναγκαία η προ-επεξεργασία των SCG και BSG ξεχωριστά, με όμοιο τρόπο που συνέβη και στην δεύτερη σειρά πειραματικών δοκιμών. Η πρώτη ύλη SCG προ-επεξεργάστηκε βασικά με χρήση NaOH, ενώ η πρώτη ύλη BSG προ-επεξεργάστηκε όξινα με χρήση H_2SO_4 . Οι αποδόσεις της υδρόλυσης των πολυσακχαριτών κάθε πειράματος της τρίτης σειράς βρίσκονται παρακάτω:

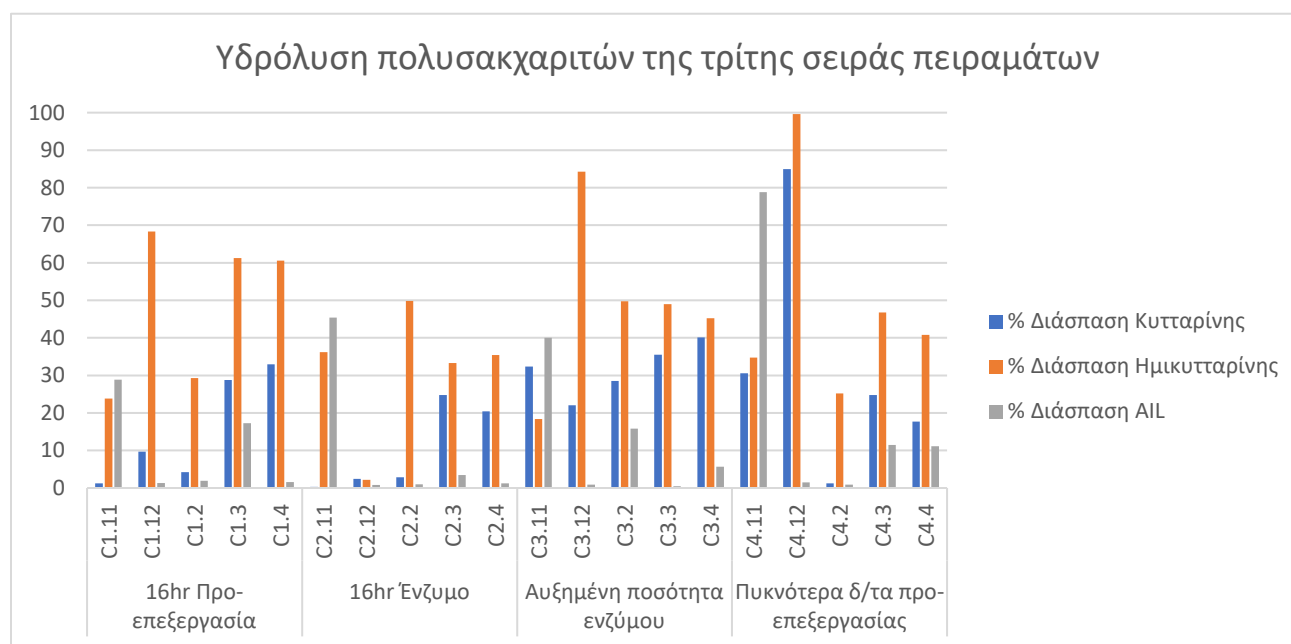
Πίνακας 26: Αποικοδόμηση των ολικών στερεών καθώς και των δομικών συστατικών (κυτταρίνη, ημικυτταρίνη, λιγνίνη) της τρίτης σειράς πειραματικών δοκιμών.

A/A	% Υδρόλυση ολικών στερεών	% Διάσπαση Κυτταρίνης	% Διάσπαση Ημικυτταρίνης	% Διάσπαση Αμύλου	% Διάσπαση AIL	% Διάσπαση ASL
C1.11	21.64	1.20	23.86	72.51	28.85	53.04
C1.12	13.24	9.69	68.33	97.95	1.34	1.33
C1.2	16.87	4.22	29.29	1.23	1.95	16.56
C1.3	14.08	28.79	61.26	48.51	17.30	12.10
C1.4	10.12	32.97	60.54	92.97	1.55	1.23
C2.11	20.51	0.33	36.23	90.20	45.44	59.99
C2.12	3.40	2.40	2.20	74.62	0.80	0.90
C2.2	17.85	2.89	49.85	89.95	0.99	14.84
C2.3	26.86	24.75	33.30	95.09	3.49	1.65
C2.4	25.65	20.40	35.44	93.81	1.22	8.40
C3.11	21.56	32.32	18.34	91.90	40.00	46.23
C3.12	13.15	22.06	84.24	84.43	0.88	19.82
C3.2	19.17	28.49	49.76	1.11	15.78	14.79
C3.3	26.31	35.47	48.99	92.78	0.44	17.80
C3.4	25.17	40.13	45.23	95.55	5.71	1.39
C4.11	22.91	30.60	34.76	63.10	78.80	59.31

4.3 Πειραματικές δοκιμές και Αποτελέσματα: Δευτερογενή πειραματικά αποτελέσματα

C4.12	7.19	84.92	99.65	99.98	1.49	70.54
C4.2	14.54	1.27	25.20	87.74	0.89	14.92
C4.3	23.65	24.74	46.80	95.01	11.49	16.17
C4.4	21.41	17.72	40.80	93.43	11.16	32.77

Όπως παρατηρήθηκε και στις προηγούμενες σειρές πειραματικών δοκιμών, τα ποσοστά διάσπασης τόσο του αμύλου όσο και της διαλυτής λιγνίνης βρίσκονται πολύ υψηλά σε γενικές γραμμές. Παρόλα αυτά, καθώς τα δύο αυτά συστατικά βρίσκονται σε πολύ χαμηλά ποσοστά στις αρχικές πρώτες ύλες (Πίνακας 11), οι διασπάσεις τους δεν αποτελούν μέτρο αξιολόγησης της συνολικής υδρόλυσης. Παρακάτω, παρουσιάζεται το αντίστοιχο Διάγραμμα των δεδομένων υδρόλυσης για τους τρεις βασικούς πολυσακχαρίτες, την κυτταρίνη, την ημικυτταρίνη και την μη διαλυτή λιγνίνη.



Διάγραμμα 4: Ποσοστά υδρόλυσης κυτταρίνης, ημικυτταρίνης και μη διαλυτής λιγνίνης στην τρίτη σειρά πειραματικών δοκιμών.

Αρχικά, όπως φαίνεται στο Διάγραμμα 4, τα τρία δομικά συστατικά και ιδιαίτερα η ημικυτταρίνη και η μη διαλυτή λιγνίνη αποικοδομούνται σε πολύ υψηλά ποσοστά. Η επέκταση του χρόνου επεξεργασίας σε 16 ώρες, οδήγησε στο αποτέλεσμα η ημικυτταρίνη να έχει διασπαστεί μόνο μέχρι το 23.86% στην περίπτωση του SCG και στο 68.33% στην περίπτωση του BSG, όταν στην δεύτερη σειρά πειραμάτων, τα ποσοστά αυτά ήταν 38.53% και 85.53%. Το αποτέλεσμα αυτό, μεμονωμένα, θα έδειχνε πως η αλλαγή αυτή στην προ-επεξεργασία θα έχει αρνητικά αποτελέσματα στην διεργασία της ζύμωσης που ακολουθεί. Ωστόσο, κάτι τέτοιο δεν φαίνεται να συμβαίνει. Η διάσπαση της ημικυτταρίνης αγγίζει

το 61% όπως μετρήθηκε μετά από ζύμωση στο πείραμα C1.3, ενώ στην δεύτερη σειρά δεν ξεπερνούσε το 39%.

Όσον αφορά την επέκταση του χρόνου της ενζυμικής υδρόλυσης, δεν παρατηρείται κάποια σημαντική αλλαγή ως προς τις αποικοδομήσεις των πολυσακχαριτών. Τα ένζυμα που χρησιμοποιήθηκαν, τόσο το Cellic CTec2 όσο και το NS 22177 αποτελούν κυτταρινάσες οι οποίες διεισδύουν και διασπούν την κυτταρίνη της ύλης. Η επίδρασή τους φαίνεται γενικώς συγκρίνοντας τις πειραματικές δοκιμές Cn.3 και Cn.4 (όπου n ο αριθμός της πειραματικής δοκιμής) στις οποίες χρησιμοποιούνται τα ένζυμα πριν την ζύμωση με τις πειραματικές δοκιμές Cn.2 όπου η ζύμωση γίνεται απευθείας μετά το 1^ο στάδιο της προ-επεξεργασίας. Ωστόσο, συγκρίνοντας τα πειράματα C2.3, C2.4 με τα αντίστοιχα πειράματα της δεύτερης σειράς, B3, B4, γίνεται κατανοητό πως ο παρατεταμένος χρόνος της ενζυμικής υδρόλυσης δεν βελτιώνει την αποικοδόμηση της κυτταρίνης. Η αποικοδόμηση της κυτταρίνης με χρήση Cellic CTec2 για 16 ώρες είναι 24.75% μετά από ζύμωση, ενώ για 5 ώρες είναι 41.26%. Αντίστοιχα, με χρήση NS 22177 για 16 ώρες, η αποικοδόμηση της κυτταρίνης φτάνει το 20.4%, ενώ για 5 ώρες 20.9%.

Αντίθετα με τον παρατεταμένο χρόνο της ενζυμικής υδρόλυσης, η χρήση αυξημένης ποσότητας ενζύμου στο ίδιο στάδιο είχε σημαντικά αποτελέσματα στις συνολικές αποικοδομήσεις. Με την χρήση 800 μL Cellic CTec2/g αρχικής κυτταρίνης αντί για 400 μL/g, επιτυγχάνεται διάσπαση της κυτταρίνης σε ποσοστό 35.7% στο πείραμα C3.3, όταν στα πειράματα C1.3, C2.3 και C4.3 η διάσπαση της κυτταρίνης είναι 28.79%, 20.4% και 24.74% αντίστοιχα. Ομοίως, στο πείραμα C3.4 η διάσπαση της κυτταρίνης με χρήση NS 22177, φτάνει το 40.13%, όταν στα πειράματα C1.4, C2.4 και C4.4 η κυτταρίνη αποικοδομείται σε ποσοστά 32.97%, 20.4% και 17.72% αντιστοίχως.

Τέλος, στην τέταρτη σειρά πειραμάτων όπου χρησιμοποιήθηκαν πυκνότερα διαλύματα προ-επεξεργασίας, υπήρξε σημαντική βελτίωση στο 1^ο στάδιο της προ-επεξεργασίας. Σύμφωνα με το Διάγραμμα 4, η ημικυτταρίνη που περιέχεται στο BSG διασπάται σε ποσοστό 99.65% (Πείραμα C4.12) όταν χρησιμοποιείται ως διάλυμα προ-επεξεργασίας H₂SO₄ 0.5M, ενώ προηγουμένως, αυτό το ποσοστό δεν ξεπερνούσε το 86% περίπου (Πειράματα B12 και C3.12). Σχετικά με την αποικοδόμηση της μη διαλυτής λιγνίνης τα αποτελέσματα ήταν αξιοσημείωτα καθώς όπως φαίνεται στο Πείραμα C4.11 της πρώτης ύλης SCG, η απόδοση διάσπασης της αυξήθηκε στο 78.80%, σε σύγκριση με το προηγούμενο υψηλότερο ποσοστό των 47.04% του πειράματος B11. Αυτό δείχνει πως η χρήση πυκνότερου διαλύματος NaOH 1M αντί για 0.5M ενδείκνυται για την διάσπαση της μη διαλυτής λιγνίνης στην πρώτη ύλη SCG. Παρόλα αυτά, τα αποτελέσματα των μετρήσεων έδειξαν πως η χρήση πυκνότερων διαλυμάτων επιδρούν αρνητικά στις ακόλουθες διεργασίες της ενζυμικής υδρόλυσης και της ζύμωσης. Αυτό προέκυψε από το

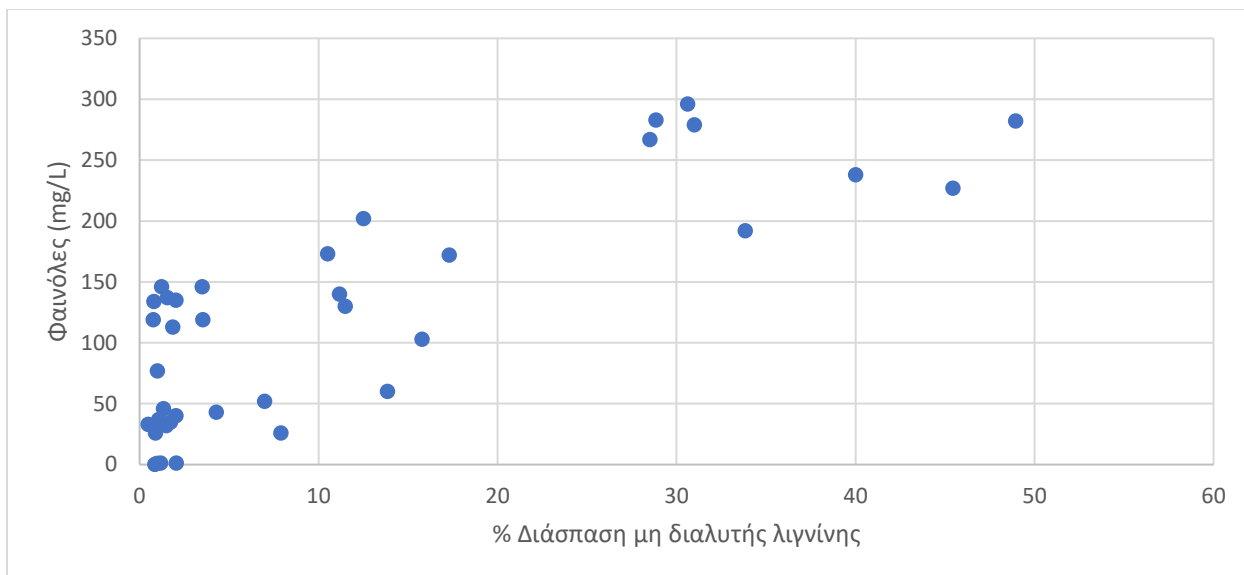
γεγονός πως τα πειράματα C4.3 και C4.4 σχετίζονται με τις χαμηλότερες αποικοδομήσεις κυτταρίνης. Η αποικοδόμηση της κυτταρίνης αποτελεί τον πιο σημαντικό παράγοντα που τελικά προσδιορίζει την απόδοση της ζύμωσης σε αιθανόλη [101, p. 566]. Στο Πείραμα C4.3 η κυτταρίνη διασπάστηκε σε ποσοστό 24.74% με χρήση Cellic CTec2, ενώ στο Πείραμα C4.4 η κυτταρίνη διασπάστηκε σε ποσοστό 17.72%.

Με βάση τα αποτελέσματα των τριών πειραματικών δοκιμών, επιλέχθηκαν οι καλύτερες πειραματικές συνθήκες και έλαβε χώρα η τέταρτη και τελευταία σειρά πειραμάτων σε μεσαία εργαστηριακή κλίμακα (Εικόνα 5).

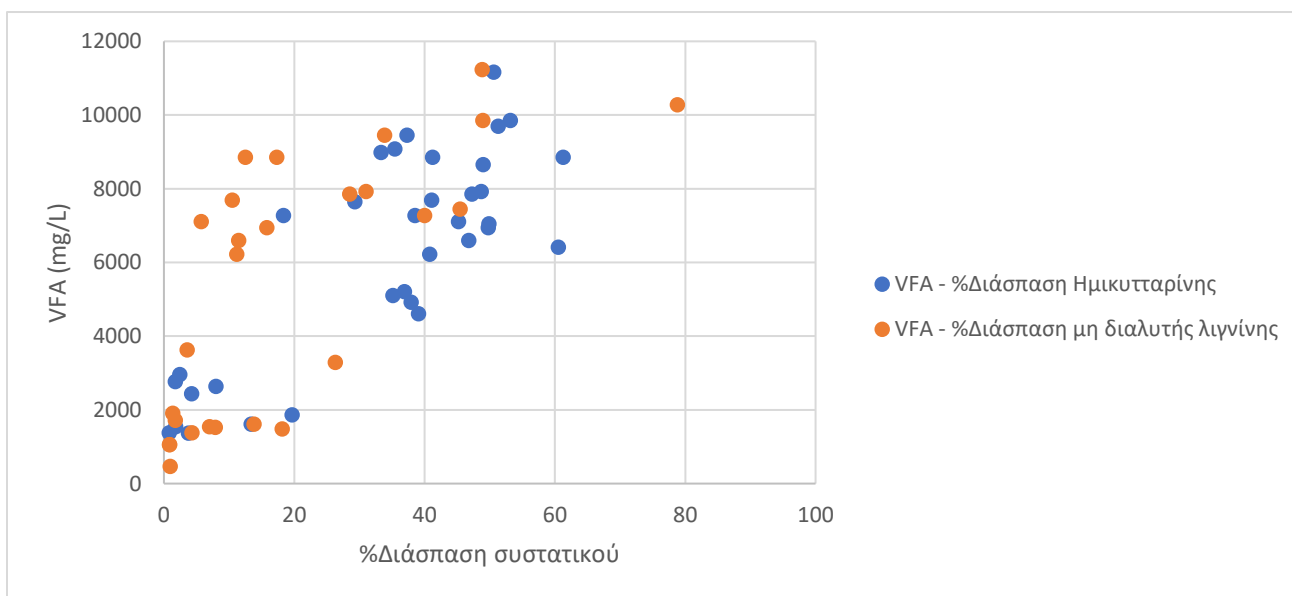
4.3.1.1 Παραπροϊόντα υδρολυτικών διεργασιών

Η διάσπαση των συστατικών της τροφοδοσίας (λιγνίνη και ημικυτταρίνη) έχει ως αποτέλεσμα διάφορα παραπροϊόντα όπως είναι οι φαινολικές ουσίες και τα πτητικά οξέα. Όσον αφορά στην περιεκτικότητα της τροφοδοσίας σε φαινολικά συστατικά και πτητικά οξέα (Πίνακες 14, 17, 20), από τα αποτελέσματα των πειραμάτων της παρούσας έρευνας παρατηρήθηκε μία αύξηση ανάλογα με το ποσό της αποικοδόμησης της λιγνίνης. Καθώς οι φαινόλες αποτελούν προϊόντα αποικοδόμησης της λιγνίνης αναμένεται μία αναλογική αυξομείωση της συγκέντρωσής τους. Το ίδιο και για τα πτητικά οξέα των οποίων η αυξημένη συγκέντρωση, σχετίζεται με την αύξηση της αποικοδόμησης της λιγνίνης και της ημικυτταρίνης. Τα αποτελέσματα αυτά έρχονται σε συμφωνία με τους Song, Yang et al. (2015) [111]. Η σχέση αυτή, της αποικοδόμησης λιγνίνης και ημικυτταρίνης με τη συγκέντρωση των πτητικών οξέων και των φαινολικών συστατικών αποδίδεται στα ακόλουθα Διαγράμματα (Διαγράμματα 8 και 9), όπου φαίνεται να ακολουθούν το ίδιο μοτίβο:

4.3 Πειραματικές δοκιμές και Αποτελέσματα: Δευτερογενή πειραματικά αποτελέσματα



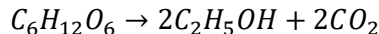
Διάγραμμα 5: Συγκέντρωση φαινολικών ουσιών στο υπερκείμενο υγρό των πειραμάτων της πρώτης σειράς σε συνάρτηση με την αποικοδόμηση της μη διαλυτής λιγνίνης.



εμφανίζονται όλο και περισσότερο στο υπερκείμενο υγρό με συγκέντρωση άνω των 200 mg/L. Σύμφωνα με το Διάγραμμα 7, όταν οι πολυσακχαρίτες δεν διασπώνται σε ποσοστό μεγαλύτερο του 10%, τα πτητικά οξέα βρίσκονται κυρίως κάτω από 3500 mg/L. Αντίθετα, όσο αυξάνεται η διάσπαση της λιγνίνης και της ημικυτταρίνης σε ποσοστό πάνω από το 30%, τα πτητικά οξέα εμφανίζουν συγκέντρωση κυρίως πάνω από 8000 mg/L.

4.3.2 Αποτελέσματα προσδιορισμού αιθανόλης

Το στάδιο της ζύμωσης προς παραγωγή αιθανόλης πραγματοποιήθηκε στο 3^ο και τελικό στάδιο, βάσει των αποτελεσμάτων που προέκυψαν από τις πειραματικές δοκιμές για τις διαφορετικές συνθήκες προ-επεξεργασίας και ενζυμικής υδρόλυσης. Η ποσότητα της αιθανόλης που παράγεται από αυτό το στάδιο προσδιορίζεται σύμφωνα με την παράγραφο 3.3.16. Προκειμένου να προσδιοριστεί η συνολική απόδοση της κάθε διεργασίας, αποπειράθηκε ο προσδιορισμός της απόδοσης σε αιθανόλη. Η αιθανόλη που παράγεται, σύμφωνα με την θεωρία, από την ζύμωση ακολουθεί την παρακάτω στοιχειομετρική σχέση μετατροπής της γλυκόζης σε αιθανόλη:



Σύμφωνα με την αντίδραση αυτή, για κάθε 1 mol γλυκόζης παράγονται 2 mol αιθανόλης καθώς και 2 mol διοξειδίου του άνθρακα. Η γλυκόζη που αποτυπώνεται από τον χημικό τύπο $C_6H_{12}O_6$ έχει μοριακό βάρος $M_r(\text{glu}) = 180.16 \text{ g/mol}$, ενώ η αιθανόλη έχει $M_r(\text{EtOH}) = 46.07 \text{ g/mol}$. Αυτό σημαίνει πως σε μονάδες μάζας, από κάθε 1 g γλυκόζης παράγονται 0.51 g αιθανόλης. Επιπλέον, η θεωρητική ποσότητα αιθανόλης προέρχεται από την πλήρη διάσπαση της κυτταρίνης. Έτσι, η απόδοση των πειραματικών δοκιμών σε αιθανόλη μπορεί να προσδιοριστεί σύμφωνα με την παρακάτω σχέση:

$$\% \text{Απόδοση Αιθανόλης} = \frac{M_{\text{πραγμ}}}{M_{\text{θεωρ}}} * 100\% = \frac{M_{\text{πραγμ}}}{(M_{\text{κυτ}*f}) * 0.51} * 100\%$$

Όπου,

$M_{\text{πραγμ}}$ = Η πραγματική ποσότητα αιθανόλης που παράγεται μετά το πέρας της ζύμωσης.

$M_{\text{θεωρ}}$ = Η θεωρητική ποσότητα αιθανόλης που παράγεται σύμφωνα με την στοιχειομετρία της αντίδρασης.

4.3 Πειραματικές δοκιμές και Αποτελέσματα: Δευτερογενή πειραματικά αποτελέσματα

f = Ο συντελεστής διόρθωσης για την προσθήκη νερού ανά μονάδα εξόζης, κατά την ενζυμική σακχαροποίηση και είναι $f = \frac{180}{162} = 1.11$.

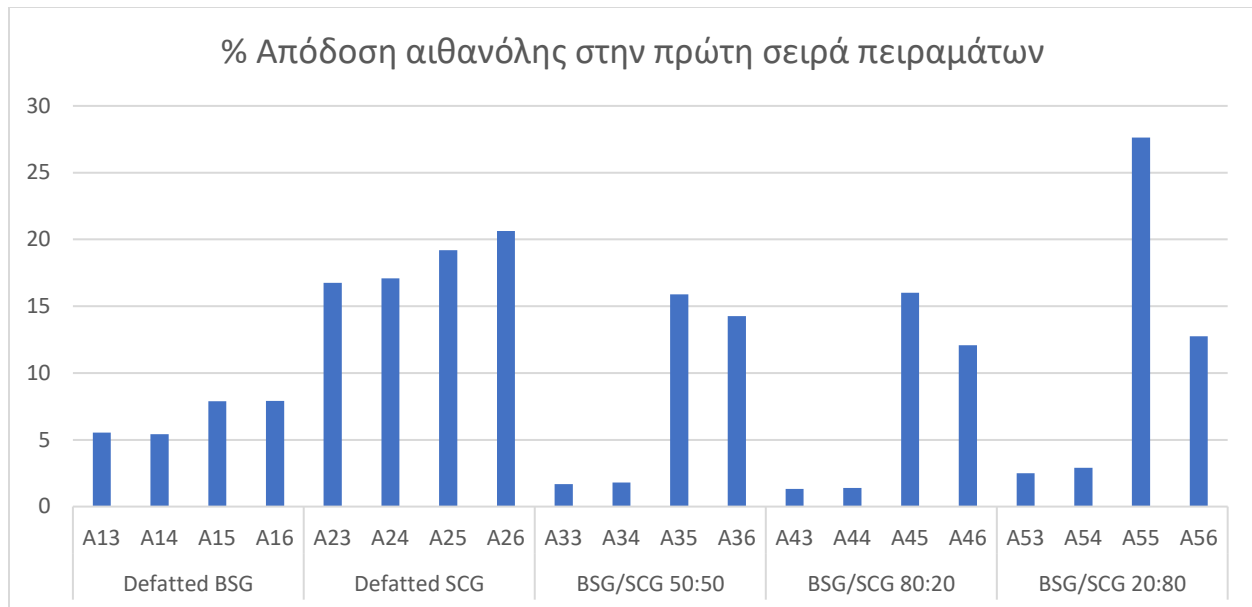
$M_{\text{κυτ}}$ = Η ποσότητα αρχικής κυτταρίνης στο δείγμα.

Έτσι, προκύπτουν οι παρακάτω πίνακες δεδομένων με την αντίστοιχη απόδοση αιθανόλης για κάθε σειρά πειραματικών δοκιμών:

Πίνακας 27: Απόδοση αιθανόλης για την πρώτη σειρά πειραματικών δοκιμών.

A/A	Αρχική κυτταρίνη (g)	Πραγματική αιθανόλη (mg)	% Απόδοση αιθανόλης	% Μέση απόδοση αιθανόλης
A13	1.91	59.8	5.53	5.48
A14	1.95	59.8	5.43	
A15	1.92	85.8	7.88	7.90
A16	1.91	85.5	7.91	
A23	0.92	87	16.75	16.93
A24	0.91	88.5	17.1	
A25	0.91	99	19.2	19.92
A26	0.94	110	20.63	
A33	1.42	13.52	1.69	1.75
A34	1.42	14.56	1.81	
A35	1.42	127.6	15.88	15.07
A36	1.42	114.75	14.25	
A43	1.72	12.98	1.33	1.36
A44	1.72	13.52	1.39	
A45	1.73	156.8	16.02	14.05
A46	1.72	117.6	12.07	
A53	1.72	24.32	2.5	2.71
A54	1.73	28.48	2.91	
A55	1.72	268.8	27.62	20.19
A56	1.72	124.2	12.75	

Με βάση τα αποτελέσματα της πρώτης σειράς πειραματικών δοκιμών δημιουργήθηκε το αντίστοιχο διάγραμμα απόδοσης της αιθανόλης:



Διάγραμμα 7: Απόδοση της αιθανόλης στις διεργασίες ζύμωσης της πρώτης σειράς πειραματικών δοκιμών.

Αρχικά, σημειώνεται πως οι εξαντλημένοι κόκκοι καφέ παράγουν αιθανόλη σε υψηλότερα επίπεδα απόδοσης σε σύγκριση με τους εξαντλημένους σπόρους κριθαριού όταν αυτές οι 2 ύλες επεξεργαστούν και ζυμωθούν ξεχωριστά. Η απόδοση σε αιθανόλη στην ύλη SCG κυμαίνεται από 16.75-20.63%, ενώ η απόδοση στην ύλη BSG κυμαίνεται από 5.43%-7.91%. Αυτό προκύπτει από το γεγονός πως οι υδρολύσεις που παρουσιάζονται στο Διάγραμμα 2 σχετίζονται με πολύ υψηλές αποδόσεις διάσπασης ημικυτταρίνης και πολύ χαμηλότερες κυτταρίνης.

Επίσης, χαρακτηριστικό των αποτελεσμάτων του Διαγράμματος 4 είναι πως σε κάθε περίπτωση, η χρήση ενζύμου Cellic CTec2 οδηγεί σε υψηλότερες αποδόσεις αιθανόλης και το φαινόμενο αυτό γίνεται πιο έντονο ειδικά στις περιπτώσεις μιγμάτων. Παρακάτω, έχει δημιουργηθεί ο πίνακας που αποτυπώνει την επίδραση του ενζύμου στην απόδοση της αιθανόλης.

4.3 Πειραματικές δοκιμές και Αποτελέσματα: Δευτερογενή πειραματικά αποτελέσματα

Πίνακας 28: Επίδραση της κυτταρινάσης Cellic CTec2 στο ποσοστό απόδοσης της αιθανόλης στην πρώτη σειρά πειραματικών δοκιμών.

	% Μέση απόδοση αιθανόλης χωρίς Cellic CTec2	% Μέση απόδοση αιθανόλης με Cellic CTec2	%Αύξηση απόδοσης αιθανόλης – Επίδραση Cellic CTec2
Defatted BSG	5.48	7.90	2.42
Defatted SCG	16.93	19.92	2.99
BSG/SCG 50:50	1.75	15.07	13.32
BSG/SCG 80:20	1.36	14.05	12.69
BSG/SCG 20:80	2.71	20.19	17.48

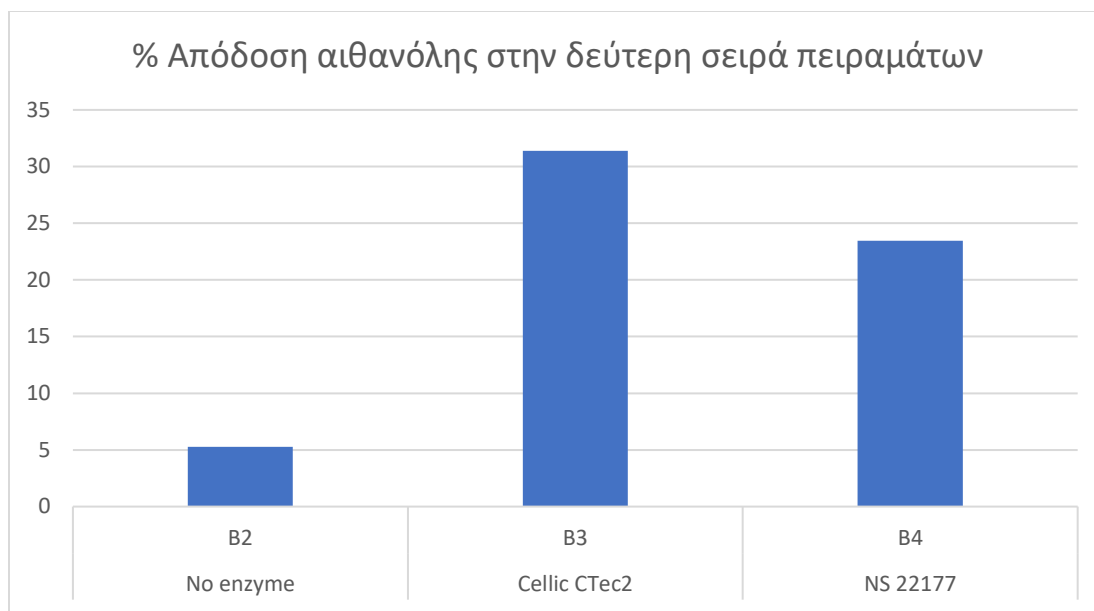
Το γεγονός πως οι εξαντλημένοι κόκκοι καφέ σχετίζονται με υψηλότερη απόδοση αιθανόλης γίνεται ελαφρώς αντιληπτό ακόμη και στην περίπτωση των μιγμάτων, καθώς όσο μεγαλύτερη είναι η συγκέντρωση των SCG στο μίγμα, τόσο υψηλότερη είναι η απόδοση, τόσο πριν, αλλά κυρίως και μετά από εισαγωγή ενζύμου Cellic CTec2 (Πίνακας 28). Έτσι, υψηλότερη απόδοση αιθανόλης παρατηρείται στο πείραμα A55 στο οποίο η τροφοδοσία αποτελείται από 80% SCG και 20% BSG.

Ομοίως με την πρώτη σειρά πειραματικών δοκιμών, τα αποτελέσματα από την δεύτερη σειρά βρίσκονται παρακάτω:

Πίνακας 29: Απόδοση αιθανόλης για την δεύτερη σειρά πειραματικών δοκιμών.

A/A	Αρχική κυτταρίνη (g)	Πραγματική αιθανόλη (mg)	% Απόδοση αιθανόλης
B2	2.87	85.60	5.27
B3	2.84	504.40	31.39
B4	2.86	380.00	23.46

Με βάση τις μετρήσεις του Πίνακα 29, δημιουργείται και το αντίστοιχο διάγραμμα απόδοσης της αιθανόλης:



Διάγραμμα 8: Απόδοση της αιθανόλης στις διεργασίες ζύμωσης της δεύτερης σειράς πειραματικών δοκιμών.

Αρχικά, όπως φαίνεται και στο Διάγραμμα 5, η χρήση του ενζύμου Cellic CTec2 σχετίζεται με υψηλότερη απόδοση αιθανόλης σε σύγκριση με το ένζυμο NS 22177. Συγκεκριμένα, το πείραμα B3, με χρήση του Cellic CTec2 στο 2^ο στάδιο της ενζυμικής υδρόλυσης, σημειώνει απόδοση αιθανόλης 31.39%, ενώ το πείραμα B4 με NS 22177 σημειώνει χαμηλότερη απόδοση, 23.46%. Για ακόμη μια φορά, επιβεβαιώνεται η προτίμηση του Cellic CTec2 έναντι του NS 22177 για το στάδιο της ενζυμικής υδρόλυσης σε μίγματα που αποτελούνται από BSG και SCG. Σε κάθε περίπτωση, η απευθείας ζύμωση της τροφοδοσίας, παρακάμπτοντας το στάδιο της ενζυμικής υδρόλυσης, φαίνεται να μην είναι ιδιαίτερα αποτελεσματική, καθώς, όπως φαίνεται και στο πείραμα B2, η απόδοση αιθανόλης δεν ξεπερνά το 5.27%.

Συγκρίνοντας τα αποτελέσματα της δεύτερης σειράς πειραμάτων με την πρώτη, γίνεται εμφανές πως η προ-επεξεργασία των SCG και BSG ξεχωριστά, καθώς επίσης και η χρήση αραιού οξέος H₂SO₄ για την προ-επεξεργασία του BSG (αντί για NaOH που χρησιμοποιήθηκε στην πρώτη σειρά) έχουν αντίκτυπο στην τελική απόδοση και παραγωγή αιθανόλης. Ακόμη και στην περίπτωση που δεν χρησιμοποιήθηκε κάποιο ένζυμο και η ζύμωση ακολούθησε το στάδιο της προ-επεξεργασίας, φαίνεται πως η τελική απόδοση αιθανόλης είναι υψηλότερη για την δεύτερη σειρά πειραμάτων. Συγκεκριμένα, στο πείραμα B2 η απόδοση αιθανόλης βρίσκεται σε ποσοστό 5.27%, ενώ στα πειράματα A33 και A34 η απόδοση της αιθανόλης κυμαίνεται από 1.69 – 1.81%. Αντίστοιχα, στο πείραμα B3, στο οποίο χρησιμοποιείται ένζυμο κυτταρινάσης Cellic CTec 2, η απόδοση της αιθανόλης βρίσκεται στο 31.39%, σε σύγκριση με τα πειράματα A35 και A36 στα οποία η απόδοση είναι χαμηλότερη, στο ποσοστό 14.25 – 15.88%.

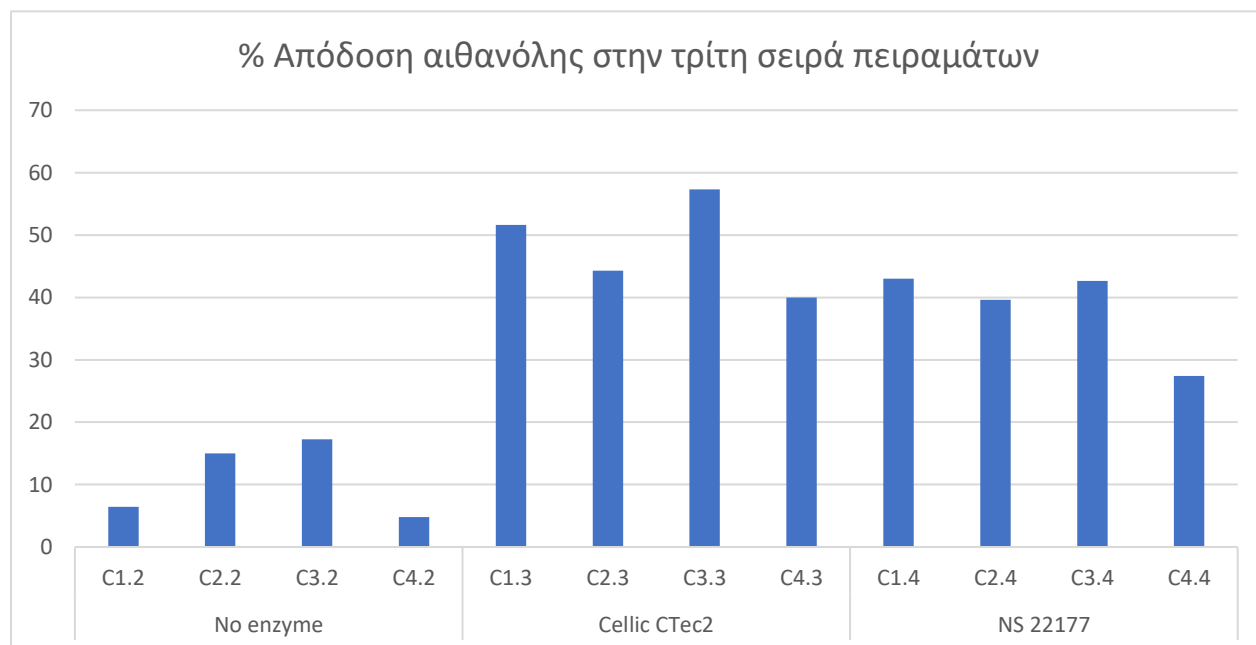
4.3 Πειραματικές δοκιμές και Αποτελέσματα: Δευτερογενή πειραματικά αποτελέσματα

Ομοίως με τη δεύτερη σειρά πειραματικών δοκιμών, τα αποτελέσματα από την τρίτη σειρά βρίσκονται παρακάτω:

Πίνακας 30: Απόδοση αιθανόλης για την τρίτη σειρά πειραματικών δοκιμών.

A/A	Αρχική κυτταρίνη (g)	Πραγματική αιθανόλη (mg)	% Απόδοση αιθανόλης
C1.2	2.90	105.60	6.43
C1.3	2.89	844.80	51.62
C1.4	2.86	696.00	43.02
C2.2	1.41	120.00	14.99
C2.3	1.43	358.80	44.29
C2.4	1.43	320.00	39.61
C3.2	1.44	140.00	17.23
C3.3	1.44	467.20	57.32
C3.4	1.43	345.60	42.66
C4.2	1.41	38.40	4.80
C4.3	1.42	320.40	39.98
C4.4	1.42	220.80	27.39

Από τα αποτελέσματα του Πίνακα 30, κατασκευάστηκε το αντίστοιχο Διάγραμμα απόδοσης αιθανόλης:



Διάγραμμα 9: Απόδοση της αιθανόλης στις διεργασίες ζύμωσης της τρίτης σειράς πειραματικών δοκιμών.

Υπενθυμίζεται πως στην τρίτη σειρά πειραματικών δοκιμών, έγινε επανάληψη των ίδιων συνθηκών που επικράτησαν και στην δεύτερη σειρά μόνο που σε κάθε μια από τις 4 πειραματικές δοκιμές (C1, C2, C3, C4) έγινε αλλαγή μιας παραμέτρου. Στον κύκλο πειραμάτων C1, η προ-επεξεργασία της τροφοδοσίας διήρκησε για 16 ώρες (αντί για 5 ώρες), στον κύκλο C2 η ενζυμική υδρόλυση διήρκησε για 16 ώρες (αντί για 5 ώρες), στον κύκλο C3 αυξήθηκε η ποσότητα ενζύμων που χρησιμοποιούνται κάθε φορά και τέλος, στον κύκλο C4 έγινε χρήση πυκνότερων διαλυμάτων προ-επεξεργασίας.

Αρχικά, από το Διάγραμμα 9, επιβεβαιώνεται για ακόμη μια φορά πως η χρήση του Cellic CTec2 ενδείκνυται για ενζυμική υδρόλυση μιγμάτων SCG/BSG, έναντι του NS 22177. Συγκρίνοντας κάθε ένα από τα 4 πειράματα χρήσης Cellic CTec2 με το αντίστοιχο πείραμα χρήσης NS 22177 (C1.3 – C1.4, C2.3 – C2.4, C3.3 – C3.4, C4.3 – C4.4), διακρίνεται πως με το Cellic CTec2 επιτυγχάνεται υψηλότερη απόδοση αιθανόλης. Σε κάθε περίπτωση, όπως φαίνεται στο Διάγραμμα 9, η διεργασία της ενζυμικής υδρόλυσης τελικά επιτυγχάνει υψηλότερα ποσοστά απόδοσης αιθανόλης σε σύγκριση με τις διεργασίες όπου το 2^ο αυτό στάδιο παρακάμπτεται (Πειράματα C1.2, C2.2, C3.2, C4.2).

Η υψηλότερη απόδοση αιθανόλης που μετρήθηκε στην τρίτη σειρά πειραμάτων αφορά το πείραμα C3.3, χαρακτηριστικό του οποίου είναι η χρήση μεγαλύτερης ποσότητας ενζύμου κυτταρίνης Cellic CTec2. Συγκεκριμένα, αντί για 400 μL Cellic CTec2/g αρχικής κυτταρίνης (Πείραμα B3), χρησιμοποιήθηκαν 800 μL/g αρχικής κυτταρίνης. Αυτό είχε ως αποτέλεσμα η απόδοση της αιθανόλης να φτάσει τα 57.32%, ένα ποσοστό που βρίσκεται ιδιαίτερα ψηλά σε σχέση με την απόδοση της αιθανόλης στο πείραμα B3, το οποίο είχε απόδοση 31.39%. Σε αυτό το σημείο αξίζει να τονιστεί πως αύξηση στην απόδοση της αιθανόλης προκαλείται και από την αύξηση του ενζύμου NS 22177. Στο πείραμα B4 όπου χρησιμοποιήθηκαν 175 μL NS22177/g αρχικής κυτταρίνης σημειώνεται απόδοση αιθανόλης ύψους 23.46%. Αντίθετα, στο πείραμα C3.4 της τρίτης σειράς πειραμάτων, όπου χρησιμοποιήθηκαν 250 μL NS 22177/g αρχικής κυτταρίνης, η απόδοση αιθανόλης αυξήθηκε σε ποσοστό 42.66%.

Η δεύτερη παράμετρος που φαίνεται να επηρεάζει εξίσου σημαντικά τη συνολική απόδοση της ζύμωσης του μίγματος SCG/BSG είναι ο χρόνος της προ-επεξεργασίας. Τα πειράματα C1.2, C1.3 και C1.4 έδειξαν πως η παρατεταμένη προ-επεξεργασία της τροφοδοσίας (Το SCG με NaOH 0.5M και το BSG με H₂SO₄ 0.25M) επιδρά θετικά στην τελική απόδοση της αιθανόλης. Ο παρατεταμένος χρόνος προ-επεξεργασίας δίνει την δυνατότητα στα διαλύματα να διεισδύσουν αποτελεσματικά την τροφοδοσία και να διασπάσουν σε βάθος πολυσακχαρίτες όπως η μη διαλυτή λιγνίνη και η ημικυτταρίνη αλλά ακόμη και κυτταρίνη (Πίνακας 30), συμβάλλοντας έτσι στην αποτελεσματικότερη ενζυμική υδρόλυση και ζύμωση της ύλης για παραγωγή αιθανόλης. Συγκεκριμένα, φαίνεται πως με προ-επεξεργασία 16 ωρών αντί για 5

4.3 Πειραματικές δοκιμές και Αποτελέσματα: Δευτερογενή πειραματικά αποτελέσματα

ώρες, επιτυγχάνεται απόδοση αιθανόλης που ξεπερνά το 51% (σε σύγκριση με την απόδοση 31.39% των 5 ωρών) όταν γίνεται και χρήση Cellic CTec2 στο στάδιο της ενζυμικής υδρόλυσης. Αύξηση της απόδοσης εμφανίζεται και στην περίπτωση που δεν χρησιμοποιείται κάποιο ένζυμο. Με προ-επεξεργασία 16 ωρών επιτυγχάνεται απόδοση αιθανόλης 6.43% σε σύγκριση με την απόδοση του πειράματος B2 των 5 ωρών, 5.27%. Τέλος, η απόδοση αιθανόλης αυξάνεται και στην περίπτωση χρήσης ενζύμου NS 22177. Στο πείραμα B4 η απόδοση είναι 23.46%, ενώ μετά την αύξηση της διάρκειας προ-επεξεργασίας η απόδοση αυξήθηκε στο 43.02% (Πείραμα C1.4).

Η επέκταση του χρόνου της ενζυμικής υδρόλυσης που αποτυπώνεται στα πειράματα C2.3 και C2.4, αυξάνει σε λιγότερο βαθμό της συνολική απόδοση της αιθανόλης. Η χρήση του Cellic CTec2 για 16 ώρες οδήγησε σε μία τελική απόδοση αιθανόλης κοντά στο 44%, ποσοστό υψηλότερο από την απόδοση του αντίστοιχου πειράματος B3, 31.39%, αλλά εμφανώς μικρότερο σε σχέση με τις άλλες 2 παραμέτρους που αναλύονται παραπάνω. Αντίστοιχα, με την χρήση του NS 22177, φαίνεται η απόδοση της αιθανόλης να αυξάνεται σε ποσοστό κοντά στο 40% σε σύγκριση με το Πείραμα B4 όπου η απόδοση ήταν 23.46%.

Τέλος, η χρήση πυκνότερων διαλυμάτων για το 1^ο στάδιο της προ-επεξεργασίας της τροφοδοσίας δεν έδωσε κάποια σημαντικά αποτελέσματα. Η προ-επεξεργασία με NaOH 1M για το SCG και H₂SO₄ 0.5M για το BSG εμφάνισε θετικά αποτελέσματα όταν στο στάδιο της ενζυμικής υδρόλυσης έγινε χρήση της κυτταρινάσης Cellic CTec2, καθώς η απόδοση αιθανόλης αυξήθηκε από 31.39% (Πείραμα B3) στο 39.98% (Πείραμα C4.3). Παρόλα αυτά, όταν χρησιμοποιήθηκε η κυτταρινάση NS 22177 η αύξηση της απόδοσης μειώθηκε (από 23.46% του Πειράματος B4, αυξήθηκε μόλις στο 27.39% του Πειράματος C4.4), ενώ στην περίπτωση που η ενζυμική υδρόλυση παρακάμφθηκε και η ζύμωση συνέβη απευθείας μετά την προ-επεξεργασία, τα αποτελέσματα ήταν αρνητικά αφού η απόδοση της αιθανόλης μειώθηκε (Από 5.27 του Πειράματος B2, μειώθηκε στο 4.8% του Πειράματος C4.2). Σύμφωνα με τα αποτελέσματα αυτά, η χρήση πυκνότερων διαλυμάτων προ-επεξεργασίας δεν ενδείκνυται για τα SCG και BSG.

Τέλος, οι μετρήσεις της τέταρτης σειράς πειραματικών δοκιμών έδωσαν τα παρακάτω αποτελέσματα:

Πίνακας 31: Απόδοση αιθανόλης στην τέταρτη σειρά πειραματικών δοκιμών.

A/A	Αρχική κυτταρίνη(g)	Πραγματική αιθανόλη (mg)	% Απόδοση αιθανόλης
D1	42.55	20400	84.69
D2	42.55	19200	79.70

Από τα αποτελέσματα που παρουσιάζονται στον Πίνακα 31, διακρίνεται πως ο συνδυασμός των βέλτιστων συνθηκών λειτουργίας που μελετήθηκαν στην τρίτη σειρά πειραματικών δοκιμών οδηγεί σε ακόμη μεγαλύτερες αποδόσεις αιθανόλης. Στο πείραμα D1, εφαρμόστηκαν οι πειραματικές συνθήκες του πειράματος C3.3 που έδωσε τα καλύτερα αποτελέσματα ως προς την παραγωγή αιθανόλης (57%). Στο πείραμα D2 εφαρμόστηκε η αλλαγή παραμέτρου που εφαρμόστηκε στα πειράματα C1, C2 και C3, δηλαδή τόσο το στάδιο της προ-επεξεργασίας όσο και η ενζυμική υδρόλυση διήρκησαν 16 ώρες, ενώ για την τελευταία χρησιμοποιήθηκαν 800μL Cellic CTec2/g αρχικής κυτταρίνης. Επιπλέον, η διεργασία της ζύμωσης διήρκησε για 72 ώρες. Αυτό είχε ως αποτέλεσμα, η απόδοση αιθανόλης να αυξηθεί στο 79.70% σε σύγκριση με την υψηλότερη απόδοση της τρίτης σειράς, στα 57.32% (Πείραμα C3.3). Έτσι, αποδεικνύεται πως η αλλαγή κλίμακας έχει πολύ σημαντική θετική συνεισφορά. Το γεγονός αυτό μπορεί κατά κύριο λόγο να αποδοθεί στη μηχανική ανάδευση που εφαρμόστηκε.

4.3.2.1 Αναγωγικά σάκχαρα μετά τη ζύμωση

Σύμφωνα με τα πρωτογενή αποτελέσματα των υγρών κλασμάτων που παρουσιάζονται στους Πίνακες 14, 17 και 20, παρατηρείται η ύπαρξη υψηλής συγκέντρωσης αναγωγικών σακχάρων μετά την λήξη της διεργασίας της ζύμωσης, σε σύγκριση με την συγκέντρωση της γλυκόζης. Συγκεκριμένα, στην πρώτη σειρά πειραματικών μετρήσεων τα αναγωγικά σάκχαρα μετά το τελευταίο στάδιο της ζύμωσης εμφανίζονται σε συγκεντρώσεις που κυμαίνονται στο εύρος 0.36 – 3.07 mg/L, όταν η γλυκόζη παρουσιάζει συγκεντρώσεις σε εύρος 0.04 – 0.55 mg/L (Πίνακας 14). Αντίστοιχα, στην δεύτερη σειρά μετρήσεων, το φαινόμενο αυτό δείχνει πιο έντονο καθώς τα TRS καταλαμβάνουν συγκεντρώσεις σε εύρος 0.97 – 5.38 mg/L, ενώ η γλυκόζη 0.21 – 0.25 mg/L.

Αρχικά, το γεγονός πως εξακολουθεί να υπάρχει στο υπερκείμενο υγρό ποσότητα γλυκόζης δεν σημαίνει απαραίτητα πως η ζύμωση δεν έχει ολοκληρωθεί. Σύμφωνα με πηγές [112], τα μονομερή σάκχαρα της γλυκόζης συνεχίζουν να εμφανίζονται καθ' όλη την διάρκεια της συνολικής διεργασίας, ακόμη και στο στάδιο της ζύμωσης και αυτό συμβαίνει καθώς η ενζυμική υδρόλυση δεν παύει να συμβαίνει. Τα ένζυμα εξακολουθούν να διεισδύουν την πρώτη ύλη, επιτρέποντας την περαιτέρω απελευθέρωση σακχάρων, ενώ ταυτόχρονα ο ζυμομύκητας, καταναλώνοντας τα, παράγει αιθανόλη. Το φαινόμενο αυτό παραπέμπει στην ταυτόχρονη σακχαροποίηση και ζύμωση (Simultaneous saccharification and co-fermentation, SSCF), η οποία είναι μια εναλλακτική μέθοδος παραγωγής αιθανόλης από βιομάζα [112].

Όσον αφορά τα αναγωγικά σάκχαρα, TRS, στα οποία περιλαμβάνονται τόσο οι εξόζες, όπως και η γλυκόζη, αλλά και οι πεντόζες, όπως η ξυλόζη και η αραβινόζη, βρίσκονται σε πολύ υψηλά επίπεδα μετά το πέρας της ζύμωσης. Το γεγονός αυτό, επίσης, δεν συνδέεται με μειωμένη απόδοση στην παραγωγή αιθανόλης. Αντίθετα, η υψηλή συγκέντρωση των TRS σημαίνει πως δομικά συστατικά όπως η ημικυτταρίνη και λιγνίνη έχουν διασπαστεί επαρκώς. Παρόλα αυτά, επειδή ο σακχαρομύκητας που χρησιμοποιείται στις πειραματικές δοκιμές (*Saccharomyces cerevisiae*) δεν παρέχει την δυνατότητα για κατανάλωση πεντόζων, τα σάκχαρα αυτά παραμένουν ακόμη και μετά το στάδιο της ζύμωσης. Ο *Saccharomyces cerevisiae* αποτελεί τον τύπο μαγιάς που εμπεριέχεται στην μαγιά αρτοποιίας και σύμφωνα με έρευνες, [101, p. 567], είναι ικανός να καταναλώσει μόνο σάκχαρα εξόζες όπως είναι η γλυκόζη και η φρουκτόζη.

Έτσι, το γεγονός πως στην δεύτερη σειρά πειραματικών δοκιμών τα αναγωγικά σάκχαρα βρίσκονται με μεγαλύτερη συγκέντρωση σε σύγκριση με την πρώτη σειρά πειραματικών δοκιμών επαληθεύει για ακόμη μια φορά πως το είδος της προ-επεξεργασίας που χρησιμοποιήθηκε στη δεύτερη σειρά πειραμάτων παρουσιάζει μεγαλύτερο ενδιαφέρον και ενδείκνυται για πρώτες ύλες BSG/SCG.

5 Συμπεράσματα

Στην παρούσα εργασία διερευνήθηκε το δυναμικό παραγωγής αιθανόλης από μίγματα εξαντλημένων κόκκων καφέ (SCG) και εξαντλημένων σπόρων κριθαριού αποβλήτων ζυθοποιίας (BSG). Σχεδιάστηκαν τέσσερις πειραματικοί κύκλοι κατά τους οποίους εξετάστηκαν διαδοχικά διαφορετικές αναλογίες μιγμάτων, η επίδραση της αλκαλικής (NaOH 0,5M και 1M) και όξινης προεπεξεργασίας (H_2SO_4 0,25M και 0,5M), η αποτελεσματικότητα δύο διαφορετικών κυτταρινολυτικών ενζύμων (CellicTec2 και NΣ22177 της Novozymes, Denmark) και προσδιορίστηκε η απόδοση σε αιθανόλη ύστερα από ζύμωση με *S. Cerevisiae* 2% w/w. Μετά το πέρας των πειραματικών αναλύσεων και την επεξεργασία των αποτελεσμάτων προέκυψαν τα ακόλουθα συμπεράσματα, σε σχέση με το βέλτιστο συνδυασμό πειραματικών συνθηκών και την μεγιστοποίηση της απόδοσης της συνολικής διεργασίας. Αυτή ποσοτικοποιήθηκε βάσει της συγκέντρωσης αιθανόλης που προσδιορίστηκε ύστερα από το τελικό στάδιο της ζύμωσης.

Αρχικά, όσον αφορά στη χρήση μιγμάτων SCG:BSG με διαφορετικές αναλογίες των πρώτων υλών (20:80, 50:50, 80:20), διαπιστώθηκε πως μεγάλες διακυμάνσεις ως προς τη σύσταση οδήγησαν σε χαμηλά ποσοστά αποικοδόμησης των δομικών πολυσακχαριτών, και χαμηλές αποδόσεις σε αιθανόλη που κυμάνθηκαν από 5,4 έως 27,4%. Αντιθέτως, όταν τα υποστρώματα SCG και BSG εξετάστηκαν ξεχωριστά είτε σε αναλογία 1:1 η αποικοδόμηση των πολυσακχαριτών ήταν πιο αποτελεσματική, με το στάδιο της ζύμωσης να διατηρείται στα ίδια μέτρια επίπεδα αποτελεσματικότητας.

Όσον αφορά στην επίδραση των διαλυμάτων προ-επεξεργασίας στα εξεταζόμενα υποστρώματα παρατηρήθηκε ότι, για το μεν BSG συμπεριφέρεται καλύτερα η όξινη προεπεξεργασία (H_2SO_4 0,25M και 0,5M), για το δε SCG η αλκαλική (NaOH 0.5M και 1M). Όταν δείγματα BSG προ-επεξεργάστηκαν με H_2SO_4 εξασφαλίστηκε περίπου διπλάσια διάσπαση ημικυτταρίνης (84% έναντι 41%) και πρόσθετα διάσπαση κυτταρίνης έως και 40%, που δεν παρατηρήθηκε κατά την αλκαλική προεπεξεργασία. Η χρήση πυκνότερων διαλυμάτων εξασφάλισε υψηλότερα ποσοστά αποικοδόμησης κυτταρίνης, ημικυτταρίνης, αμύλου και λιγνίνης για το υπόστρωμα BSG αλλά δεν διαφοροποίησε τις αντίστοιχες αποικοδομήσεις για το SCG. Όταν τα δύο υποστρώματα προ-επεξεργάστηκαν με διαφορετικό χημικό μέσο (NaOH για το SCG, H_2SO_4 για το BSG) και στη συνέχεια συνδυάστηκαν για την παραγωγή μίγματος, που ακολούθως υδρολύθηκε ενζυμικά και ζυμώθηκε, η διεργασία ήταν πιο αποτελεσματική από ότι όταν μίγμα BSG/SCG υποβλήθηκε σε απευθείας αλκαλική προεπεξεργασία, υδρόλυση και ζύμωση. Χαρακτηριστικά, εξασφαλίστηκαν αποδόσεις σε αιθανόλη που κυμάνθηκαν από 27,39% έως 57,33%, έναντι του εύρους

12,75%- 27,62% που καταγράφηκε από μίγματα που υπεβλήθησαν σε κοινή διεργασία προεπεξεργασίας.

Σχετικά με την παράμετρο του χρόνου, βρέθηκε πως η αποικοδόμηση των βασικών πολυσακχαριτών τόσο του BSG όσο και του SCG επιτυγχάνεται σε υψηλότερο βαθμό μετά την ολοκλήρωση της ζύμωσης όταν η προ-επεξεργασία λειτουργεί για παρατεταμένο χρόνο (για 16 αντί για 5 ώρες). Η διαφορά αυτή είναι εμφανής όταν γίνεται σύγκριση μεταξύ των πειραμάτων C1.3 και B3. Βρέθηκε πως με επέκταση του χρόνου επεξεργασίας, επιτυγχάνεται η διάσπαση της ημικυτταρίνης σε ποσοστό 49%, σε αντίθεση με το 39% του πειράματος B3.

Σχετικά με το δεύτερο στάδιο της ενζυμικής υδρόλυσης, έγινε σύγκριση μεταξύ δύο διαφορετικών κυτταρινολυτικών ενζύμων, του CellicCTec2 και του NS 22177 (Novozymes, Denmark), με δοσολογία 400 μL/g αρχικής κυτταρίνης και 175 μL/g αρχικής κυτταρίνης, αντίστοιχα. Σε όλες τις πειραματικές δοκιμές, ελέγχθηκε και αξιολογήθηκε η χρήση του εκάστοτε ενζύμου, ως προς το ποσοστό υδρόλυσης της κυτταρίνης που εξασφάλισε αλλά και την τελική απόδοση σε αιθανόλη που προσδιορίστηκε. Παρατηρήθηκε πως το CellicCTec2 επιδρά ισχυρότερα στη διάσπαση της κυτταρίνης σε μίγματα SCG/BSG 1:1, σε σύγκριση με το NS 22177. Όπως φάνηκε από τα αποτελέσματα της δεύτερης σειράς πειραμάτων, η κυτταρίνη, με χρήση CellicCTec2, διασπάται σε ποσοστό μέχρι και 41.26%, ενώ με το NS 22177 το ποσοστό αυτό περιορίζεται στο 20.90%. Επιπλέον, αξιολογήθηκε η χρήση αυξημένης ποσότητας ενζύμου, και συγκεκριμένα 800 μL/g αρχικής κυτταρίνης για το Cellic CTec2, και 250 μL/g αρχικής κυτταρίνης για το NS 22177. Τα αποτελέσματα έδειξαν πως η αυξημένη δοσολογία ενζύμων είχε θετική επίδραση στη συνολική απόδοση της ζύμωσης. Οι αποδόσεις σε αιθανόλη υπό τις εξεταζόμενες συνθήκες ήταν 57,32% για το CellicCTec 2 και 42,66% για το NS 22177.

Από την αξιολόγηση όλων των προαναφερθεισών πειραματικών συνθηκών σε μικρή κλίμακα (100ml), σχεδιάστηκε ο τέταρτος πειραματικός κύκλος, που πραγματοποιήθηκε σε μεγαλύτερη κλίμακα (4L). Στόχος ήταν ο συνδυασμός των παραμέτρων εκείνων που υποδείκνυαν την πιο αποτελεσματική αποικοδόμηση των δομικών πολυσακχαριτών των μιγμάτων SCG/BSG, σε συνδυασμό με την αποτελεσματική ενζυμική υδρόλυση και ακόλουθη ζύμωση προς παραγωγή αιθανόλης.

Οι πειραματικές συνθήκες, που εξασφάλισαν τα υψηλότερα ποσοστά αποικοδόμησης και οδήγησαν σε υψηλότερες αποδόσεις σε αιθανόλη, περιλάμβαναν ξεχωριστή προεπεξεργασία των πρώτων υλών (NaOH 0.5M για το SCG και H₂SO₄ 0.25M για το BSG, προεπεξεργασία στους 50°C για 16 ώρες), ανάμιξη των προεπεξεργασμένων υποστρωμάτων, ενζυμική υδρόλυση για 5 ώρες με το

κυτταρινολυτικό ένζυμο CellicCTec 2 σε δοσολογία 800 μL/g αρχικής κυτταρίνης και τέλος ζύμωση, με *S. Cerevisiae* 2% κ.β. (30°C, 24 ώρες). Υπό τις συνθήκες αυτές εξασφαλίστηκε απόδοση σε αιθανόλη έως 84,69%.

Συμπερασματικά, η αξιοποίηση μιγμάτων αποτελούμενων από εξαντλημένους σπόρους κριθαριού και εξαντλημένους κόκκους καφέ, σε αναλογία 1:1, προς την κατεύθυνση της παραγωγής βιοαιθανόλης είναι τεχνικά εφικτή με ικανοποιητικές αποδόσεις. Υπό τις εξεταζόμενες συνθήκες, εξασφαλίστηκαν ικανοποιητικά ποσοστά αποικοδόμησης των δομικών πολυσακχαριτών των υποστρωμάτων, προσδιορίστηκε η καταλληλότητα του Cellic CTec 2 ως κυτταρινολυτικό ένζυμο υποψήφιο για εφαρμογές μεγαλύτερης κλίμακας και επαληθεύτηκε η δυνατότητα αναπαραγωγής της μεθόδου για την παραγωγή αιθανόλης σε ικανοποιητικά ποσοστά.

Βιβλιογραφικές πηγές

- [1] «Statistics,» 2019. [Ηλεκτρονικό]. Available: http://www.ico.org/new_historical.asp?section=Statistics.
- [2] J. L. Massey, *Coffee Production, Consumption and Health Benefits*, New York: Nova Science Publishers, 2016.
- [3] «National Coffee Association USA,» [Ηλεκτρονικό]. Available: <http://www.ncausa.org/about-coffee/history-of-coffee>. [Πρόσβαση 6 12 2019].
- [4] «iefimerida,» News, [Ηλεκτρονικό]. Available: <https://www.iefimerida.gr/news/107177/%CE%B7-%CE%B9%CF%83%CF%84%CE%BF%CF%81%CE%AF%CE%B1-%CF%84%CE%BF%CF%85-%CE%BA%CE%B1%CF%86%CE%AD-%CF%80%CF%89%CF%82-%CE%AD%CF%86%CF%84%CE%B1%CF%83%CE%B5-%CF%83%CF%84%CE%B7%CE%BD-%CE%B1%CE%BD%CE%B1%CF%84%CE%BF%CE%BB%CE%AE>. [Πρόσβαση 6 12 2019].
- [5] M. M. N. Pushpa S. Murthy, «Recovery of Phenolic Antioxidants and Functional Compounds from Coffee Industry By-Products,» *Food and Bioprocess Technology*, pp. 897-903, 2012.
- [6] T. J. & M. P. G.-A. & M. B. & W. H. v. Z. & J. F. Görgens, «Enzymatic Hydrolysis of Spent Coffee Ground,» p. 2249, 2013.
- [7] M. R. L. R. T. P. L. O. N. D. F. A. G. N. G. F. D. P. Michele Balzano, «Spent espresso coffee grounds as a source of anti-proliferative and antioxidant compounds,» *Innovative Food Science and Emerging Technologies*, p. 1, 2019.
- [8] M. S. & A. A. & M. O. & I. V. & I. M. I. & G. M. & D. Fasoula, «Converting environmental risks to benefits by using spent coffee grounds (SCG) as a valuable resource,» *SUSTAINABLE WASTE MANAGEMENT*, p. 35777, 2018.
- [9] I. Kookos, «Technoeconomic and environmental assessment of a process for biodiesel production from spent coffee grounds (SCGs),» *Resources, Conservation & Recycling*, pp. 156-157, 2018.
- [10] R. L. Antonio Zuorro, «Spent coffee grounds as a valuable source of phenolic compounds and bioenergy,» *Journal of Cleaner Production*, 2011.
- [11] N. J. A. A. R. D. A. H. Mohamed Elmously, «Thermo-Catalytic Reforming of spent coffee grounds,» *Bioresources and Bioprocessing*, 2019.
- [12] P. K. A. Z. R. Ktori, «Spent coffee grounds valorization through pyrolysis for energy and materials production in the concept of circular economy,» 2017.

- [13] L. J. M. R. Y. T.-I. M. G. K. Ramalakshmi, «Bioactivities of low-grade green coffee and spent coffee in different in vitro model systems,» *Food Chemistry*, 2008.
- [14] S. P. J. A. R.-H. Ana Jimenez-Zamora, «Revalorization of coffee by-products. Prebiotic, antimicrobial and antioxidant properties,» *LWT - Food Science and Technology*, 2014.
- [15] A. A. C. G. V. A. O. G.-R. P. V. M. C. F.-E. Mirna Leonor Suárez-Quiroz, «Isolation of green coffee chlorogenic acids using activated carbon,» *Journal of Food Composition and Analysis*, τόμ. 33, αρ. 1, pp. 55-58, 2014.
- [16] M. J. C. Brazinha, «Valorisation of spent coffee through membrane processing,» *Journal of Food Engineering*, τόμ. 149, pp. 123-130, 2015.
- [17] J. I. M. C. C. B. K. L. D. P. M. C. C. Bravo J, «Evaluation of spent coffee obtained from the most common coffeemakers as a source of hydrophilic bioactive compounds.,» pp. 12565-12573, 2012.
- [18] M. R. E. S. B. C. E. U. M. G. K. I. C. S. Francisca Acevedo, «Spent Coffee Grounds as a Renewable Source of Bioactive Compounds,» *Journal of Biobased Materials and Bioenergy*, 2013.
- [19] A. Z. R. L. G. M. R. P. Alessia Panusa, «Recovery of Natural Antioxidants from Spent Coffee Grounds,» *J. Agric. Food Chem.*, pp. 4162-4168, 2013.
- [20] C. M. I. J. M.-P. D. P. C. C. Jimena Bravo, «Influence of extraction process on antioxidant capacity of spent coffee,» *Food Research Internationa*, 2013.
- [21] C. M. Galanakis, *Handbook of Coffee Processing By-Products*, 2017.
- [22] Φ. Ζ. Δ. Κ. Ε. ΛΟΗΣ, *Τεχνολογία Καυσίμων και Λιπαντικών*, ΑΘΗΝΑ: ΕΘΝΙΚΟ ΜΕΤΣΟΒΙΟ ΠΟΛΥΤΕΧΝΕΙΟ, 2014.
- [23] A. B. M. S. Lenka BLINOVÁ, «Biodiesel Production from Spent Coffee Grounds,» τόμ. 25, αρ. 40, p. 114, 2017.
- [24] S. F. F. H. M. K. M. K. Zayed Al-Hamamre, «Oil extracted from spent coffee grounds as a renewable source for fatty acid methyl ester manufacturing,» *Fuel*, τόμ. 96, pp. 70-76, 2012.
- [25] V. F. S. T. M. M. Nídia S. Caetano, «Valorization of Coffee Grounds for Biodiesel Production,» *CHEMICAL ENGINEERING TRANSACTIONS*, τόμ. 26, pp. 267-272, 2012.
- [26] H. M. B. P. C. M. Marcelo M.R. de Melo, «Supercritical fluid extraction of spent coffee grounds: Measurement of extraction curves, oil characterization and economic analysis,» *The Journal of Supercritical Fluids*, τόμ. 86, pp. 150-159, 2014.
- [27] J. S. BEHDAD AHANGARI, «EXTRACTION OF LIPIDS FROM SPENT COFFEE GROUNDS USING ORGANIC SOLVENTS AND SUPERCRITICAL CARBON DIOXIDE,» *Food Processing and Preservation*, pp. 1014-1021, 2012.

- [28] S. P. P. B. Z. S. L. E. I. M. Stanislav Obruca, «Utilization of oil extracted from spent coffee grounds for sustainable,» *Applied Microbiology and Biotechnology*, 2014.
- [29] A. P. P. L. F. F. V. D. P. S. S. B. M. A. Madalena V.Cruz, «Production of polyhydroxyalkanoates from spent coffee grounds oil obtained by supercritical fluid extraction technology,» *Bioresource Technology*, τόμ. 157, pp. 360-363, 2014.
- [30] R. I. Mussatto S, «Alternatives for detoxification of diluted-acid lignocellulosic hydrolyzates for use in fermentative processes: a review.,» pp. 1-10, 2004.
- [31] P. Z. Sepideh Tajik, «Heavy Metal Contaminated Agricultural Soil Treatment by Spent Coffee Grounds (SCG),» *15th Iranian Congress of Toxicology*, 2019.
- [32] S. J. G. L. H. P. J. Y. K. Man Ho Park, «Removal of aqueous-phase Pb(II), Cd(II), As(III), and As(V) by nanoscale zero-valent iron supported on exhausted coffee grounds,» *Waste Management*, 2019.
- [33] Z. A. H. N. Azouaou, «Adsorption of cadmium from aqueous solution onto untreated coffee grounds: Equilibrium, kinetics and thermodynamics,» *Journal of Hazardous Materials*, τόμ. 184, αρ. 1-3, pp. 126-134, 2010.
- [34] J. M. P. Y. L. J. J. L. Nubia María Mora Alvareza, «Evaluation of mercury (Hg²⁺) adsorption capacity using exhausted coffee,» *Sustainable Chemistry and Pharmacy*, 2018.
- [35] C. C. W. T. S. J. Virote Boonamnuayvitaya, «Removal of heavy metals by adsorbent prepared from pyrolyzed coffee residues and clay,» *Separation and Purification Technology*, τόμ. 35, αρ. 1, pp. 11-22, 2004.
- [36] S.-Y. O. & Y.-D. Seo, «Sorption of halogenated phenols and pharmaceuticals to biochar: affecting factors and mechanisms,» *Environmental Science and Pollution Research*, τόμ. 23, pp. 951-961, 2016.
- [37] T. T. T. T. T. K. N. T. S. Nakamura, «Decolorization of acidic dye by charcoal from coffee grounds,» *Journal of Health Science*, τόμ. 49, αρ. 6, pp. 520-523, 2003.
- [38] F.-B. H.-A. F. Boudrahem, «Batch sorption dynamics and equilibrium for the removal of lead ions from aqueous phase using activated carbon developed from coffee residue activated with zinc chloride,» *Journal of Environmental Management*, τόμ. 90, αρ. 10, pp. 3031-3039, 2009.
- [39] B. H. C. , M.-J. H. T.-U. J. K.-H. A. Kyung-Won Jung, «Fabrication of granular activated carbons derived from spent coffee grounds by entrapment in calcium alginate beads for adsorption of acid orange 7 and methylene blue,» *Bioresource Technology*, pp. 185-195, 2016.
- [40] S.-C. L. C.-H. H. Wen-Tien Tsai, «Preparation and fuel properties of biochars from the pyrolysis of exhausted coffee residue,» *Journal of Analytical and Applied Pyrolysis*, τόμ. 93, pp. 63-67, 2012.
- [41] M. P. N. M. R. L. Limousy, «Gaseous products and particulate matter emissions of biomass residential boiler fired with spent coffee grounds pellets,» *Fuel*, τόμ. 107, pp. 323-329, 2013.

- [42] B. R. M. W. Z. K. W. R. L. E. T. J. S. K. R. B. K. S. Derek R. Vardon, «Complete Utilization of Spent Coffee Grounds To Produce Biodiesel, Bio-Oil, and Biochar,» *ACS Sustainable Chem. Eng.*, τόμ. 1, αρ. 10, pp. 1286-1294, 2013.
- [43] M. K. T. F. K. I. R. S. Y. W. M. I. Koji Yamane, «Field Evaluation of Coffee Grounds Application for Crop Growth Enhancement, Weed Control, and Soil Improvement,» *11th JGS Symposium on Environmental Geotechnics*, pp. 93-102, 2015.
- [44] M. Zhou, «Barley production and consumption,» σε *Genetics and Improvement of Barley Malt Quality*, 2010, p. Chapter 1.
- [45] «European Commission,» 28 11 2019. [Ηλεκτρονικό]. Available: https://ec.europa.eu/info/food-farming-fisheries/farming/facts-and-figures/markets/overviews/market-observatories/crops/cereals-statistics_en.
- [46] «Agricultural Marketing Resource Center,» [Ηλεκτρονικό]. Available: <https://www.agmrc.org/commodities-products/grains-oilseeds/barley-profile>. [Πρόσβαση 13 12 2019].
- [47] P. G. L. G. William Jefferson Darby, *The Gift of Osiris*, New York: Academic Press, 1977.
- [48] «Western Trails Food,» [Ηλεκτρονικό]. Available: http://new.westerntrailsfood.com/docs/barley_history_newmans.pdf. [Πρόσβαση 14 12 2019].
- [49] «Wiley Online Library,» [Ηλεκτρονικό]. Available: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/full/10.1111/j.1541-4337.2010.00112.x>. [Πρόσβαση 14 12 2019].
- [50] G. D. I. R. S.I. Mussatto, «Brewers' spent grain: generation, characteristics and potential applications,» *Journal of Cereal Science*, pp. 1-14, 2006.
- [51] Α. Ξανθή, «Στάδια παραγωγής μπύρας,» [Ηλεκτρονικό]. Available: <https://www.slideshare.net/albaxan/ss-8780634>. [Πρόσβαση 14 12 2019].
- [52] Π. Στεφανιδάκης, «beeroskopio,» [Ηλεκτρονικό]. Available: http://www.beeroskopio.com/2014/06/blog-post_2608.html. [Πρόσβαση 14 12 2019].
- [53] E. J. S. E. K. A. Kieran M. Lynch, «Brewers' spent grain: a review with an emphasis on food and health,» *Wiley Online Library*, pp. 553-568, 2016.
- [54] P. Townsley, «Preparation of commercial products from brewer's waste grain and trub.,» τόμ. 16, pp. 130-134, 1979.
- [55] K. M. Y. A. Osamu Kanauchi, «Development of a Functional Germinated Barley Foodstuff from Brewer's Spent Grain for the Treatment of Ulcerative Colitis,» *American Society of Brewing Chemists*, pp. 59-62, 2001.

- [56] J. J. J. B. B. C. G.-C. M. J. d. N. M Santos, «Variability of Brewers spent grain within a brewery,» *Food Chemistry*, pp. 17-21, 2003.
- [57] P. E. J. C. P. H. P. F. M. G. Florbela Carvalheiro, «Production of oligosaccharides by autohydrolysis of brewery's spent grain,» *Bioresource Technology*, pp. 93-100, 2004.
- [58] M. M. T. E. C. P. Xiros C, «Factors affecting ferulic acid release from Brewer's spent grain by *Fusarium oxysporum* enzymatic system.,» *Bioresour Technol.*, τόμ. 100, pp. 5917-5921, 2009.
- [59] M. L. R. F. F. H. P. W. A. C. C. B. K. W. Andrew J.Jay, «A systematic micro-dissection of brewers' spent grain,» *Journal of Cereal Science*, τόμ. 47, αρ. 2, pp. 357-364, 2008.
- [60] K. J. J. T. B. T. F. V. G. K. W. James A.Robertson, «Profiling brewers' spent grain for composition and microbial ecology at the site of production,» *LWT - Food Science and Technology*, τόμ. 43, αρ. 6, pp. 890-896, 2010.
- [61] F. J. J. T. E. K. A. E. Z. Deborah M Waters, «Fibre, protein and mineral fortification of wheat bread through milled and fermented brewer's spent grain enrichment,» *European Food Research and Technology*, τόμ. 235, αρ. 5, pp. 767-778, 2012.
- [62] S. M. J. A. S. I. Nuno G.T.Meneses, «Influence of extraction solvents on the recovery of antioxidant phenolic compounds from brewer's spent grains,» *Separation and Purification Technology*, τόμ. 108, pp. 152-158, 2013.
- [63] «ΕΚΠΑ Τμήμα Χημείας,» Εθνικό και Καποδιστριακό Πανεπιστήμιο Αθηνών, 2015. [Ηλεκτρονικό]. Available: http://195.134.76.37/chemicals/chem_Vanillin.htm#05. [Πρόσβαση 16 12 2019].
- [64] Y. C. O. A. C. C. O. P. R. J. F. N. M. O. Aoife L. McCarthy, «Phenolic extracts of brewers' spent grain (BSG) as functional ingredients – Assessment of their DNA protective effect against oxidant-induced DNA single strand breaks in U937 cells,» *Food Chemistry*, τόμ. 134, pp. 641-646, 2012.
- [65] E. M. P. B. C. C. L. C. C. V. Sérgio Ferreira, «Experimental Analysis of Brewers' Spent Grains Steam Gasification in an Allothermal Batch Reactor,» *energies*, τόμ. 12, 2019.
- [66] P. J. A. P. A. M. F. R. A. K. Maciej P. Olszewski, «Pyrolysis Kinetics of Hydrochars Produced from Brewer's Spent Grains,» *catalysts*, τόμ. 9, 2019.
- [67] V. Pérez, J. Murillo, R. Bados, L. Esteban και R. a. S. J. Ramos, «Unit of Environmental Science and Technology,» 2017. [Ηλεκτρονικό]. Available: <http://uest.ntua.gr/athens2017/proceedings/presentations/Perez.pdf>. [Πρόσβαση 17 12 2019].
- [68] M. Si, «Brewer's spent grain: a valuable feedstock for industrial applications.,» *J Sci Food Agric*, τόμ. 94, αρ. 7, pp. 1264-1275, 2014.
- [69] B. L. f. Landwirtschaft, «Futterwert, Konservierung und erfolgreicher Einsatz beim Wiederkäuer,» Μάρτιος 2008. [Ηλεκτρονικό]. Available:

https://www.lfl.bayern.de/mam/cms07/publikationen/daten/informationen/p_29845.pdf.
[Πρόσβαση 18 12 2019].

- [70] J. J. B. B. C. G.-C. M. d. N. M Santos, «Variability of brewer's spent grain within a brewery,» *Food Chemistry*, τόμ. 80, αρ. 1, pp. 17-21, 2003.
- [71] M. J. J. M. d. N. C.-C. B. Bartolomé, «Pentoses and Hydroxycinnamic Acids in Brewer's Spent Grain,» *Journal of Cereal Science*, τόμ. 36, αρ. 1, pp. 51-58, 2002.
- [72] S. C. W. M. Z. Tang, «Modelling the Superheated-steam Drying of a Fixed Bed of Brewers' Spent Grain,» *Biosystems Engineering*, τόμ. 87, αρ. 1, pp. 67-77, 2004.
- [73] S. C. M. Zhongwei Tang, «Thin-layer drying of spent grains in superheated steam,» *Journal of Food Engineering*, τόμ. 67, αρ. 4, pp. 457-465, 2005.
- [74] H. NJ, «Brewery by-products and effluents,» σε *Handbook of Brewing*, New York, NY, Hardwick WA. Marcel Dekker, 1994, pp. 501-550.
- [75] D. N.G. Belibasakis, «Effects of wet brewers grains on milk yield, milk composition and blood components of dairy cows in hot weather,» *Animal Feed Science and Technology*, τόμ. 57, αρ. 3, pp. 175-181, 1996.
- [76] S. H. a. H. L. Sawadogo L, « Presence of a factor stimulating prolactin and growth hormone secretion in brewers' spent grains.,» *Reprod Nutr*, τόμ. 29, pp. 139-146, 1989.
- [77] W. B. B. H. B. S. K. S. S. B. Denstadli V, «Effects of structure and xylanase treatment of brewer's spent grain on performance and nutrient availability in broiler chickens,» *British Poultry Science*, τόμ. 51, αρ. 3, pp. 419-426, 2010.
- [78] F. CE, «Barley fiber,» σε *Handbook of Dietary Fiber*, New York, NY, Cho S, Dreher ML, Cho SS. Marcel Dekker, 2001, pp. 519-542.
- [79] L. J. C. Charles S. Brennan, «The potential use of cereal (1→3,1→4)-β-d-glucans as functional food ingredients,» *Journal of Cereal Science*, τόμ. 42, αρ. 1, pp. 1-13, 2005.
- [80] H. V. I. G. Ö. Ö.-Ö. Emin Burçin Özvural, «Utilization of brewer's spent grain in the production of Frankfurters,» *International Journal of Food Science & Technology*, τόμ. 44, αρ. 6, pp. 1093 - 1099, 2009.
- [81] A. H. I. G. Ö. Özboy-Özbaş, «Utilization of sugarbeet fiber and brewers' spent grain in the production of tarhana,» *Zuckerindustrie. Sugar industry*, τόμ. 135, αρ. 8, pp. 496-501, 2010.
- [82] S. I. G. M.-A. J. M.-S. C. N. J. A. Silvia Martins, «Bioactive phenolic compounds: Production and extraction by solid-state fermentation. A review,» *Biotechnology Advances*, τόμ. 29, αρ. 3, pp. 365-373, 2011.

- [83] K. W. Zanker G, «The utilization of spent grains in the brewery integrated system.,» *Brauwelt*, τόμ. 142, pp. 1742-1747, 2002.
- [84] K.-R. HW, «Emissions during the combustion of spent brewer's grains.,» *Brauwelt*, τόμ. 129, pp. 2316-2319, 1989.
- [85] S. K. Y. N. I. M. Y. S. I. S. Okamoto H, «Development of Production Process of Charcoal Bricks from Spent Grain,» *KAGAKU KOGAKU RONBUNSHU*, τόμ. 28, pp. 137-142, 2002.
- [86] Y. N. O. H. I. M. A. T. a. S. J. Sato K, «Physical Property and Burning Property of Spent Grain Charcoal,» *Shigen-to-Sozai*, τόμ. 117, αρ. 7, pp. 587-590, 2001.
- [87] A. H. A. S. S. P. Asad S.N.Mahmood John G. Brammer, «The intermediate pyrolysis and catalytic steam reforming of Brewers spent grain,» *Journal of Analytical and Applied Pyrolysis*, τόμ. 103, pp. 328-342, 2013.
- [88] A. F.C.Ezeonu, «Process kinetics and digestion efficiency of anaerobic batch fermentation of brewer's spent grains (BSG),» *Process Biochemistry*, τόμ. 31, αρ. 1, pp. 7-12, 1996.
- [89] G. V. Z. G. M.-L. R. Sežun M, «Anaerobic digestion of brewery spent grain in a semi-continuous bioreactor: inhibition by phenolic degradation products.,» *Acta Chim Slov.*, τόμ. 58, αρ. 1, pp. 158-166, 2011.
- [90] G. I. S.I.Mussatto, «Ferulic and p-coumaric acids extraction by alkaline hydrolysis of brewer's spent grain,» *Industrial Crops and Products*, τόμ. 25, αρ. 2, pp. 231-237, 2007.
- [91] S. M. A. A. B. C. D.-M. L. F. G. Manuela M Moreira, «A novel application of microwave-assisted extraction of polyphenols from brewer's spent grain with HPLC-DAD-MS analysis,» *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, τόμ. 403, αρ. 4, pp. 1019-1029, 2012.
- [92] L. C. W. Q. Qingzhu Li, «Cadmium(II) adsorption on esterified spent grain: Equilibrium modeling and possible mechanisms,» *Chemical Engineering Journal*, τόμ. 197, αρ. 15, pp. 173-180, 2012.
- [93] S. S. J. R. H. A. J. J. I. G. S. F.-D. Joaquim Pedro Silva, «Adsorption of acid orange 7 dye in aqueous solutions by spent brewery grains,» *Separation and Purification Technology*, τόμ. 40, αρ. 3, pp. 309-315, 2004.
- [94] M. F. G. J. J. J. A. I. C. Solange I. Mussatto, «Production, characterization and application of activated carbon from brewer's spent grain lignin,» *Bioresource Technology*, τόμ. 101, αρ. 7, pp. 2450-2457, 2010.
- [95] L. P.Morone, «Biofuels: technology, economics, and policy issues,» σε *Handbook of Biofuels Production (Second Edition)*, Woodhead publishing, 2016, p. 66.
- [96] K. Azad, «8. Prospects and technological advancement of cellulosic bioethanol ecofuel production,» σε *Advances in Eco-Fuels for a Sustainable Environment*, Woodhead Publishing, 2019, p. 517.

- [97] R. Z. Y. C. P. L. S. F. L. Z. N. L. B. Ruan, «Bioethanol,» σε *Biofuels: Alternative Feedstocks and Conversion Processes for the Production of Liquid and Gaseous Biofuels (Second Edition)*, Academic Press, 2019, pp. 29-30.
- [98] J. M. R. M. S. P. S. V. P. Mustafa Vohra, «Bioethanol production: Feedstock and current technologies,» *Journal of Environmental Chemical Engineering*, pp. 573-584, 2014.
- [99] J. McMurry, «Κεφ. 25 Βιομόρια: υδατάνθρακες,» σε *Οργανική χημεία*, Πανεπιστημιακές εκδόσεις Κρήτης, 9η Αμερικάνικη έκδοση.
- [100] K. H. S. M. Hanieh Bamdad, «A review on common adsorbents for acid gases removal: Focus on biochar,» *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, p. 5, June 2017.
- [101] H. B. C. O. Mustafa Balat, «Progress in bioethanol processing,» *Progress in Energy and Combustion Science* 34, pp. 551-573, 28 January 2008.
- [102] E. T.-P. M. B. M. N. P. Alvira, «Pretreatment technologies for an efficient bioethanol production process based on enzymatic hydrolysis: A review,» *Bioresource Technology*, pp. 4851-4861, 2010.
- [103] P. B. D. D. M. S. P. Kumar, «Methods for pretreatment of lignocellulosic biomass for efficient hydrolysis and biofuel production.,» *Ind. Eng. Chem. Res.* 48, p. 3713–3729, 2009.
- [104] F. D. L. G. F. Carvalheiro, «Hemicellulose biorefineries: a review,» *J. Sci. Ind*, pp. 849-864, 2008.
- [105] B. C. M. Saha, «Ethanol production from alkaline peroxide pretreated enzymatically saccharified wheat straw.,» *Biotechnol. Prog*, pp. 449-453, 2006.
- [106] C. R. E. O. J. S. F. C. E. Cara, «Conversion of olive tree biomass into fermentable sugars by dilute acid pretreatment and enzymatic saccharification.,» *Bioresour. Technol.*, p. 1869–1876, 2008.
- [107] M. R. T. d. M. G. G. L. Rocha, «Enzymatic hydrolysis and fermentation of pretreated cashew apple bagasse with alkali and diluted sulfuric acid for bioethanol production.,» *Appl. Biochem. Biotechnol*, p. 407–417, 2009.
- [108] I. D. B. R. E. C. V. Verardi A., «Hydrolysis of Lignocellulosic Biomass: Current Status of Processes and Technologies and Future Perspectives,» *InTech*, 2012.
- [109] Τ. Ε. Χριστακόπουλος Παύλος, Βιοτεχνολογική παραγωγή βιοκαυσίμων, Εκδόσεις Κάλλιπος, 2015.
- [110] K. B. D. Z. Yuelel Yang, «A Sustainable Ethanol Distillation System,» *Sustainability* , pp. 92-105, 2012.
- [111] C. Y. F. C. H. H. L. Y. H. J. T. Y. Si. S., «Lignin extraction distinctively enhances biomass enzymatic saccharification in hemicelluloses-rich *Miscanthus* species under various alkali and acid pretreatments,» *Bioresource Technology*, τόμ. 183, pp. 248-254, 2015.

[112] C. G. V. B. M. W. B. E. Mingjie Jin, «Simultaneous saccharification and co-fermentation (SSCF) of AFEXTM pretreated corn stover for ethanol production using commercial enzymes and *Saccharomyces cerevisiae* 424A(LNH-ST),» *Bioresource Technology*, τόμ. 110, pp. 587-594, 2012.