



# Εθνικό Μετσόβιο Πολυτεχνείο

## ΣΧΟΛΗ ΧΗΜΙΚΩΝ ΜΗΧΑΝΙΚΩΝ

Τομέας Ι - Μονάδα Περιβαλλοντικής Επιστήμης και  
Τεχνολογίας

ΔΙΠΛΩΜΑΤΙΚΗ ΕΡΓΑΣΙΑ

«Διερεύνηση Παραγωγής Βιοδιαλυτών  
από οργανικό βιομηχανικό απόβλητο»

---

Σπυροπούλου Δήμητρα

Επιβλέπουσα καθηγήτρια: Παυλάτου Ευαγγελία

Αθήνα, Σεπτέμβριος 2022



## ΠΡΟΛΟΓΟΣ

Η παρούσα διπλωματική εργασία εκπονήθηκε στη Μονάδα Περιβαλλοντικής Επιστήμης Τεχνολογίας της Σχολής Χημικών Μηχανικών του Εθνικού Μετσόβιου Πολυτεχνείου, υπό την επίβλεψη της κα Παυλάτου Ευαγγελίας, καθηγήτριας του Ε.Μ.Π.

Αρχικά, θα ήθελα να ευχαριστήσω την κα Παυλάτου για την ευκαιρία που μου έδωσε να ασχοληθώ με ένα τόσο ενδιαφέρον θέμα, το οποίο αποτέλεσε κίνητρο για πιθανή μελλοντική ενασχόληση με το συγκεκριμένο τομέα, καθώς και για την εμπιστοσύνη που μου έδειξε καθ' όλη τη διάρκεια εκπόνησης της διπλωματικής μου εργασίας.

Επίσης, θα ήθελα να ευχαριστήσω την Χρυσάνθη Σταυράκη, μέλος του προσωπικού του εργαστηρίου, για την πολύτιμη βοήθεια της, την επιστημονική υποστήριξη, την καθοδήγηση και τις γνώσεις που μου παρείχε σε οποιαδήποτε απορία μου για την εκπόνηση της εργασίας μου.

Θα ήθελα ακόμη να ευχαριστήσω ιδιαίτερα τις Έλλη - Μαρία Μπαραμπούτη, και Σοφία Μάη, ΕΔΙΠ του Ε.Μ.Π. για τη σημαντική βοήθεια και τις χρήσιμες συμβουλές τους, καθ' όλη την διάρκεια εκπόνησης της διπλωματικής μου, την υπεύθυνη ποιότητας και αναλύσεων Jelica Novaković, καθώς και όλα τα υπόλοιπα μέλη του Εργαστηρίου για την πολύ καλή συνεργασία και το φιλικό κλίμα. Σημαντική ήταν επιπλέον η βοήθεια του Εργαστηρίου Οργανικής Χημείας, της κα Δέτση Αναστασίας, καθηγήτριας του Ε.Μ.Π. και της Ανδρομάχης Τζάνη, για την διεκπεραίωση μέρους των πειραματικών διεργασιών μου και για τις πολύτιμες γνώσεις που μου παρείχαν.

Τέλος, δε θα μπορούσα να παραλείψω τις ευχαριστίες και την ευγνωμοσύνη μου στην οικογένειά μου και τους φίλους μου για την υπομονή και τη συμπαράστασή τους τόσο κατά την διάρκεια εκπόνησης της διπλωματικής μου αλλά και για όλα τα προηγούμενα χρόνια των σπουδών μου.



## ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Η παραγωγή των βιομηχανικών αποβλήτων, τα οποία προέρχονται, είτε από τις διάφορες βιομηχανικές διαδικασίες, είτε αποτελούν προϊόντα παραγωγής που παύουν να έχουν χρησιμότητα λόγω αστοχίας φθορών ή παλαιότητας, παρουσιάζει εκθετική πορεία στη σύγχρονη εποχή, λόγω των αυξημένων αναγκών των πολιτών. Αποτελεί, έτσι, επιτακτική ανάγκη η υιοθέτηση μιας νέας κουλτούρας που θα περιλαμβάνει την ανάπτυξη μονάδων ορθής περιβαλλοντικής διαχείρισης τους και την εκμετάλλευσή τους με σκοπό την ανάκτηση ενέργειας και προϊόντων. Στόχος, λοιπόν, της παρούσας διπλωματικής ήταν η διερεύνηση της παραγωγής βιοαιθανόλης και γαλακτικού οξέος από βιομηχανικό απόβλητο και η βελτιστοποίηση των διεργασιών αυτών. Οι παράγοντες που εξετάστηκαν ήταν η φόρτιση στερεών, οι ποσότητες των ενζύμων (αμυλάση-Spirizyme EXCEL και λακτάση-Lactozyme pure), οι προστιθέμενοι μικροοργανισμοί (για τα πειράματα αιθανόλης *Saccharomyces cerevisiae* και για τα πειράματα γαλακτικού οξέος *Saccharomyces cerevisiae*, εμπορικό σύμπλεγμα πηκτικών ενζύμων, μείγμα *Lactobacillus & Streptococcus*, μείγμα *Lactobacillus* και ελεύθερη μεικτή καλλιέργεια γαλακτοβάκιλλων και ζυμομυκήτων). Έπειτα, διερευνήθηκε η παραγωγή του γαλακτικού αιθυλεστέρα, μέσω μιας αμφίδρομης αντίδρασης αιθανόλης και γαλακτικού οξέος.

Η πρώτη ύλη που χρησιμοποιήθηκε για τις παραπάνω διεργασίες ήταν απόβλητο βιομηχανίας παραγωγής βρεφικών τροφών της εταιρείας ΓΙΩΤΗΣ. Το απόβλητο αυτό χαρακτηρίστηκε φυσικοχημικά με βάση τις πρότυπες μεθόδους ανάλυσης από όπου προέκυψε η ακόλουθη σύσταση: άμυλο  $31 \pm 1.34$  % w/w, λακτόζη  $31.00 \pm 3.20$  % w/w, γαλακτικό οξύ  $2.00 \pm 0.09$  % w/w και ελεύθερη γλυκόζη  $7.54 \pm 0.84$  % w/w.

Όσον αφορά την παραγωγή βιοαιθανόλης με ταυτόχρονη σακχαροποίηση και ζύμωση (SSF), εξετάστηκε η επίδραση της συγκέντρωσης του μικροοργανισμού *Saccharomyces cerevisiae* (2%, 3% w/w του ξηρού βάρους) και της ποσότητας ενζύμων (μόνο αμυλάσης- 40, 60μL/g αμύλου, αμυλάσης και λακτάσης - 8mg/g λακτόζης) σε θερμοκρασία 35°C. Τα φορτία στερεών που μελετήθηκαν ήταν 15, 20, 25, 30, 35, 40% w/w με διάρκεια ζύμωσης 24 και 48 ώρες. Υψηλότερη συγκέντρωση αιθανόλης παρουσίασε το πείραμα με φορτίο 35% w/w με χρήση μόνο αμυλάσης, ίση με  $103.50 \pm 3.24$  g/L και απόδοση σε αιθανόλη ίση με  $89.42 \pm 2.76$ %. Από τα πειράματα προσθήκης αμυλάσης και λακτάσης, βέλτιστα ήταν αυτά για φορτίο 20% w/w με συγκέντρωση αιθανόλης ίση με  $61.25 \pm 1.77$  g/L και απόδοση  $82.12 \pm 2.28$ %. Έπειτα, δοκιμάστηκε ανακλιμάκωση των βέλτιστων συνθηκών σε 4L αντιδραστήρα, όπου επιτεύχθηκε βέλτιστη συγκέντρωση αιθανόλης ίση με 90g/L στις 45.5h και απόδοση σε αιθανόλη 77.98%.

Σχετικά με την παραγωγή του γαλακτικού οξέος διερευνήθηκαν διάφορες καλλιέργειες μικροοργανισμών και η χρήση δύο διαφορετικών ενζύμων (αμυλάσης- 40μL/g αμύλου, λακτάσης 5mg/g λακτόζης) με φορτίο στερεού 10% w/w και θερμοκρασία 40°C. Τα πειράματα με τη μεικτή καλλιέργεια, εμφάνισαν υψηλότερη συγκέντρωση γαλακτικού οξέος ίση με 42.35g/L στις 216h (9d) με προσθήκη και των δύο ενζύμων. Στη συνέχεια, εξετάστηκε η εφαρμογή επαναλαμβανόμενων ζυμώσεων (repeated fermentation) με τη μεικτή καλλιέργεια, για περαιτέρω αύξηση της συγκέντρωσης. Η βέλτιστη συγκέντρωση παρατηρήθηκε στο πείραμα που προστέθηκαν και τα δύο ένζυμα και ήταν ίση με 39.83g/L στις 72h (3d), ανάλογη με την συγκέντρωση που επιτεύχθηκε με την απλή ζύμωση στις 216h (9d).

Τέλος, πραγματοποιήθηκαν αντιδράσεις παραγωγής του γαλακτικού αιθυλεστέρα με μοριακή αναλογία αιθανόλης /γαλακτικού οξέος ίση με 3/1 και προσθήκη του καταλύτη Amberlyst 15 σε κλάσμα βάρους  $w_{cat}=0.1$ . Η βέλτιστη μετατροπή γαλακτικού οξέος, που επιτεύχθηκαν κατά τη χημική αντίδραση ήταν 59.85% στα 255min με χρήση γαλακτικού οξέος

80%. Εξετάστηκε επιπλέον η αντικατάσταση της εμπορικής, πετρελαϊκής προέλευσης, αιθανόλης με βιοαιθανόλη 90% (που παρήχθη στις βέλτιστες συνθήκες). Στην περίπτωση αυτή επιτεύχθηκε μετατροπή γαλακτικού οξέος ίση με 54.01% στα 270min.

Συμπερασματικά, στα πλαίσια της παρούσας διπλωματικής αποδείχθηκε ότι είναι τεχνικά εφικτή η μετατροπή οργανικών βιομηχανικών αποβλήτων σε προϊόντα προστιθέμενης αξίας όπως βιοαιθανόλη, γαλακτικό οξύ και γαλακτικός αιθυλεστέρας. Περαιτέρω βελτιστοποίηση των διεργασιών και απομόνωση των προϊόντων λαμβάνοντας τεχνοοικονομικούς παράγοντες είναι απαραίτητη.

## ABSTRACT

The industrial waste production, which comes either from the various industrial processes or from products that cease to be usable due to failure, wear and tear or obsolescence, is exponential nowadays, due to the increased needs of citizens. It is therefore imperative to adopt a new view of things that includes the development of proper environmental management and their exploitation for energy recovery. Therefore, the aim of this thesis was to investigate the production of bioethanol and lactic acid from industrial waste and the optimization of these processes. The factors tested were the solid loading, type and loadings of enzyme (amylase-Spirizyme EXCEL and lactase-Lactozyme pure), type of microorganisms (for ethanol experiments *Saccharomyces cerevisiae* and for lactic acid experiments *Saccharomyces cerevisiae*, commercial coagulant enzyme complex, *Lactobacillus* & *Streptococcus* mixture, *Lactobacillus* mixture and free mixed culture of *Lactobacillus* and yeast). The production of ethyl lactate was then investigated through a two-way reaction of ethanol and lactic acid solutions.

The raw material used for the above processes was waste from the baby food industry of the JOTIS. This waste was physico-chemically characterised using standard methods. Its composition was the following: starch  $31.00 \pm 1.34$  % w/w, lactose  $31 \pm 3.20$  % w/w, lactic acid  $2.00 \pm 0.09$  % w/w and free glucose  $7.54 \pm 0.84$  % w/w.

Regarding bioethanol production by simultaneous saccharification and fermentation (SSF), the effect of *Saccharomyces cerevisiae* concentration (2%, 3% w/w of dry weight) and enzyme loading (amylase - 40, 60  $\mu$ L/g starch, amylase and lactase - 8mg/g lactose) at 35°C was investigated. The solid loadings studied were 15, 20, 25, 25, 30, 35, 40% w/w with fermentation durations of 24 and 48 hours. The experiment with 35% w/w solid loading using just amylase presented the highest ethanol concentration of  $103.50 \pm 3.24$  g/L and an ethanol yield of  $89.42 \pm 2.76$ %. When both amylase and lactase were added, the optimal concentration achieved  $61.25 \pm 1.77$  g/L with an ethanol yield of those for  $82.12 \pm 2.28$ % with 20% w/w solid loading. Then, an upscaling of the optimal conditions was performed in a 4L reactor, where an optimal ethanol concentration of 90g/L was achieved at 45.5h and an ethanol yield of 77.98%.

Regarding the production of lactic acid, different microorganisms and different enzymes (amylase - 40  $\mu$ L/g starch, lactase 5mg/g lactose) with 10% w/w solid loading and a temperature of 40°C, were investigated. The experiments with the mixed culture, showed the highest lactic acid concentration equal to 42.35 g/L at 216 h (9d) with the addition of both enzymes. Subsequently, repeated fermentations with the mixed culture were considered as a means to further increase the concentration. The optimum concentration was observed in the experiment where both enzymes were added and was equal to 39.83 g/L at 72h (3d), similar to the concentration achieved by simple fermentation at 216h (9d).

Finally, reactions for the production of ethyl lactate were carried out with an ethanol/lactic acid molar ratio of 3/1 and the addition of Amberlyst 15 catalyst at a weight fraction  $w_{\text{cat}} = 0.1$ . The optimum lactic acid conversion achieved during the chemical reaction was 59.85% at 255 min using 80% lactic acid. The replacement of commercial, petroleum-based ethanol with 90% bioethanol (produced under optimal conditions) was also considered. In this case, a lactic acid conversion of 54.01% was achieved at 270 min.

In conclusion, in the context of this thesis it was demonstrated that it is technically feasible to convert organic industrial wastes into value-added products such as bioethanol, lactic acid and ethyl lactate. Further optimisation of processes and isolation of products taking into account techno-economic factors is necessary.

## ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ

ΠΡΟΛΟΓΟΣ .....	2
ΠΕΡΙΛΗΨΗ .....	4
ΑΒSTRACT .....	6
ΕΥΡΕΤΗΡΙΟ ΠΙΝΑΚΩΝ .....	11
ΘΕΩΡΗΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ .....	19
1 ΝΟΜΟΘΕΤΙΚΟ ΠΛΑΙΣΙΟ .....	19
1.1 ΕΙΣΑΓΩΓΗ .....	19
1.2 ΝΟΜΟΘΕΤΙΚΟ ΠΛΑΙΣΙΟ ΓΙΑ ΤΑ ΒΙΟΚΑΥΣΙΜΑ .....	20
1.3 ΝΟΜΟΘΕΣΙΑ ΓΙΑ ΣΤΕΡΕΑ ΑΠΟΒΛΗΤΑ .....	22
1.4 ΕΛΛΗΝΙΚΟ ΔΙΚΑΙΟ .....	23
1.5 ΝΟΜΟΘΕΣΙΑ ΓΙΑ ΠΡΑΣΙΝΟΥΣ ΔΙΑΛΥΤΕΣ .....	24
1.5.1 ΕΙΣΑΓΩΓΗ .....	24
1.5.2 ΑΡΧΕΣ ΤΗΣ ΠΡΑΣΙΝΗΣ ΧΗΜΕΙΑΣ .....	24
2 ΒΙΟΜΗΧΑΝΙΚΑ ΑΠΟΒΛΗΤΑ .....	26
2.1 ΕΙΣΑΓΩΓΗ .....	26
2.2 ΚΑΤΗΓΟΡΙΕΣ ΑΠΟΒΛΗΤΩΝ .....	26
2.3 ΔΙΑΧΕΙΡΙΣΗ ΒΙΟΜΗΧΑΝΙΚΩΝ ΑΠΟΒΛΗΤΩΝ .....	27
2.3.1 ΠΑΡΑΓΩΓΗ ΒΙΟΜΗΧΑΝΙΚΩΝ ΑΠΟΡΡΙΜΜΑΤΩΝ .....	27
2.3.2 ΣΥΣΣΩΡΕΥΣΗ ΚΑΙ ΑΠΟΘΗΚΕΥΣΗ ΒΙΟΜΗΧΑΝΙΚΩΝ ΑΠΟΡΡΙΜΜΑΤΩΝ .....	28
2.3.3 ΜΕΤΑΦΟΡΑ ΒΙΟΜΗΧΑΝΙΚΩΝ ΑΠΟΡΡΙΜΜΑΤΩΝ .....	28
2.3.4 ΕΠΕΞΕΡΓΑΣΙΑ ΚΑΙ ΤΕΛΙΚΗ ΔΙΑΘΕΣΗ .....	28
2.4 ΣΤΟΧΟΙ ΚΑΙ ΣΤΡΑΤΗΓΙΚΕΣ ΤΗΣ ΕΥΡΩΠΑΪΚΗΣ ΈΝΩΣΗΣ ΣΤΟΝ ΤΟΜΕΑ ΑΠΟΒΛΗΤΩΝ .....	28
3 ΒΙΟΚΑΥΣΙΜΑ .....	30
3.1 ΕΙΣΑΓΩΓΗ .....	30
3.2 ΚΑΤΗΓΟΡΙΕΣ ΒΙΟΚΑΥΣΙΜΩΝ .....	31
3.2.1 ΒΙΟΚΑΥΣΙΜΑ 1ΗΣ ΓΕΝΙΑΣ .....	32
3.2.2 ΒΙΟΚΑΥΣΙΜΑ 2ΗΣ ΓΕΝΙΑΣ .....	33
3.2.3 ΒΙΟΚΑΥΣΙΜΑ 3ΗΣ ΓΕΝΙΑΣ .....	33
3.2.4 ΒΙΟΚΑΥΣΙΜΑ 4ΗΣ ΓΕΝΙΑΣ .....	33
3.3 ΠΡΩΤΕΣ ΥΛΕΣ ΓΙΑ ΤΗΝ ΠΑΡΑΓΩΓΗ ΒΙΟΚΑΥΣΙΜΩΝ .....	33
4 ΒΙΟΑΙΘΑΝΟΛΗ .....	35



4.1	ΕΙΣΑΓΩΓΗ .....	35
4.2	ΙΔΙΟΤΗΤΕΣ ΒΙΟΑΙΘΑΝΟΛΗΣ.....	36
4.3	ΧΡΗΣΕΙΣ ΑΙΘΑΝΟΛΗΣ .....	37
4.4	ΒΙΟΑΙΘΑΝΟΛΗ ΩΣ ΚΑΥΣΙΜΟ .....	39
4.5	ΠΡΩΤΕΣ ΥΛΕΣ ΓΙΑ ΤΗΝ ΠΑΡΑΓΩΓΗ ΒΙΟΑΙΘΑΝΟΛΗΣ .....	40
4.5.1	ΣΑΚΧΑΡΟΥΧΕΣ ΠΗΓΕΣ .....	41
4.5.2	ΑΜΥΛΟΥΧΕΣ ΠΗΓΕΣ .....	42
4.5.3	ΛΙΓΝΟΚΥΤΤΑΡΙΝΙΚΕΣ ΠΗΓΕΣ .....	42
4.6	ΠΑΡΑΓΩΓΗ ΑΙΘΑΝΟΛΗΣ.....	43
4.6.1	ΠΑΡΑΓΩΓΗ ΑΙΘΑΝΟΛΗΣ ΑΠΟ ΣΑΚΧΑΡΟΥΧΕΣ ΠΗΓΕΣ .....	44
4.6.2	ΠΑΡΑΓΩΓΗ ΑΙΘΑΝΟΛΗΣ ΑΠΟ ΑΜΥΛΟΥΧΕΣ ΠΗΓΕΣ.....	44
4.6.3	ΠΑΡΑΓΩΓΗ ΑΙΘΑΝΟΛΗΣ ΑΠΟ ΛΙΓΝΟΚΥΤΤΑΡΙΝΙΚΕΣ ΠΗΓΕΣ .....	45
5	ΓΑΛΑΚΤΙΚΟ ΟΞΥ .....	46
5.1	ΕΙΣΑΓΩΓΗ .....	46
5.2	ΕΦΑΡΜΟΓΕΣ ΓΑΛΑΚΤΙΚΟΥ ΟΞΕΟΣ ΚΑΙ ΠΟΛΥΜΕΡΩΝ ΤΟΥ.....	46
5.3	ΦΥΣΙΚΟΧΗΜΙΚΕΣ ΙΔΙΟΤΗΤΕΣ ΓΑΛΑΚΤΙΚΟΥ ΟΞΕΟΣ .....	47
5.4	ΠΑΡΑΓΩΓΗ ΓΑΛΑΚΤΙΚΟΥ ΟΞΕΟΣ .....	47
5.4.1	ΠΑΡΑΓΩΓΗ ΓΑΛΑΚΤΙΚΟΥ ΟΞΕΟΣ ΜΕΣΩ ΧΗΜΙΚΗΣ ΣΥΝΘΕΣΗΣ .....	48
5.4.2	ΠΑΡΑΓΩΓΗ ΓΑΛΑΚΤΙΚΟΥ ΟΞΕΟΣ ΜΕΣΩ ΖΥΜΩΣΗΣ.....	48
5.4.3	ΆΜΕΣΗ ΖΥΜΩΣΗ ΑΠΟ ΜΥΚΗΤΕΣ .....	51
5.4.4	ΕΠΑΝΑΛΑΜΒΑΝΟΜΕΝΗ ΖΥΜΩΣΗ .....	51
5.5	ΚΑΘΑΡΙΣΜΟΣ ΓΑΛΑΚΤΙΚΟΥ ΟΞΕΟΣ .....	51
6	ΓΑΛΑΚΤΙΚΟΣ ΑΙΘΥΛΕΣΤΕΡΑΣ .....	53
6.1	ΕΙΣΑΓΩΓΗ .....	53
6.2	ΙΔΙΟΤΗΤΕΣ ΚΑΙ ΕΦΑΡΜΟΓΕΣ ΤΟΥ ΓΑΛΑΚΤΙΚΟΥ ΑΙΘΥΛΕΣΤΕΡΑ.....	54
6.3	ΤΡΟΠΟΣ ΠΑΡΑΓΩΓΗΣ ΤΟΥ ΓΑΛΑΚΤΙΚΟΥ ΑΙΘΥΛΕΣΤΕΡΑ.....	57
6.3.1	ΠΕΙΡΑΜΑΤΑ ΣΕ BATCH ΑΝΤΙΔΡΑΣΤΗΡΑ.....	58
6.3.2	ΔΡΑΣΤΙΚΗ ΑΠΟΣΤΑΞΗ ΣΕ ΗΜΙΔΙΑΛΕΙΠΟΝΤΟΣ ΕΡΓΟΥ ΑΝΤΙΔΡΑΣΤΗΡΕΣ.....	58
	ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ .....	60
7	ΣΚΟΠΟΣ .....	60
8	ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΗ ΜΕΘΟΔΟΛΟΓΙΑ .....	61
8.1	ΠΡΩΤΗ ΥΛΗ.....	61
8.2	ΜΕΘΟΔΟΙ ΑΝΑΛΥΣΗΣ .....	61
8.2.1	ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟΣ ΟΛΙΚΩΝ ΣΤΕΡΕΩΝ (TS) .....	61

8.2.2	ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟΣ ΠΗΤΤΙΚΩΝ ΣΤΕΡΕΩΝ (VS) .....	62
8.2.3	ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟΣ ΥΔΑΤΟΔΙΑΛΥΤΩΝ ΣΤΕΡΕΩΝ (WS – WATER SOLUBLE SOLIDS).....	63
8.2.4	ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟΣ ΕΛΕΥΘΕΡΗΣ ΓΛΥΚΟΖΗΣ (FREE SUGARS).....	64
8.2.5	ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟΣ ΟΛΙΚΟΥ ΑΜΥΛΟΥ (STARCH) .....	66
8.2.6	ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟΣ ΑΙΘΑΝΟΛΗΣ .....	67
8.3	ΑΠΟΔΟΣΕΙΣ .....	67
9	ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΟ ΠΡΩΤΟΚΟΛΛΟ .....	69
9.1	ΠΑΡΑΓΩΓΗ ΑΙΘΑΝΟΛΗΣ .....	69
9.1.1	ΠΑΡΑΓΩΓΗ ΑΙΘΑΝΟΛΗΣ ΜΕ ΧΡΗΣΗ ΑΜΥΛΑΣΗΣ .....	69
9.1.2	ΠΑΡΑΓΩΓΗ ΑΙΘΑΝΟΛΗΣ ΜΕ ΣΥΝΕΡΓΑΤΙΚΗ ΔΡΑΣΗ ΑΜΥΛΑΣΗΣ ΚΑΙ ΛΑΚΤΑΣΗΣ .....	71
9.2	ΠΑΡΑΓΩΓΗ ΓΑΛΑΚΤΙΚΟΥ ΟΞΕΟΣ .....	72
9.2.1	ΕΠΙΔΡΑΣΗ ΤΟΥ ΕΙΔΟΥΣ ΤΩΝ ΜΙΚΡΟΟΡΓΑΝΙΣΜΩΝ .....	72
9.2.2	ΕΠΙΔΡΑΣΗ ΤΟΥ ΧΡΟΝΟΥ ΚΑΙ ΤΗΣ ΠΡΟΣΘΗΚΗΣ ΕΝΖΥΜΩΝ .....	73
9.2.3	ΔΟΚΙΜΕΣ ΕΠΑΝΑΛΑΜΒΑΝΟΜΕΝΩΝ ΖΥΜΩΣΕΩΝ (REPEATED FERMENTATION) .....	74
9.3	ΠΑΡΑΓΩΓΗ ΓΑΛΑΚΤΙΚΟΥ ΑΙΘΥΛΕΣΤΕΡΑ .....	75
9.3.1	ΠΑΡΑΓΩΓΗ ΓΑΛΑΚΤΙΚΟΥ ΑΙΘΥΛΕΣΤΕΡΑ ΜΕ ΧΗΜΙΚΗ ΑΙΘΑΝΟΛΗ ΚΑΙ ΓΑΛΑΚΤΙΚΟ ΟΞΥ .....	77
9.3.2	ΠΑΡΑΓΩΓΗ ΓΑΛΑΚΤΙΚΟΥ ΑΙΘΥΛΕΣΤΕΡΑ ΜΕ ΒΙΟΑΙΘΑΝΟΛΗ ΚΑΙ ΓΑΛΑΚΤΙΚΟ ΟΞΥ .....	78
10	ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΑ ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ .....	79
10.1	ΧΑΡΑΚΤΗΡΙΣΜΟΣ ΠΡΩΤΗΣ ΥΛΗΣ .....	79
10.2	ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ ΠΕΙΡΑΜΑΤΩΝ ΠΑΡΑΓΩΓΗΣ ΑΙΘΑΝΟΛΗΣ .....	80
10.2.1	ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ ΜΕ ΧΡΗΣΗ ΑΜΥΛΑΣΗΣ.....	80
10.2.2	ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ ΜΕ ΣΥΝΕΡΓΑΤΙΚΗ ΔΡΑΣΗ ΑΜΥΛΑΣΗΣ ΚΑΙ ΛΑΚΤΑΣΗΣ .....	85
10.3	ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ ΠΑΡΑΓΩΓΗΣ ΓΑΛΑΚΤΙΚΟΥ ΟΞΕΟΣ.....	88
10.3.1	ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ ΕΠΙΔΡΑΣΗΣ ΕΙΔΟΥΣ ΜΙΚΡΟΟΡΓΑΝΙΣΜΩΝ .....	88
10.3.2	ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ ΕΠΙΔΡΑΣΗΣ ΤΟΥ ΧΡΟΝΟΥ ΚΑΙ ΤΗΣ ΠΡΟΣΘΗΚΗΣ ΕΝΖΥΜΩΝ .....	96
10.3.3	ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ ΕΠΑΝΑΛΑΜΒΑΝΟΜΕΝΩΝ ΖΥΜΩΣΕΩΝ.....	99
10.4	ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ ΠΑΡΑΓΩΓΗΣ ΓΑΛΑΚΤΙΚΟΥ ΑΙΘΥΛΕΣΤΕΡΑ .....	107
10.4.1	ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ ΜΕ ΧΗΜΙΚΗ ΑΙΘΑΝΟΛΗ ΚΑΙ ΓΑΛΑΚΤΙΚΟ ΟΞΥ .....	107
10.4.2	ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ ΜΕ ΒΙΟΑΙΘΑΝΟΛΗ ΚΑΙ ΓΑΛΑΚΤΙΚΟ ΟΞΥ .....	111
11	ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ.....	114
11.1	ΠΕΙΡΑΜΑΤΑ ΠΑΡΑΓΩΓΗΣ ΑΙΘΑΝΟΛΗΣ.....	114
11.2	ΠΕΙΡΑΜΑΤΑ ΠΑΡΑΓΩΓΗΣ ΓΑΛΑΚΤΙΚΟΥ ΟΞΕΟΣ.....	114
11.3	ΠΕΙΡΑΜΑΤΑ ΠΑΡΑΓΩΓΗΣ ΓΑΛΑΚΤΙΚΟΥ ΑΙΘΥΛΕΣΤΕΡΑ.....	115
12	ΜΕΛΛΟΝΤΙΚΕΣ ΠΡΟΤΑΣΕΙΣ .....	115

ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ ..... 116

## ΕΥΡΕΤΗΡΙΟ ΠΙΝΑΚΩΝ

Πίνακας 1: Προηγμένες πηγές βιοκαυσίμων, Μέρος Α και Μέρος Β στην RED II. ....	21
Πίνακας 2: Προηγμένες πηγές βιοκαυσίμων, Μέρος Α και Μέρος Β στην RED II, εντολές και ανώτατο όριο. ....	21
Πίνακας 3: Όρια εξοικονόμησης αερίων θερμοκηπίου στην RED II. ....	21
Πίνακας 4: Όρια Βαρέων Μετάλλων στα βιοαπόβλητα. ....	22
Πίνακας 5: Διαλυτικές ικανότητες του ethyl lactate και του πετροχημικού N-methyl pyrrolidone. ....	55
Πίνακας 6: Ιδιότητες γαλακτικού αιθυλεστέρα σε διάφορες θερμοκρασίες. ....	55
Πίνακας 7: Ιδιότητες γαλακτικού αιθυλεστέρα. ....	56
Πίνακας 8: Συνθήκες πειραμάτων παραγωγής αιθανόλης σε SSF για 24 ώρες με αυξανόμενο φορτίο (1 <sup>η</sup> δοκιμή). ....	69
Πίνακας 9: Συνθήκες πειραμάτων παραγωγής αιθανόλης σε SSF για 48 ώρες με 30, 35 και 40% w/w φορτίο στερεού (2 <sup>η</sup> δοκιμή). ....	70
Πίνακας 10: Συνθήκες πειραμάτων παραγωγής αιθανόλης σε SSF για 48 ώρες με αύξηση ποσότητας ενζύμου και μαγιάς με 35 και 40% w/w φορτίο στερεού (3 <sup>η</sup> δοκιμή). ....	70
Πίνακας 11: Συνθήκες πειράματος παραγωγής αιθανόλης σε 4L αντιδραστήρα. ....	71
Πίνακας 12: Συνθήκες πειραμάτων υδρόλυσης σε διάφορες συγκεντρώσεις λακτάσης (1 <sup>η</sup> δοκιμή). ....	71
Πίνακας 13: Συνθήκες πειραμάτων παραγωγής αιθανόλης σε SSF με λακτάση και αμυλάση με 20% w/w φορτίο στερεού (2 <sup>η</sup> Δοκιμή). ....	71
Πίνακας 14: Συνθήκες πειραμάτων παραγωγής αιθανόλης σε SSF με λακτάση και αμυλάση με 35% w/w φορτίο στερεού (3 <sup>η</sup> Δοκιμή). ....	72
Πίνακας 15: Ποσότητες αντιδραστηρίων για την αντίδραση παραγωγής γαλακτικού αιθυλεστέρα, με μοριακή αναλογία αιθανόλης (99.9%)/γαλακτικού οξέος (80%) 3/1 και καταλύτη σε κλάσμα βάρους $w_{cat}=0.1$ (Δοκιμή 1,2). ....	77
Πίνακας 16: Ποσότητες αντιδραστηρίων για την αντίδραση παραγωγής γαλακτικού αιθυλεστέρα, με μοριακή αναλογία αιθανόλης (99.9%)/γαλακτικού οξέος (88%) 3/1 και καταλύτη με κλάσμα βάρους $w_{cat}=0.1$ (Δοκιμή 3). ....	77
Πίνακας 17: Ποσότητες αντιδραστηρίων για την αντίδραση παραγωγής γαλακτικού αιθυλεστέρα, με μοριακή αναλογία αιθανόλης (99.9%)/γαλακτικού οξέος (88%) 3/1, χωρίς προσθήκη καταλύτη (Δοκιμή 4). ....	77

Πίνακας 18: Ποσότητες αντιδραστηρίων για την αντίδραση παραγωγής γαλακτικού αιθυλεστέρα, με μοριακή αναλογία αιθανόλης (99.9%)/γαλακτικού οξέος (80%) 1/1 και καταλύτη με κλάσμα βάρους $w_{cat}=0.1$ (Δοκιμή 5). .....	77
Πίνακας 19: Ποσότητες αντιδραστηρίων για την αντίδραση παραγωγής γαλακτικού αιθυλεστέρα, με μοριακή αναλογία βιοαιθανόλης (89%)/γαλακτικού οξέος (88%) 3/1 και καταλύτη με κλάσμα βάρους $w_{cat}=0.1$ (Δοκιμή 6). .....	78
Πίνακας 20: Ποσότητες αντιδραστηρίων για την αντίδραση παραγωγής γαλακτικού αιθυλεστέρα, με μοριακή αναλογία βιοαιθανόλης (93%)/γαλακτικού οξέος (88%) 3/1 και καταλύτη με κλάσμα βάρους $w_{cat}=0.1$ (Δοκιμή 7). .....	78
Πίνακας 21: Αναγραφόμενες περιεκτικότητες αποβλήτου βιομηχανίας παραγωγής βρεφικών τροφών. ....	79
Πίνακας 22: Χαρακτηρισμός αποβλήτου βιομηχανίας παραγωγής βρεφικών τροφών. ....	79
Πίνακας 23: Αποτελέσματα πειραμάτων παραγωγής αιθανόλης σε SSF μετά από 24 ώρες με αυξανόμενο φορτίο (1 <sup>η</sup> δοκιμή).....	80
Πίνακας 24: Αποτελέσματα πειραμάτων παραγωγής αιθανόλης σε SSF μετά από 48 ώρες με 30, 35 και 40% w/w φορτίο στερεού (2 <sup>η</sup> δοκιμή). .....	81
Πίνακας 25: Αποτελέσματα πειραμάτων παραγωγής αιθανόλης σε SSF μετά από 48 ώρες με αύξηση ποσότητας ενζύμου και μαγιάς με 35 και 40% w/w φορτίο στερεού (3 <sup>η</sup> δοκιμή)...	82
Πίνακας 26: Αποτελέσματα αποδομήσεων στερεού και αμύλου για φορτίο στερεού: 20, 30 και 35% w/w .....	84
Πίνακας 27: Συγκεντρώσεις γλυκόζης και αιθανόλης σε σχέση με τον χρόνο του πειράματος στον 4L αντιδραστήρα.....	84
Πίνακας 28: Αποτελέσματα 1 <sup>ης</sup> Δοκιμής με λακτάση.....	85
Πίνακας 29: Αποτελέσματα πειραμάτων παραγωγής αιθανόλης σε SSF με λακτάση και αμυλάση με 20% w/w φορτίο στερεού (2 <sup>η</sup> Δοκιμή). ....	86
Πίνακας 30: Αποτελέσματα πειραμάτων παραγωγής αιθανόλης σε SSF με λακτάση και αμυλάση με 35% w/w φορτίο στερεού (3 <sup>η</sup> Δοκιμή). ....	87
Πίνακας 31: Αποτελέσματα παραγωγής γαλακτικού οξέος με εμπορικό σύμπλεγμα πηκτικών ενζύμων και αμυλάση (Δοκιμή 1). ....	88
Πίνακας 32: Αποτελέσματα παραγωγής γαλακτικού οξέος με εμπορικό σύμπλεγμα πηκτικών ενζύμων και λακτάση (Δοκιμή 1). ....	88
Πίνακας 33: Αποτελέσματα παραγωγής γαλακτικού οξέος με εμπορικό σύμπλεγμα πηκτικών ενζύμων, αμυλάση και λακτάση (Δοκιμή 1). ....	88

Πίνακας 34: Αποτελέσματα παραγωγής γαλακτικού οξέος με Lactobacillus & Streptococcus και αμυλάση (Δοκιμή 1). .....	89
Πίνακας 35: Αποτελέσματα παραγωγής γαλακτικού οξέος με Lactobacillus & Streptococcus και λακτάση (Δοκιμή 1). .....	89
Πίνακας 36: Αποτελέσματα παραγωγής γαλακτικού οξέος με Lactobacillus&Streptococcus, αμυλάση και λακτάση (Δοκιμή 1). .....	89
Πίνακας 37: Αποτελέσματα παραγωγής γαλακτικού οξέος με μείγμα Lactobacillus και αμυλάση (Δοκιμή 1). .....	89
Πίνακας 38: Αποτελέσματα παραγωγής γαλακτικού οξέος με μείγμα Lactobacillus και λακτάση (Δοκιμή 1). .....	89
Πίνακας 39: Αποτελέσματα παραγωγής γαλακτικού οξέος με μείγμα Lactobacillus, αμυλάση και λακτάση (Δοκιμή 1). .....	90
Πίνακας 40: Αποτελέσματα παραγωγής γαλακτικού οξέος με μεικτή καλλιέργεια και αμυλάση (Δοκιμή 1). .....	90
Πίνακας 41: Αποτελέσματα παραγωγής γαλακτικού οξέος με μεικτή καλλιέργεια και λακτάση (Δοκιμή 1). .....	90
Πίνακας 42: Αποτελέσματα παραγωγής γαλακτικού οξέος με μεικτή καλλιέργεια, αμυλάση και λακτάση (Δοκιμή 1). .....	90
Πίνακας 43: Παραγωγικότητα γαλακτικού οξέος με μείγμα Lactobacillus και μεικτή καλλιέργεια με αμυλάση (Δοκιμή 1). .....	94
Πίνακας 44: Παραγωγικότητα γαλακτικού οξέος με μείγμα Lactobacillus και μεικτή καλλιέργεια με λακτάση (Δοκιμή 1). .....	95
Πίνακας 45: Παραγωγικότητα γαλακτικού οξέος με μείγμα Lactobacillus και μεικτή καλλιέργεια με αμυλάση και λακτάση (Δοκιμή 1). .....	95
Πίνακας 46: Απόδοση γαλακτικού οξέος και παραγωγικότητα από τη μελέτη της επίδρασης των μικροοργανισμών για την παραγωγή γαλακτικού οξέος (Δοκιμή 1). .....	96
Πίνακας 47: Παραγωγή γαλακτικού οξέος με χρήση μεικτής καλλιέργειας για ζύμωση διάρκειας 9 ημερών χωρίς προσθήκη ενζύμων (Δοκιμή 2). .....	97
Πίνακας 48: Παραγωγής γαλακτικού οξέος με χρήση μεικτής καλλιέργειας για ζύμωση διάρκειας 9 ημερών με προσθήκη λακτάσης (Δοκιμή 2). .....	97
Πίνακας 49: Παραγωγή γαλακτικού οξέος με χρήση μεικτής καλλιέργειας για ζύμωση διάρκειας 9 ημερών με προσθήκη αμυλάσης και λακτάσης (Δοκιμή 2). .....	97
Πίνακας 50: Παραγωγικότητα γαλακτικού οξέος με χρήση μεικτής καλλιέργειας για ζύμωση διάρκειας 9 ημερών (Δοκιμή 2). .....	98

Πίνακας 51: Απόδοσης γαλακτικού οξέος και παραγωγικότητα με χρήση μεικτής καλλιέργειας προς παραγωγή γαλακτικού οξέος για 9 μέρες (Δοκιμή 2).....	99
Πίνακας 52: 1 <sup>ης</sup> επαναλαμβανόμενη ζύμωση για παραγωγή γαλακτικού οξέος με προσθήκη ομοιογενούς μείγματος της δοκιμής 2 χωρίς προσθήκη ενζύμων (Δοκιμή 3). .....	99
Πίνακας 53: 1 <sup>ης</sup> επαναλαμβανόμενη ζύμωση για παραγωγή γαλακτικού οξέος με προσθήκη ομοιογενούς μείγματος της δοκιμής 2, αμυλάσης και λακτάσης (Δοκιμή 3).....	100
Πίνακας 54: Παραγωγικότητα γαλακτικού οξέος με προσθήκη ομοιογενούς μείγματος της δοκιμής 2 (1 <sup>η</sup> Δοκιμή Επαναλαμβανόμενης Ζύμωσης). .....	100
Πίνακας 55: Απόδοση γαλακτικού οξέος και παραγωγικότητα με προσθήκη ομοιογενούς μείγματος της δοκιμής 2 (1 <sup>η</sup> Δοκιμή Επαναλαμβανόμενης Ζύμωσης).....	101
Πίνακας 56: 2 <sup>η</sup> επαναλαμβανόμενη ζύμωση για παραγωγή γαλακτικού οξέος με προσθήκη στερεού δείγματος της δοκιμής 3, αμυλάσης και λακτάσης (Δοκιμή 4).....	102
Πίνακας 57: 2 <sup>η</sup> επαναλαμβανόμενη ζύμωση για παραγωγή γαλακτικού οξέος με προσθήκη στερεού δείγματος της δοκιμής 3, αμυλάσης και λακτάσης (Δοκιμή 4).....	102
Πίνακας 58: Παραγωγικότητα γαλακτικού οξέος με προσθήκη στερεού και υγρού δείγματος της δοκιμής 3, αμυλάσης και λακτάσης (2 <sup>η</sup> Δοκιμή Επαναλαμβανόμενης Ζύμωσης).....	102
Πίνακας 59: Απόδοση γαλακτικού οξέος και παραγωγικότητα με προσθήκη στερεού και υγρού δείγματος της δοκιμής 4, αμυλάσης και λακτάσης (2 <sup>η</sup> Δοκιμή Επαναλαμβανόμενης Ζύμωσης). .....	104
Πίνακας 60: 3 <sup>η</sup> επαναλαμβανόμενη ζύμωση για παραγωγή γαλακτικού οξέος με προσθήκη στερεού δείγματος της δοκιμής 3 και αμυλάσης (Δοκιμή 5). .....	104
Πίνακας 61: 3 <sup>η</sup> επαναλαμβανόμενη ζύμωση για παραγωγή γαλακτικού οξέος με προσθήκη υγρού δείγματος της δοκιμής 3 και αμυλάσης (Δοκιμή 5).....	104
Πίνακας 62: Απόδοσης γαλακτικού οξέος και παραγωγικότητα με προσθήκη στερεού και υγρού δείγματος της δοκιμής 3 και αμυλάσης (3 <sup>η</sup> Δοκιμή Επαναλαμβανόμενης Ζύμωσης).105	
Πίνακας 63: Σπόδοσης γαλακτικού οξέος και παραγωγικότητα με προσθήκη στερεού και υγρού δείγματος της δοκιμής 3 και αμυλάσης (3 <sup>η</sup> Δοκιμή Επαναλαμβανόμενης Ζύμωσης).106	
Πίνακας 64: Συγκέντρωση γαλακτικού οξέος και μετατροπή του κατά την αντίδραση παραγωγής γαλακτικού αιθυλεστέρα, με μοριακή αναλογία αιθανόλης (99.9%)/γαλακτικού οξέος (80%) 3/1 και καταλύτη σε κλάσμα βάρους $w_{cat}=0.1$ (Δοκιμή 1). .....	107
Πίνακας 65: Συγκέντρωση γαλακτικού οξέος και μετατροπή του κατά την αντίδραση παραγωγής γαλακτικού αιθυλεστέρα, με μοριακή αναλογία αιθανόλης (99.9%)/γαλακτικού οξέος (80%) 3/1 και καταλύτη σε κλάσμα βάρους $w_{cat}=0.1$ (Δοκιμή 2). .....	109

Πίνακας 66: Συγκέντρωση γαλακτικού οξέος και μετατροπή του κατά την αντίδραση παραγωγής γαλακτικού αιθυλεστέρα, με μοριακή αναλογία αιθανόλης (99.9%)/γαλακτικού οξέος (88%) 3/1 και καταλύτη με κλάσμα βάρους $w_{cat}=0.1$ (Δοκιμή 3). .....	109
Πίνακας 67: Συγκέντρωση γαλακτικού οξέος και μετατροπή του κατά την αντίδραση παραγωγής γαλακτικού αιθυλεστέρα, με μοριακή αναλογία αιθανόλης (99.9%)/γαλακτικού οξέος (88%) 3/1, χωρίς προσθήκη καταλύτη (Δοκιμή 4). .....	109
Πίνακας 68: Συγκέντρωση γαλακτικού οξέος και μετατροπή του κατά την αντίδραση παραγωγής γαλακτικού αιθυλεστέρα, με μοριακή αναλογία αιθανόλης (99.9%)/γαλακτικού οξέος (80%) 1/1 και καταλύτη με κλάσμα βάρους $w_{cat}=0.1$ (Δοκιμή 5). .....	110
Πίνακας 69: Συγκέντρωση γαλακτικού οξέος και μετατροπή του κατά την αντίδραση παραγωγής γαλακτικού αιθυλεστέρα, με μοριακή αναλογία βιοαιθανόλης (89%)/γαλακτικού οξέος (88%) 3/1 και καταλύτη με κλάσμα βάρους $w_{cat}=0.1$ (Δοκιμή 6). .....	112
Πίνακας 70: Συγκέντρωση γαλακτικού οξέος και μετατροπή του κατά την αντίδραση παραγωγής γαλακτικού αιθυλεστέρα, με μοριακή αναλογία βιοαιθανόλης (89%)/γαλακτικού οξέος (88%) 3/1 και καταλύτη με κλάσμα βάρους $w_{cat}=0.1$ (Δοκιμή 7). .....	112
Πίνακας 71: Συγκέντρωση γαλακτικού οξέος και μετατροπή του κατά την αντίδραση παραγωγής γαλακτικού αιθυλεστέρα, με μοριακή αναλογία βιοαιθανόλης (93%)/γαλακτικού οξέος (88%) 3/1 και καταλύτη με κλάσμα βάρους $w_{cat}=0.1$ (Δοκιμή 8). .....	112
Πίνακας 72: Συγκέντρωση γαλακτικού οξέος και μετατροπή του κατά την αντίδραση παραγωγής γαλακτικού αιθυλεστέρα, με μοριακή αναλογία βιοαιθανόλης (93%)/γαλακτικού οξέος (88%) 3/1 και καταλύτη με κλάσμα βάρους $w_{cat}=0.1$ (Δοκιμή 9). .....	113



## ΕΥΡΕΤΗΡΙΟ ΣΧΗΜΑΤΩΝ

Σχήμα 1: Ανανεώσιμες πηγές ενέργειας στις μεταφορές το 2018 [8].	23
Σχήμα 2: Κατανάλωση βιοκαυσίμων και ενσωμάτωση τους στην ενέργεια [8].	24
Σχήμα 3: Πυραμίδα ιεράρχησης 5 βαθμίδων για τα απόβλητα.	29
Σχήμα 4: Τα είδη Βιοκαυσίμων και οι γενιές τους.	32
Σχήμα 5: Συνοπτικό Διάγραμμα εφαρμογών αιθανόλης [42].	39
Σχήμα 6: Διάγραμμα Παραγωγής αιθανόλης.	44
Σχήμα 7: Διάγραμμα Παραγωγής Γαλακτικού οξέος.	48
Σχήμα 8: Μεταβολικές οδοί για την παραγωγή γαλακτικού οξέος από διάφορα σάκχαρα με γαλακτικά βακτήρια.	50
Σχήμα 9: Ο κύκλος ζωής του γαλακτικού αιθυλεστερά.	54
Σχήμα 10: Διάταξη παραγωγής γαλακτικού αιθυλεστερά.	59
Σχήμα 11: Φούρνος ξήρανσης Carbolite.	61
Σχήμα 12: Αφυγραντήρας.	62
Σχήμα 13: Φούρνος Barnstead Thermolyne.	62
Σχήμα 14: Ανακινούμενο αερόλουτρο IKA KS 30001 control.	63
Σχήμα 15: Φυγόκεντρος IEC CENTRA CL2.	64
Σχήμα 16: Φωτόμετρο Spectroquant Pharo 300 Merck.	65
Σχήμα 17: Διάταξη 4L αντιδραστήρα	70
Σχήμα 18: Συνθήκες πειραμάτων για την διερεύνηση μικροοργανισμών για την παραγωγή γαλακτικού οξέος (Δοκιμή 1)	73
Σχήμα 19: Συνθήκες πειραμάτων με χρήση μεικτής καλλιέργειας προς παραγωγή γαλακτικού οξέος για 9 μέρες.	74
Σχήμα 20: Συνθήκες πειραμάτων 1 <sup>ης</sup> επαναλαμβανόμενης ζύμωσης για παραγωγή γαλακτικού οξέος με προσθήκη ομοιογενούς μείγματος της δοκιμής 2 και με προσθήκη αμυλάσης και λακτάσης (Δοκιμή 3).	74
Σχήμα 21: Συνθήκες 2 <sup>ης</sup> επαναλαμβανόμενης ζύμωσης για παραγωγή γαλακτικού οξέος με προσθήκη είτε στερεού είτε ομοιογενούς μείγματος της δοκιμής 3 και με προσθήκη αμυλάσης και λακτάσης (Δοκιμή 4).	75
Σχήμα 22: Συνθήκες 3 <sup>ης</sup> επαναλαμβανόμενης ζύμωσης για την παραγωγή γαλακτικού οξέος με προσθήκη είτε στερεού είτε ομοιογενούς μείγματος της δοκιμής 3 και με προσθήκη αμυλάσης (Δοκιμή 5).	75
Σχήμα 23: Καταλύτης Amberlyst 15	76
Σχήμα 24: Διάταξη παραγωγής γαλακτικού αιθυλεστερά.	76

Σχήμα 25: Γράφημα παραγόμενης αιθανόλης (g/L) και απόδοσης αιθανόλης(%) μετά από 24h για 15, 20, 25, 30% w/w φορτίο στερεού με τις συνθήκες της 1 <sup>ης</sup> Δοκιμής (Πίνακας 8).	80
Σχήμα 26: Γράφημα παραγόμενης αιθανόλης (g/L) και απόδοσης αιθανόλης (%) μετά από 48h για 30, 35, 40% w/w φορτίο στερεού με τις συνθήκες της 2 <sup>ης</sup> Δοκιμής (Πίνακας 9). ....	81
Σχήμα 27: Γράφημα παραγόμενης αιθανόλης (g/L) και απόδοσης αιθανόλης(%) μετά από 48h για 35, 40 % φορτία με τις συνθήκες της 3 <sup>ης</sup> Δοκιμή (Πίνακας 10). ....	82
Σχήμα 28: Γράφημα παραγόμενης αιθανόλης (g/L) και απόδοσης αιθανόλης(%) μετά από 48h για 35% w/w φορτίο στερεού για τις συνθήκες i, ii.....	83
Σχήμα 29: Γράφημα παραγόμενης αιθανόλης (g/L) και απόδοσης αιθανόλης(%) μετά από 48h για 40% w/w φορτίο στερεού για τις συνθήκες i, ii.....	83
Σχήμα 30: Διάγραμμα μεταβολής συγκεντρώσεων γλυκόζης και αιθανόλης συναρτήσει του χρόνου. ....	85
Σχήμα 31: Γράφημα παραγόμενης αιθανόλης (g/L) και απόδοσης αιθανόλης(%) μετά από 48h με 20% w/w φορτίο στερεού, με παρουσία και απουσία λακτάσης. ....	86
Σχήμα 32: Γράφημα παραγόμενης αιθανόλης (g/L) και απόδοσης αιθανόλης(%) μετά από 48h με 35% w/w φορτίο στερεού, με παρουσία και απουσία λακτάσης. ....	87
Σχήμα 33: Επίδραση του είδους των μικροοργανισμών στη συγκέντρωση γαλακτικού οξέος συναρτήσει του χρόνου για την παραγωγή γαλακτικού οξέος με προσθήκη αμυλάσης (Δοκιμή 1). ....	91
Σχήμα 34: Επίδραση του είδους των μικροοργανισμών στη συγκέντρωση γαλακτικού οξέος συναρτήσει του χρόνου για την παραγωγή γαλακτικού οξέος με προσθήκη λακτάσης (Δοκιμή 1). ....	91
Σχήμα 35: Επίδραση του είδους των μικροοργανισμών στη συγκέντρωση γαλακτικού οξέος συναρτήσει του χρόνου για την παραγωγή γαλακτικού οξέος με προσθήκη αμυλάσης και λακτάσης (Δοκιμή 1). ....	92
Σχήμα 36: Επίδραση ενζύμων στην συγκέντρωση γαλακτικού οξέος με εμπορικό σύμπλεγμα πηκτικών ενζύμων (Δοκιμή 1). ....	92
Σχήμα 37: Επίδραση ενζύμων στη συγκέντρωση γαλακτικού οξέος για τα πειράματα με Lactobacillus & Streptococcus (Δοκιμή 1). ....	93
Σχήμα 38: Επίδραση ενζύμων στη συγκέντρωση γαλακτικού οξέος με μείγμα Lactobacillus (Δοκιμή 1). ....	93
Σχήμα 39: Επίδραση ενζύμων στη συγκέντρωση γαλακτικού οξέος για τα πειράματα με μεικτή καλλιέργεια (Δοκιμή 1). ....	94

Σχήμα 40: Συγκέντρωση γαλακτικού οξέος συναρτήσει του χρόνου με χρήση μεικτής καλλιέργειας προς παραγωγή γαλακτικού οξέος για 9 μέρες (Δοκιμή 2).....	98
Σχήμα 41: Συγκέντρωση γαλακτικού οξέος συναρτήσει του χρόνου με προσθήκη ομοιογενούς μείγματος της δοκιμής 2 (1 <sup>η</sup> Δοκιμή Επαναλαμβανόμενης Ζύμωσης).....	101
Σχήμα 42: Συγκέντρωση γαλακτικού οξέος συναρτήσει του χρόνου με προσθήκη στερεού και υγρού δείγματος της δοκιμής 3, αμυλάσης και λακτάσης (2 <sup>η</sup> Δοκιμή Επαναλαμβανόμενης Ζύμωση).....	103
Σχήμα 43: Συγκέντρωσης γαλακτικού οξέος συναρτήσει του χρόνου με προσθήκη στερεού και υγρού δείγματος της δοκιμής 3 και αμυλάσης (3 <sup>η</sup> Δοκιμή Επαναλαμβανόμενης Ζύμωση).....	105
Σχήμα 44: Χρωματογράφημα HPLC για την αντίδραση παραγωγής γαλακτικού αιθυλεστέρα, με μοριακή αναλογία αιθανόλης (99.9%)/γαλακτικού οξέος (80%) 3/1 και καταλύτη με $w_{cat}=0.1$ (Δοκιμή 1) στα 30 και 60min. ....	107
Σχήμα 45: Χρωματογράφημα HPLC για την αντίδραση παραγωγής γαλακτικού αιθυλεστέρα, με μοριακή αναλογία αιθανόλης (99.9%)/γαλακτικού οξέος (80%) 3/1 και καταλύτη με $w_{cat}=0.1$ (Δοκιμή 1) στα 135 και 195min. ....	108
Σχήμα 46: Χρωματογράφημα HPLC για την αντίδραση παραγωγής γαλακτικού αιθυλεστέρα, με μοριακή αναλογία αιθανόλης (99.9%)/γαλακτικού οξέος (80%) 3/1 και καταλύτη με $w_{cat}=0.1$ (Δοκιμή 1) στα 255min. ....	108
Σχήμα 47: Χρωματογράφημα HPLC για την αντίδραση παραγωγής γαλακτικού αιθυλεστέρα, με μοριακή αναλογία αιθανόλης (99.9%)/γαλακτικού οξέος (88%) 1/1 και καταλύτη με $w_{cat}=0.1$ (Δοκιμή 5) στα 0min. ....	110
Σχήμα 48: Χρωματογράφημα HPLC για την αντίδραση παραγωγής γαλακτικού αιθυλεστέρα, με μοριακή αναλογία αιθανόλης (99.9%)/γαλακτικού οξέος (88%) 1/1 και καταλύτη με $w_{cat}=0.1$ (Δοκιμή 5) στα 60 και 120min. ....	111
Σχήμα 49: Μετατροπή γαλακτικού οξέος κατά την χημική αντίδραση παραγωγής γαλακτικού αιθυλεστέρα συναρτήσει του χρόνου για τις Δοκιμές 1, 2, 3, 5.....	111
Σχήμα 50: Μετατροπή γαλακτικού οξέος κατά την αντίδραση παραγωγής γαλακτικού αιθυλεστέρα από βιοαιθανόλη συναρτήσει του χρόνου για τις Δοκιμές 6, 9. ....	113

## ΘΕΩΡΗΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ

### 1 ΝΟΜΟΘΕΤΙΚΟ ΠΛΑΙΣΙΟ

#### 1.1 ΕΙΣΑΓΩΓΗ

Από την αρχή της βιομηχανικής επανάστασης, τα ορυκτά καύσιμα αποτελούσαν την κινητήρια δύναμη πίσω από την οικονομική ανάπτυξη των χωρών. Πλέον, όμως, η μελλοντική εξάντληση των φυσικών αποθεμάτων των ορυκτών καυσίμων θα οδηγήσει σε μια ενδεχόμενη παγκόσμια οικονομική και πολιτική αναταραχή και όπως είναι αντιληπτό ακολουθούμενη από μεγάλη ενεργειακή κρίση. Παρ' όλα αυτά τα συμβατικά ορυκτά καύσιμα επί του παρόντος κατέχουν την μερίδα του λέοντος, καθώς κυριαρχούν στο παγκόσμιο ενεργειακό σύστημα [1]. Σύμφωνα με τη Διεθνή Οργάνωση Ενέργειας (IEA) περίπου το 80% της συνολικής πρωτογενούς ενέργειας στον κόσμο προέρχεται από ορυκτά καύσιμα, με το πετρέλαιο να αντιπροσωπεύει το 32.8%, τον άνθρακα το 27.2% και το φυσικό αέριο το 20.9% [2]. Η ενεργειακή στρατηγική μιας χώρας στοχεύει στην αποτελεσματικότητα, την ασφάλεια και την φιλική προς το περιβάλλον δραστηριότητα, ώστε να επιτευχθεί ένα βέλτιστο μείγμα πρώτων υλών για την παραγωγή ενέργειας. Τα ορυκτά καύσιμα θα συνεχίσουν να διαδραματίζουν κυρίαρχο ρόλο στον ενεργειακό τομέα της χώρας μας τις επόμενες δεκαετίες, ωστόσο, οι συμβατικοί ή ορυκτοί πόροι καυσίμων είναι περιορισμένοι, μη ανανεώσιμοι, ρυπογόνοι και άρα πρέπει να χρησιμοποιούνται με σύνεση [3].

Από την άλλη πλευρά, για τις ανανεώσιμες πηγές ενέργειας, οι πόροι είναι μη ρυπογόνοι και σχεδόν ανεξάντλητοι. Οι πηγές αυτές μπορούν ολοένα και περισσότερο να ικανοποιήσουν τις υψηλές ενεργειακές ανάγκες της σύγχρονης εποχής με περιβαλλοντικά φιλικό και οικονομικά αποδοτικό τρόπο, ενώ ταυτόχρονα, έτσι, εξασφαλίζεται και η μείωση της εξάρτησης από την εισαγωγή ορυκτών καυσίμων και η εξασφάλιση αυτονομίας και αυτάρκειας κάθε κράτους και έτσι παρέχεται υψηλότερος βαθμός Εθνικής Ενεργειακής Ασφάλειας. Οι αναπτυσσόμενες χώρες θεωρούν τα βιοκαύσιμα ως ένα δυνητικό μέσο για την τόνωση της αγροτικής ανάπτυξης και τη δημιουργία ευκαιριών απασχόλησης εργαζομένων [4].

Στο πλαίσιο των διεθνών προοπτικών, η παρούσα πολιτική που εφαρμόζεται, προσπαθεί να επιτύχει τη βέλτιστη ανάπτυξη και αξιοποίηση των εγχώριων πρώτων υλών βιομάζας για την παραγωγή βιοκαυσίμων. Η πολιτική προβλέπει επίσης την ανάπτυξη της επόμενης γενιάς πιο αποτελεσματικών τεχνολογιών μετατροπής βιοκαυσίμων με βάση νέες πρώτες ύλες. Η πολιτική καθορίζει το όραμα, τους μεσοπρόθεσμους στόχους, τη στρατηγική και την προσέγγιση για την ανάπτυξη των βιοκαυσίμων και προτείνει ένα πλαίσιο τεχνολογικών, οικονομικών και θεσμικών παρεμβάσεων, καθώς και μηχανισμούς ενεργοποίησης.

Η αύξηση της τιμής του αργού πετρελαίου συνδέεται άμεσα με την αγορά των βιοκαυσίμων. Το πρόβλημα της κλιματικής αλλαγής έθεσε σε εφαρμογή πληθώρα νέων προσεγγίσεων και προώθησε την ανάπτυξη της βιομάζας σε σημείο, όπου η βιομηχανία βιοκαυσίμων θεωρήθηκε ως η λύση της ενεργειακής ανασφάλειας. Ορισμένες χώρες καταργούν τους ειδικούς φόρους κατανάλωσης καυσίμων, παρέχοντας πιστώσεις συμψηφισμού σε παραγωγούς εναλλακτικών καυσίμων ή απαλλάσσουν τους φόρους για οχήματα ικανά να λειτουργούν με βιοκαύσιμα. Ενώ άλλες απαλλάσσονται από τους ειδικούς φόρους κατανάλωσης των καυσίμων ή και συνδέουν τους φορολογικούς συντελεστές με τις περιβαλλοντικές επιδόσεις συγκεκριμένων καυσίμων, διαφοροποιώντας τους παραγωγούς και τις πρώτες ύλες. Η αύξηση του ενδιαφέροντος ενασχόλησης και παραγωγής καυσίμων από ανανεώσιμες πηγές, οφείλεται λοιπόν, στα παραπάνω φορολογικά κίνητρα καθώς και στο γεγονός ότι οι μηχανισμοί που χρησιμοποιούνται είναι ευρείς και ποικίλοι. Οι διάφορες χώρες έχουν υιοθετήσει διαφορετικούς τρόπους για να περάσουν στη χρήση των

βιοκαυσίμων, καθώς το κόστος κάθε βιοκαυσίμου ποικίλλει ανάλογα με την τοποθεσία και την πρώτη ύλη (είδος βιομάζας) που χρησιμοποιείται [5].

## 1.2 ΝΟΜΟΘΕΤΙΚΟ ΠΛΑΙΣΙΟ ΓΙΑ ΤΑ ΒΙΟΚΑΥΣΙΜΑ

Η Ευρωπαϊκή Ένωση έθεσε ως στόχο, το 2001, την κάλυψη του 12% της κατανάλωσης ενέργειας και του 22.1% της κατανάλωσης ηλεκτρικής ενέργειας με ενέργεια από ανανεώσιμες πηγές (ΑΠΕ) έως το 2010, με διαφορετικούς στόχους για κάθε κράτος μέλος που ορίζονται με βάση την οδηγία 2001/77/ΕΚ.

Η αρχική οδηγία για τις ανανεώσιμες πηγές ενέργειας, RED I (Οδηγία (ΕΕ) 2009/28/ΕΚ) ορίζει ότι, έως το 2020, το 20% της κατανάλωσης ενέργειας στην ΕΕ πρέπει να καλύπτεται από ΑΠΕ και ότι όλα τα κράτη μέλη πρέπει να καλύπτουν το 10% των καυσίμων μεταφορών τους από ΑΠΕ. Η οδηγία προσδιορίζει επίσης διάφορους μηχανισμούς που μπορούν να εφαρμόσουν τα κράτη μέλη, για να επιτύχουν τους στόχους τους (καθεστώτα στήριξης, εγγυήσεις προέλευσης, κοινά έργα, συνεργασία μεταξύ κρατών μελών και τρίτων χωρών), καθώς και κριτήρια βιωσιμότητας για τα βιοκαύσιμα.

Τον Δεκέμβριο του 2018, τέθηκε σε ισχύ η αναθεωρημένη οδηγία για τις ανανεώσιμες πηγές ενέργειας, RED II (Οδηγία (ΕΕ) 2018/2001), στο πλαίσιο της «Καθαρής ενέργειας για όλους τους Ευρωπαίους», η οποία αποβλέπει στο να παραμείνει η ΕΕ παγκόσμιος ηγέτης στον τομέα των ανανεώσιμων πηγών ενέργειας και, γενικότερα, να την βοηθήσει να εκπληρώσει τις δεσμεύσεις της για μείωση των εκπομπών στο πλαίσιο της συμφωνίας του Παρισιού. Η νέα οδηγία θεσπίζει έναν νέο στόχο για τις ανανεώσιμες πηγές ενέργειας για την ΕΕ για το 2030, σε τουλάχιστον 32% της κατανάλωσης τελικής ενέργειας [3]. Για τα προηγμένα βιοκαύσιμα, η RED II εισήγαγε δύο διαφορετικά σύνολα στόχων για την πρώτη ύλη που αναφέρεται στο Μέρος Α του ακόλουθου πίνακα (Πίνακας 1) και για την πρώτη ύλη που αναφέρεται στο Μέρος Β. Η πρώτη ύλη που αναφέρεται στο Μέρος Α πρέπει να παρέχεται σε ποσοστό τουλάχιστον 0.2% της ενέργειας των μεταφορών το 2022, 1% το 2025 και τουλάχιστον 3.5% έως το 2030. Τα βιοκαύσιμα που παράγονται από πρώτες ύλες που αναφέρονται στο Μέρος Β θα πρέπει περιοριστούν στο 1.7% το 2030.

Η Οδηγία για τις Ανανεώσιμες Πηγές Ενέργειας (RED) όριζε ότι τα βιοκαύσιμα μπορούν να καταμετρηθούν στους στόχους της ΕΕ ή/και των κρατών μελών μόνο εάν πληρούν τις ελάχιστες απαιτήσεις μείωσης των αερίων θερμοκηπίου (GHG), σύμφωνα με τον ακόλουθο πίνακα (Πίνακας 2).

Η Οδηγία για την ποιότητα των καυσίμων (FQD, Fuel Quality Directive) (οδηγία 2009/30/ΕΚ) συμπλήρωσε την RED και αντικατοπτρίζοντας μέρος του περιεχομένου της, όπως τα κριτήρια βιωσιμότητας. Μια βασική απαίτηση στο άρθρο 7α της FQD είναι ότι όλοι οι προμηθευτές καυσίμων πρέπει να πληρούν 6% μείωση των εκπομπών GHG έως το 2020 σε όλες τις κατηγορίες καυσίμων που παρέχονται στην αγορά. Αυτό έχει σχεδιαστεί για να συνάδει με τον στόχο ελάχιστης χρήσης του 10% για τα βιοκαύσιμα και να μετατοπίσει τη ζήτηση προς τα βιοκαύσιμα με υψηλότερη εξοικονόμηση αερίων του θερμοκηπίου. Επιπλέον, η FQD περιορίζει τα μείγματα αιθανόλης στο 10% ή λιγότερο όταν χρησιμοποιείται η αιθανόλη ως οξυγονούχο, και θέτει όρια στην περιεκτικότητα του βιοντίζελ σε φοινικέλαιο και σογιέλαιο. Η Επιτροπή δεν σκοπεύει να επεκτείνει τον στόχο μείωσης των αερίων του θερμοκηπίου πέραν του 2020.

Η RED II εισάγει νέα κριτήρια εκπομπών GHG, με τα οποία πρέπει να συμμορφώνονται τα βιοκαύσιμα που χρησιμοποιούνται στις μεταφορές, για να συνυπολογίζονται στον συνολικό στόχο του 14%. Η Ευρωπαϊκή Επιτροπή επιτρέπεται να αναθεωρεί και να επικαιροποιεί τις προεπιλεγμένες τιμές των εκπομπών αερίων του θερμοκηπίου όταν οι τεχνολογικές εξελίξεις το καθιστούν απαραίτητο. Οι οικονομικοί φορείς έχουν την επιλογή είτε να χρησιμοποιήσουν

προεπιλεγμένες τιμές έντασης GHG που παρέχονται στην RED II είτε να υπολογίσουν τις πραγματικές τιμές για την πορεία τους [3].

Πίνακας 1: Προηγμένες πηγές βιοκαυσίμων, Μέρος A και Μέρος B στην RED II.

Μέρος A	Μέρος B
<ul style="list-style-type: none"> <li>• Φύκια εάν καλλιεργούνται στη γη σε λίμνες ή φωτοβιοαντιδραστήρες.</li> <li>• Κλάσμα βιομάζας μικτών αστικών απορριμμάτων.</li> <li>• Βιολογικά απόβλητα από ιδιωτικά νοικοκυριά που υπόκεινται σε χωριστή συλλογή.</li> <li>• Κλάσμα βιομάζας βιομηχανικών αποβλήτων ακατάλληλο για χρήση στην αλυσίδα τροφίμων ή ζωοτροφών.</li> <li>• Άχυρο</li> <li>• Ζωική κοπριά και λάσπη λυμάτων.</li> <li>• Απόβλητα ελαιολιβερίου και άδεια τσαμπιά φρούτων φοινικέλαιου.</li> <li>• Ακατέργαστη γλυκερίνη.</li> <li>• Υπολείμματα ζαχαροκάλαμου.</li> <li>• Στέμφυλα και οινολάσπες.</li> <li>• Τσόφλια ξηρών καρπών.</li> <li>• Φλοιοί</li> <li>• Στάχια καθαρισμένα από κόκκους καλαμποκιού.</li> <li>• Κλάσμα βιομάζας αποβλήτων και υπολειμμάτων από τη δασοκομία και τις δασικές βιομηχανίες.</li> <li>• Άλλο μη εδώδιμο κυτταρινικό υλικό.</li> <li>• Άλλο λιγνοκυτταρινικό υλικό εκτός από κορμούς πριονιού και κορμούς καπλαμά.</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Μεταχειρισμένο μαγειρικό λάδι.</li> <li>• Μερικές κατηγορίες ζωικών λιπών.</li> </ul>

Πίνακας 2: Προηγμένες πηγές βιοκαυσίμων, Μέρος A και Μέρος B στην RED II, εντολές και ανώτατο όριο.

Χρονολογία	Ελάχιστες % μειώσεις εκπομπών GHG κάθε βιοκαυσίμου κατά RED σε σύγκριση με το αντίστοιχο ορυκτό καύσιμο.
2009-2017	35%
2018 και έπειτα	50% για βιοκαύσιμα που παράγονται σε επιχειρήσεις που ξεκίνησαν την παραγωγή στις 5 Οκτωβρίου 2015 ή πριν. 60% για βιοκαύσιμα που παράγονται σε επιχειρήσεις που ξεκίνησαν την παραγωγή μετά τις 5 Οκτωβρίου 2015.

Πίνακας 3: Όρια εξοικονόμησης αερίων θερμοκηπίου στην RED II.

Χρονολογία έναρξης λειτουργίας εγκαταστάσεων	Βιοκαύσιμα μεταφοράς	Ανανεώσιμα καύσιμα μεταφοράς μη βιολογικής προέλευσης	Ηλεκτρισμός, θέρμανση και ψύξη
Πριν τον Οκτώβριο του 2015	50%	-	-
Μετά τον Οκτώβριο του 2015	60%	-	-
Μετά τον Ιανουάριο του 2021	65%	70%	70%
Μετά τον Ιανουάριο του 2026	65%	70%	80%

Το 2018, τα βιοκαύσιμα αναμειγνύονταν σε ποσοστό 5.2% με τα ορυκτά καύσιμα. Η ανάμιξη συμβατικών βιοκαυσίμων (food-based) άγγιζε το 4.1%, τιμή αρκετά χαμηλότερη του 7% που είναι το όριο της νομοθεσίας μέχρι και το 2030 (RED II). Η ανάμιξη προηγμένων (non-food based) βιοκαυσίμων εκτιμάται στο 1.2% [6].

Οι σημαντικότερες οδηγίες της αναθεωρημένης νομοθεσίας REDII είναι:

- Τα βιοκαύσιμα που καταναλώνονται στις μεταφορές και παράγονται από τρόφιμα και ζωοτροφές, οφείλουν να μην ξεπερνούν το 7% της συνολικής κατανάλωσης ενέργειας στους τομείς των οδικών και σιδηροδρομικών μεταφορών του κάθε κράτους – μέλους.
- Η συνεισφορά των προηγμένων βιοκαυσίμων και του βιοαερίου που παράγονται από λάδι πεύκου και κυτταρινούχες τροφοδοσίες, ως μερίδιο της τελικής κατανάλωσης ενέργειας στο τομέα των μεταφορών πρέπει να είναι τουλάχιστον 0.2% το 2022, τουλάχιστον 1% το 2025 και τουλάχιστον 3.5% το 2030 στο μερίδιο της τελικής κατανάλωσης ενέργειας στο τομέα των μεταφορών.
- Κάθε κράτος – μέλος οφείλει να υποχρεώσει τους προμηθευτές καυσίμων να εξασφαλίσουν ότι το μερίδιο της ανανεώσιμης ενέργειας στη συνολική κατανάλωση ενέργειας στον τομέα των μεταφορών θα είναι τουλάχιστον 14% το 2030 [6].

### 1.3 ΝΟΜΟΘΕΣΙΑ ΓΙΑ ΣΤΕΡΕΑ ΑΠΟΒΛΗΤΑ

Οι γενικές απαιτήσεις όσον αφορά τη διαχείριση των αποβλήτων, όπως είναι η προστασία του περιβάλλοντος και της ανθρώπινης υγείας κατά την επεξεργασία αποβλήτων και η ανακύκλωση, καθορίζονται στην οδηγία για τα απόβλητα 2008/98/ΕΚ, όπως τροποποιήθηκε και ισχύει από την Οδηγία 2018/851/ΕΚ.

Η Οδηγία ορίζει ως «απόβλητο»: «κάθε ουσία ή αντικείμενο, το οποίο ο κάτοχός του απορρίπτει ή προτίθεται ή υποχρεούται να απορρίψει και περιέχει ειδικά στοιχεία σχετικά με τα βιολογικά απόβλητα». Ενσωματώνει την έννοια «υποπροϊόν» και εισάγει τη διάκριση μεταξύ αποβλήτων και μη αποβλήτων διευκρινίζοντας, ότι μια ουσία ή αντικείμενο που αναγράφεται στον ΕΚΑ (2000/532/ΕΚ) δεν συνιστά οπωσδήποτε απόβλητο, παρά μόνο εάν πληροί τα κριτήρια του ορισμού αποβλήτων [7]. Η Οδηγία 2008/98/ΕΚ αιτιολογεί τη σημασία της χωριστής συλλογής των βιοαποβλήτων, ενώ η αναθεωρημένη οδηγία 2018/851/ΕΚ δεν αφήνει πλέον, τη χωριστή συλλογή των βιοαποβλήτων στη διακριτική ευχέρεια των κρατών – μελών, αλλά απαιτεί να εξασφαλίσουν ότι μέχρι 31-12-2023 τα βιοαπόβλητα είτε θα διαχωρίζονται και θα ανακυκλώνονται στην πηγή, είτε θα συλλέγονται χωριστά και δεν θα αναμιγνύονται με άλλα είδη αποβλήτων. Αυτή η ποιοτική παράμετρος διαφοροποιεί την κομποστοποίηση που εφαρμόζεται μόνο σε διαχωρισμένα στην πηγή βιοαπορρίμματα, από τα σταθεροποιημένα βιοαπόβλητα που προέρχονται από μηχανική/βιολογική επεξεργασία σύμμεικτων ή υπολειμματικών απορριμμάτων, ακόμη και αν τα αυτά πληρούν τις ποιοτικές προδιαγραφές του κομπόστ. Αυτό έχει ιδιαίτερη σημασία για την Ελλάδα, που δεν έχει προχωρήσει σε εκτεταμένα προγράμματα διαλογής στην πηγή, και οι εγκαταστάσεις μηχανικής/βιολογικής επεξεργασίας που διαθέτει εφαρμόζουν μηχανική διαλογή σε σύμμεικτα απορρίμματα. Στον ακόλουθο πίνακα (Πίνακας 4) απεικονίζονται τα όρια σε περιεκτικότητα βαρέων μετάλλων για τα βιοαπόβλητα [8].

Πίνακας 4: Όρια Βαρέων Μετάλλων στα βιοαπόβλητα.

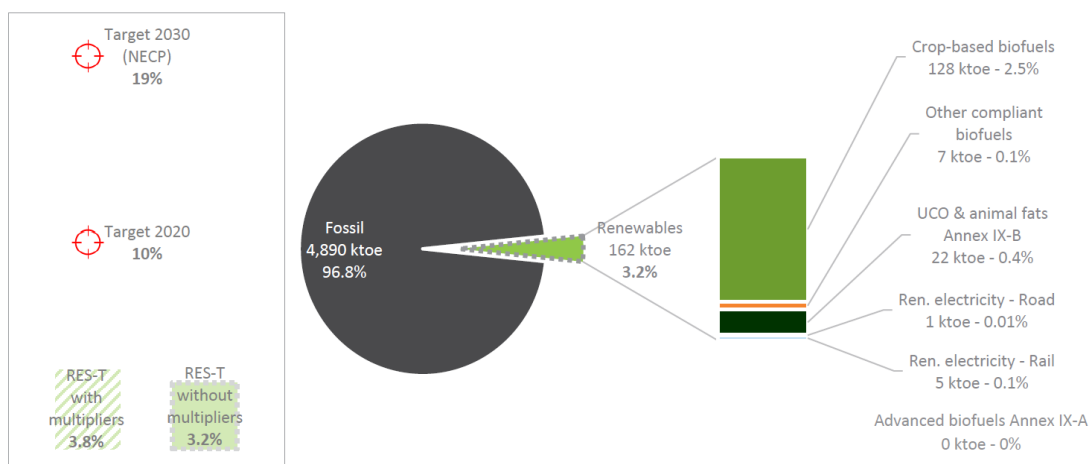
Βαρέα Μέταλλα (mg/kg D.S)	Κομπόστ (τάξης1)	Κομπόστ (τάξης 2)	Σταθεροποιημένο βιοαποδομήσιμο απόβλητο
Cd	0.7	1.5	5
Cu	100	150	600
Ni	50	75	150
Pb	100	150	500
Zn	200	400	1500
Hg	0.5	1	5
Cr	100	150	600

## 1.4 ΕΛΛΗΝΙΚΟ ΔΙΚΑΙΟ

Στο Ελληνικό δίκαιο έχουν ενσωματωθεί όλες οι σχετικές οδηγίες της ΕΕ. Οι βασικές αρχές και οι στόχοι για τη διαχείριση των στερεών αποβλήτων, μαζί με τις προδιαγραφές για τον εθνικό και περιφερειακό σχεδιασμό, καθορίζονται από το Εθνικό Σχέδιο Διαχείρισης Αποβλήτων (ΕΣΔΑ), το οποίο αναθεωρείται κάθε πενταετία ή νωρίτερα, εάν είναι απαραίτητο. Μια στρατηγική Οδηγία για τα βιοαπόβλητα μπορεί να συνεισφέρει στην εκπλήρωση των στόχων της Οδηγίας για την υγειονομική ταφή και να ενισχύσει τη συμμόρφωση με τις στρατηγικές για την πρόληψη και την ανακύκλωση αποβλήτων, για την προστασία του εδάφους, για την αειφόρο χρήση των φυσικών πόρων και να συμβάλει στην επίτευξη των στόχων του Ευρωπαϊκού Προγράμματος για την Κλιματική Αλλαγή. Επίσης, θα ήταν ένα σημαντικό εργαλείο προκειμένου να προωθηθούν συνεπείς στρατηγικές για την εκτροπή των βιοαποβλήτων από τους χώρους υγειονομικής ταφής. Η Οδηγία πρέπει να περιλαμβάνει κανονιστικές πτυχές (π.χ. συνθήκες για την εφαρμογή του κομπόστ κ.λπ.), αλλά κυρίως οδηγίες και στόχους που θα δημιουργήσουν ένα ασφαλές περιβάλλον που θα εξασφαλίσει μακροπρόθεσμα επιχειρηματικά σχέδια και επενδύσεις, στον τομέα των βιοαποβλήτων. Ένα σημαντικό ζήτημα που αντιμετωπίζουν οι υπεύθυνοι για τη λήψη αποφάσεων, όταν η διαχείριση βιολογικών αποβλήτων γίνεται σε τοπικό επίπεδο, είναι η βιωσιμότητα και το κόστος των συστημάτων χωριστής συλλογής, τα οποία έχουν ρόλο κλειδί στην παραγωγή καλής ποιότητας κομπόστ, που απαιτείται ώστε να ικανοποιούνται οι αρχές των «ευεργετικών επιπτώσεων» και «πρόληψης της μόλυνσης» που αναφέρονται εκτενώς, στη στρατηγική για το έδαφος.

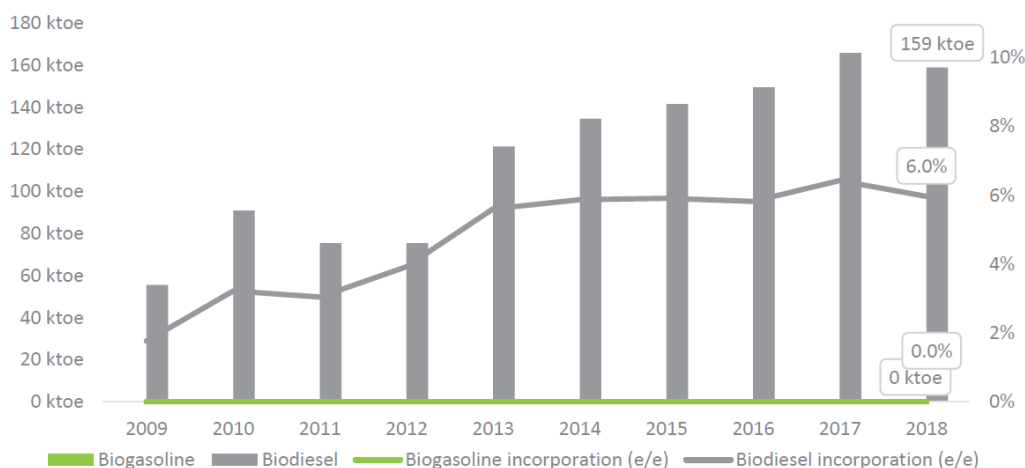
Υπάρχει η άποψη ότι ο υποχρεωτικός - επιτακτικός διαχωρισμός στην πηγή, δεν έχει την ευελιξία που απαιτείται για να καλυφθεί ένα ευρύ φάσμα κοινωνικών συνθηκών, διαφορετικών τύπων κατοικιών, πυκνότητας πληθυσμού και υφιστάμενων εγκαταστάσεων, σε όλη την Ευρώπη. Από αυτή την άποψη, ο καθορισμός στόχων για τη διαλογή στην πηγή και την κομποστοποίηση είναι μια προσέγγιση που στοχεύει στο αποτέλεσμα και παρέχει ένα βαθμό ελευθερίας στους υπεύθυνους λήψης αποφάσεων να επιλέξουν τους πιο κατάλληλους τρόπους κατά περίπτωση, για την εφαρμογή της διαλογής στην πηγή. Αντιθέτως η «γενική υποχρέωση» είναι πιθανό να οδηγήσει σε ελλιπώς σχεδιασμένα συστήματα που μεταφράζονται σε χαμηλά ποσοστά συμμετοχής και αποδοτικότητας [9].

Η Ελλάδα σχεδιάζει να αυξήσει το Μεριδίο Ανανεώσιμων Πηγών Ενέργειας στις μεταφορές στο 19% το 2030 με τα βιοκαύσιμα να αντιπροσωπεύουν το 80% του Μεριδίου Ανανεώσιμων Πηγών Ενέργειας ή περίπου 371 ktce (τόνος ισοδύναμου πετρελαίου) (έναντι των 157 ktce το 2018) [8].



Σχήμα 1: Ανανεώσιμες πηγές ενέργειας στις μεταφορές το 2018 [8].





Σχήμα 2: Κατανάλωση βιοκαυσίμων και ενσωμάτωση τους στην ενέργεια [8].

## 1.5 ΝΟΜΟΘΕΣΙΑ ΓΙΑ ΠΡΑΣΙΝΟΥΣ ΔΙΑΛΥΤΕΣ

### 1.5.1 ΕΙΣΑΓΩΓΗ

Τα τελευταία χρόνια, πιο πράσινες χημικές ενώσεις που προέρχονται από ανανεώσιμες πηγές, λαμβάνουν όλο και μεγαλύτερο ενδιαφέρον, γεγονός που οφείλεται κατά κύριο λόγο στο περιβαλλοντικό κίνημα που έλαβε χώρα τη δεκαετία του 1970 στη Διάσκεψη των Ηνωμένων Εθνών στη Στοκχόλμη το 1972 (Conference on the Human Environment). Η χημική νομοθεσία και η περιβαλλοντική ρύθμιση ήταν κυρίως εθνική μέχρι το 1980 οπότε και διεθνείς περιβαλλοντικές οδηγίες και συμβάσεις κρίθηκαν αναγκαίες λόγω της διεθνούς αύξησης του εμπορίου χημικών και της γνώσης των επιπτώσεων αυτού. Επιπλέον, την δεκαετία του 1980 η έννοια της προστασίας του περιβάλλοντος συνδεόταν άμεσα με την οικονομική ανάπτυξη, οδηγώντας στη διάδοση της «βιώσιμης ανάπτυξης» ως μέσο ενθάρρυνσης της ενσωμάτωσης των πολιτικών σε όλους τους τομείς (Διακήρυξη του Ρίο για το περιβάλλον και Ανάπτυξη και τη Διακήρυξη του Γιοχάνεσμπουργκ για τη Βιώσιμη Ανάπτυξη, ανεπίσημα γνωστή ως Διάσκεψη Κορυφής της Γης). Επιπλέον, με τον πόλεμο του Γιομ Κιπούρ (1973) και το επακόλουθο αραβικό εμπάργκο του πετρελαίου, την επανάσταση του Ιράν (Νοέμβριος 1978- Ιούνιος 1979) και τον πόλεμο Ιράκ-Ιράν, η παραγωγή αργού πετρελαίου μειώθηκε, με αποτέλεσμα την ραγδαία αύξηση της τιμής του από 3 USD το βαρέλι το 1972, σε 35 USD το 1982. Ακόμα, πιο πρόσφατα η απεργία του PDVSA (Βενεζουέλα 2002-2003) και ο πόλεμος στο Ιράκ (2003), η τιμή του αργού πετρελαίου έφτασε σε νέα μέγιστη τιμή το 2008, αυτή των 126 USD ανά βαρέλι, η οποία όμως έπειτα μειώθηκε ξανά λόγω της οικονομικής κρίσης στα 94 USD. Έτσι, λαμβάνοντας υπόψη τόσο τους περιβαλλοντικούς κανονισμούς όσο και την αύξηση στη τιμή του πετρελαίου, η αναζήτηση χημικών ενώσεων που προέρχονται από ανανεώσιμες πηγές αποτελεί αναγκαία προϋπόθεση για μια βιώσιμη ανάπτυξη.

Από τους πράσινους διαλύτες οι πιο δημοφιλείς είναι το νερό, το υπερκρίσιμο διοξείδιο του άνθρακα και τα ιοντικά υγρά. Παρά το αυξανόμενο ενδιαφέρον, η προσοχή που δίνεται στα βιολογικά προϊόντα όπως στους διαλύτες που ανήκουν στην οικογένεια των γαλακτικών εστέρων, από τους οποίους ο πιο σημαντικός είναι το ethyl lactate, είναι μειωμένη [10].

### 1.5.2 ΑΡΧΕΣ ΤΗΣ ΠΡΑΣΙΝΗΣ ΧΗΜΕΙΑΣ

Πλέον, η μεγάλη πρόκληση είναι ο σχεδιασμός και η εφαρμογή απολύτως πράσινων προϊόντων και διεργασιών. Δεν υπάρχει κάποια αξιόπιστη μέθοδος εξασφάλισης ότι η χημεία που χρησιμοποιείται είναι πράσινη, μιας που ο αριθμός των μονοπατιών σύνθεσης των χημικών είναι τεράστιος και γενικά το μόνο που μπορεί να εξακριβωθεί είναι αν μια

διεργασία είναι πιο πράσινη από κάποιες άλλες εναλλακτικές λύσεις, στηριζόμενοι στις παρακάτω αρχές της πράσινης χημείας.

Οι 12 αρχές της Πράσινης Χημείας:

- 1) Προτιμάται η πρόληψη των αποβλήτων από την επεξεργασία και τον καθαρισμό τους αφού παραχθούν.
- 2) Οι συνθετικές μέθοδοι θα πρέπει να σχεδιάζονται έτσι ούτως ώστε να μεγιστοποιείται η ενσωμάτωση όλων των υλικών που χρησιμοποιούνται για τη διαδικασία στο τελικό προϊόν.
- 3) Οι μεθοδολογίες αυτές θα πρέπει, όπου είναι εφικτό, να χρησιμοποιούν και να παράγουν ουσίες που προκαλούν ελάχιστη ή και καθόλου τοξικότητα τόσο στην ανθρώπινη υγεία, όσο και στο περιβάλλον.
- 4) Τα χημικά προϊόντα θα πρέπει να είναι σχεδιασμένα με τέτοιο τρόπο ώστε να διατηρούν την αποτελεσματική λειτουργία τους με ταυτόχρονη μείωση της τοξικότητας.
- 5) Οι βοηθητικές ουσίες όπως οι διαλύτες θα πρέπει να κρίνονται μη απαραίτητοι και να μην χρησιμοποιούνται όπου είναι δυνατόν.
- 6) Οι ενεργειακές απαιτήσεις θα πρέπει να αναλογιστεί ότι έχουν και περιβαλλοντικές και οικονομικές επιπτώσεις και για αυτό θα πρέπει να ελαχιστοποιούνται.
- 7) Θα πρέπει οι πρώτες ύλες που χρησιμοποιούνται να είναι ανανεώσιμες όποτε αυτό είναι τεχνικά και οικονομικά εφικτό.
- 8) Η περιττή παραγωγή (προστασία/αποπροστασία και προσωρινή τροποποίηση φυσικών/χημικών διεργασιών) πρέπει να αποφεύγεται όσο το δυνατόν γίνεται.
- 9) Τα αντιδραστήρια που χρησιμοποιούνται ως καταλύτες (όσο το δυνατόν πιο εκλεκτικά) υπερτερούν σημασίας συγκριτικά με τα στοιχειομετρικά αντιδραστήρια.
- 10) Τα χημικά προϊόντα πρέπει να σχεδιάζονται ώστε στο τέλος της λειτουργίας τους να μην παραμένουν στο περιβάλλον αλλά να διασπώνται σε αβλαβή προϊόντα.
- 11) Οι αναλυτικές μεθοδολογίες χρειάζονται περαιτέρω ανάπτυξη ώστε να επιτρέπουν τον έλεγχο και την παρακολούθηση της διαδικασίας σε πραγματικό χρόνο προκειμένου να αποφευχθεί ο πιθανός σχηματισμός επικίνδυνων ουσιών.
- 12) Οι ουσίες που χρησιμοποιούνται καθώς και οι μορφές που έχουν αυτές σε μια χημική διεργασία, πρέπει να επιλέγονται έτσι ώστε να ελαχιστοποιούνται οι πιθανότητες πραγματοποίησης χημικών ατυχημάτων, όπως εκλύσεων, εκρήξεων και πυρκαγιών [11].

## 2 ΒΙΟΜΗΧΑΝΙΚΑ ΑΠΟΒΛΗΤΑ

### 2.1 ΕΙΣΑΓΩΓΗ

Η βιομηχανική ή οικονομική δραστηριότητα διακρίνεται σε: πρωτογενή τομέα (ορυχεία, γεωργία, κλπ, παραγωγή πρώτων υλών), δευτερογενή τομέα (κατασκευαστική βιομηχανία, μεταποίηση) και τριτογενή τομέα (εμπόριο, υπηρεσίες, διοίκηση). Τα βιομηχανικά απόβλητα είναι αυτά που προέρχονται από τις διαδικασίες παραγωγής, μετατροπής, καθαρισμού, συντήρησης ή κατανάλωσης που παράγονται από τις βιομηχανίες πρωτογενούς ή δευτερογενούς τομέα. Δευτερογενώς, τα βιομηχανικά απόβλητα περιλαμβάνουν προϊόντα βιομηχανικής παραγωγής τα οποία παύουν να χρησιμοποιούνται λόγω παλαιότητας, φθοράς ή αστοχίας και πρέπει να διατεθούν κατάλληλα στο περιβάλλον. Σύμφωνα με την Ευρωπαϊκή (Οδηγία Πλαίσιο για τα απόβλητα 2008/98/ΕΚ) και Ελληνική νομοθεσία (Ν.4042/2012-Νόμος πλαίσιο για τα απόβλητα) ως απόβλητο θεωρείται «κάθε ουσία ή αντικείμενο το οποίο ο κάτοχός του απορρίπτει ή προτίθεται ή υποχρεούται να απορρίψει» Τα βιομηχανικά απόβλητα είναι άχρηστα, αφού γενικά η χρήση τους δεν είναι δυνατή, ως συνέπεια του υψηλού κόστους των τεχνολογιών ή απλώς επειδή δεν υπάρχουν καλά ανεπτυγμένες τεχνολογίες για την αξιοποίησή τους. Με το πέρασμα των χρόνων και την ανάπτυξη της τεχνολογίας, οι εργασίες σε γεωργικές και βιομηχανικές μονάδες έχουν παρουσιάσει μεγάλη αύξηση, καθώς τόσο η ζήτηση όσο και οι ανάγκες των πολιτών έχουν διογκωθεί. Έτσι αποτέλεσμα αυτού ήταν η παραγωγή αποβλήτων από γεωργικές και βιομηχανικές μονάδες να αυξηθεί εκθετικά, καθώς δεν υπήρχαν μέρη εναπόθεσης και επεξεργασίας αυτών. Μοιραία, λοιπόν, είναι επιτακτική η ανάγκη υιοθέτησης μια νέας βιομηχανικής και επιχειρηματικής κουλτούρας, η οποία επιβάλλει την ανάπτυξη μονάδων που αποβλέπουν στην ορθή περιβαλλοντική διαχείριση αυτών των αποβλήτων. Τα τελευταία χρόνια είναι φανερό η προσπάθεια εκμετάλλευσης των αυξημένων σε ποσότητα αποβλήτων, με σκοπό την επαναχρησιμοποίησή τους για την ανάκτηση ενέργειας. Αυτή η προσπάθεια είναι ιδιαίτερα περίπλοκη και περιλαμβάνει πολλά στάδια, καθώς για κάθε είδος αποβλήτου υπάρχουν συγκεκριμένες μέθοδοι ώστε η τελική εναπόθεση ή επαναχρησιμοποίηση (ανάκτηση ενέργειας) να γίνεται αποδοτικά και χωρίς λειτουργικά προβλήματα. Η διαχείριση αποβλήτων έχει κεντρικό ρόλο στην κυκλική οικονομία. Ο τρόπος συλλογής και διαχείρισης αποβλήτων μπορεί να οδηγήσει σε υψηλό ποσοστό ανακύκλωσης με επιστροφή πολύτιμων υλικών στην οικονομία [12 , 13].

### 2.2 ΚΑΤΗΓΟΡΙΕΣ ΑΠΟΒΛΗΤΩΝ

Τα βιομηχανικά απόβλητα περιλαμβάνουν διαφόρων ειδών λύματα και χώματα, σκύρα, πλίνθους και σκυρόδεμα (από κατασκευές, εκσκαφές, κατεδαφίσεις), άχρηστα μέταλλα (παλιοσίδερα), έλαια, διαλύτες, χημικά, άχρηστη ξυλεία, τροφές, κλπ., και μπορούν να κατηγοριοποιηθούν ανάλογα με τα ειδικά χαρακτηριστικά τους [12].

Ανάλογα με τη φυσική τους κατάσταση, διακρίνονται κυρίως:

- σε απόβλητα σε στερεά μορφή, που πιθανώς περιέχουν και ρύπους σε υγρή ή ρευστή μορφή (από την έκπλυση ορυκτών υλικών ή άνθρακα, τη βιομηχανία πορσελάνινων ειδών, κλπ.),
- απόβλητα σε μορφή αιωρήματος/διαλύματος με τον ρύπο σε υγρή μορφή (π.χ., από τη βιομηχανία γαλακτοκομικών).

Μια σημαντική διάκριση που εφαρμόζεται στα βιομηχανικά απόβλητα είναι σε:

- μη επικίνδυνα απόβλητα, όταν δεν αποτελούν κίνδυνο ούτε για το περιβάλλον ούτε για τη δημόσια υγεία. Ο όρος στερεά απόβλητα αναφέρεται τυπικά σε υλικά που δεν συνιστούν άμεσα επικίνδυνο απόβλητο και περιλαμβάνει ακάθαρτα και άχρηστα υλικά

από δημοτικές/οικιακές πηγές, π.χ., πλαστικά, χαρτιά, μέταλλα, γυαλί, κλπ., ή επίσης υλικά κατασκευών (μπάζα) και απόβλητα πάρκων

- επικίνδυνα ή/και τοξικά απόβλητα, τα οποία εμφανίζουν μια ή περισσότερες από τις επικίνδυνες ιδιότητες που αναφέρονται στο παράρτημα III της οδηγίας 2008/98/ΕΚ, όπως έχουν τροποποιηθεί προσφάτως μέσω του κανονισμού 1357/2014 της Επιτροπής και συνοψίζονται ως εξής:
  - HP 1→ Εκρηκτικό
  - HP 2→Οξειδωτικό
  - HP 3→Εύφλεκτο
  - HP 4→Ερεθιστικό —ερεθισμός του δέρματος και οφθαλμική βλάβη
  - HP 5→ Ειδική τοξικότητα στα όργανα-στόχους, τοξικότητα από αναρρόφηση
  - HP 6→Οξεία τοξικότητα
  - HP 7→ Καρκινογόνο
  - HP 8→ Διαβρωτικό
  - HP 9→ Μολυσματικό
  - HP 10→ Τοξικό για την αναπαραγωγή
  - HP 11→ Μεταλλαξιγόνο
  - HP 12→ Έκλυση αερίου οξείας τοξικότητας
  - HP 13→ Ευαισθητοποιητικό
  - HP 14→ Οικοτοξικό
  - HP 15→ Απόβλητο ικανό να επιδείξει μια από τις παραπάνω επικίνδυνες ιδιότητες που δεν είναι άμεσα εμφανής στο αρχικό απόβλητο [11614].

Τα επικίνδυνα απόβλητα έχουν ειδικές προδιαγραφές επειδή απαιτούν προσεκτικό και σύνθετο χειρισμό. Οι κατηγορίες των υλικών αυτών προκύπτουν με βάση ορισμένα χαρακτηριστικά τους, όπως τη χημική δραστηριότητα, την αναφλεξιμότητα, τη διαβρωτικότητα και την τοξικότητα που παρουσιάζουν. Διακρίνονται σε:

- Χημικώς δραστικά απόβλητα είναι εκείνα τα οποία μπορεί να προκαλέσουν εκρήξεις όταν θερμανθούν, αναμιχθούν με νερό ή συμπιεστούν ή/και να απελευθερώσουν τοξικά αέρια στην ατμόσφαιρα. Ένα παράδειγμα είναι οι μπαταρίες λιθίου/θείου.
- Αναφλέξιμα απόβλητα είναι αυτά που έχουν θερμοκρασίες ανάφλεξης μικρότερες από 60 °C. Είναι πολύ εύφλεκτα και μπορούν να προκαλέσουν πυρκαγιά. Παραδείγματα είναι οι οργανικοί διαλύτες και τα λιπαντικά έλαια
- Διαβρωτικά απόβλητα είναι υγρά ικανά να διαβρώσουν μέταλλα. Είναι οξέα με pH μικρότερο περίπου του 2 ή βάσεις με pH μεγαλύτερο περίπου του 12.5. Ένα παράδειγμα είναι τα υγρά μπαταριών (π.χ., μολύβδου).
- Τοξικά απόβλητα είναι εκείνα που περιέχουν τοξικές ουσίες (χημικές ύλες, παθογόνους μικροοργανισμούς ή άλλες τοξίνες, ραδιενεργά υλικά που εκπέμπουν ακτινοβολίες, κλπ.), οι οποίες ελλοχεύουν σοβαρούς κινδύνους βλάβης ή και θανάτου ενός οργανισμού όταν προσληφθούν με κατάποση, εισπνοή ή και απορρόφηση από το δέρμα [12].

## 2.3 ΔΙΑΧΕΙΡΙΣΗ ΒΙΟΜΗΧΑΝΙΚΩΝ ΑΠΟΒΛΗΤΩΝ

Για την σωστή διαχείριση πρέπει να ακολουθηθούν διάφορα στάδια. Βασική μέριμνα αποτελεί η προστασία του περιβάλλοντος και της υγείας των ανθρώπων, μέσω της μείωσης των απορριμμάτων στα πλαίσια της βιώσιμης διαβίωσης. Τα στάδια διαχείρισης των βιομηχανικών αποβλήτων έχουν ως εξής:

### 2.3.1 ΠΑΡΑΓΩΓΗ ΒΙΟΜΗΧΑΝΙΚΩΝ ΑΠΟΡΡΙΜΜΑΤΩΝ

Αποτελεί ένα πολύ σημαντικό πρόβλημα, αφού όταν παράγονται τα απόβλητα, αυτά πρέπει να ταξινομηθούν και να διαχωριστούν ανάλογα με την επικινδυνότητά τους και τα

φυσικοχημικά χαρακτηριστικά τους. Στόχος είναι να αποφεύγονται τα μείγματα, ώστε αργότερα να είναι ευκολότερη η επεξεργασία των απορριμμάτων.

#### 2.3.2 ΣΥΣΣΩΡΕΥΣΗ ΚΑΙ ΑΠΟΘΗΚΕΥΣΗ ΒΙΟΜΗΧΑΝΙΚΩΝ ΑΠΟΡΡΙΜΜΑΤΩΝ

Τα απόβλητα έπειτα συλλέγονται και αποθηκεύονται χωριστά, στον τόπο παραγωγής όπου ελέγχονται οι διαρροές και αποφεύγονται έτσι τα μείγματα. Πρέπει να χρησιμοποιούνται συσκευασίες, συμβατές και ανθεκτικές στα υπολείμματα, στις οποίες να αναγράφονται: επισήμανση με την ημερομηνία, είδος των απορριμμάτων και κωδικός για την παρακολούθησή τους. Πολύ σημαντικό, μόλις γεμίσουν τα δοχεία, να κλείσουν ερμητικά για να αποφευχθεί η διαρροή και να μεταφερθούν στο χώρο αποθήκευσης. Τα απόβλητα, ανάλογα με το είδος τους και σύμφωνα με τα πρότυπα αποθήκευσης, δεν μπορούν να αποθηκευτούν για περισσότερο από ορισμένο.

#### 2.3.3 ΜΕΤΑΦΟΡΑ ΒΙΟΜΗΧΑΝΙΚΩΝ ΑΠΟΡΡΙΜΜΑΤΩΝ

Η μεταφορά βιομηχανικών απορριμμάτων πρέπει να συμβαδίζει με τους νόμους κάθε χώρας και το όχημα μεταφοράς πρέπει να φέρει τεχνικό δελτίο των απορριμμάτων, καθώς και ο οδηγός να έχει άδεια που του επιτρέπει να τα μεταφέρει.

#### 2.3.4 ΕΠΕΞΕΡΓΑΣΙΑ ΚΑΙ ΤΕΛΙΚΗ ΔΙΑΘΕΣΗ

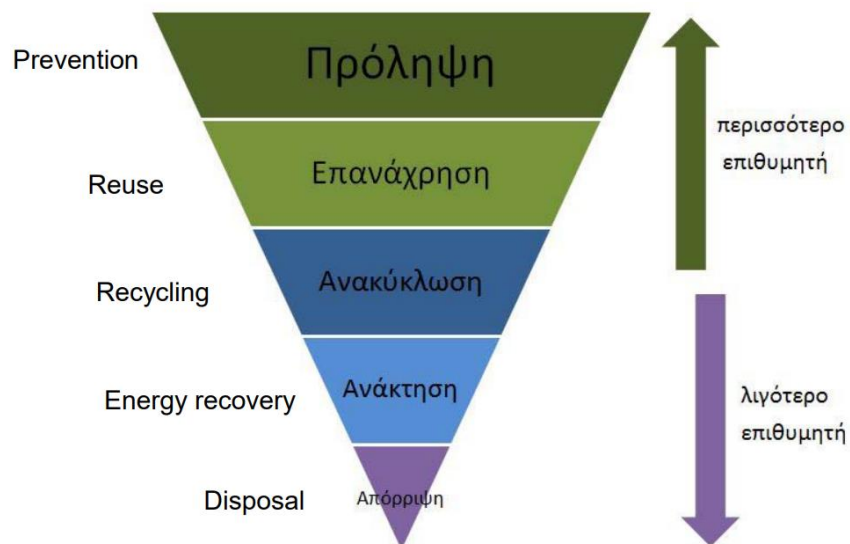
Η επεξεργασία πραγματοποιείται έτσι ώστε για τα βιομηχανικά απόβλητα να εξασφαλιστεί η όσο το δυνατόν μικρότερη επιβάρυνση του περιβάλλοντος και της ανθρώπινης υγείας. Οι επεξεργασίες, που θα πραγματοποιηθούν, θα εξαρτηθούν από τον τύπο των βιομηχανικών αποβλήτων, για παράδειγμα τα επικίνδυνα βιομηχανικά απόβλητα δεν θα αντιμετωπιστούν με τον ίδιο τρόπο όπως τα μη επικίνδυνα βιομηχανικά απόβλητα [13].

### 2.4 ΣΤΟΧΟΙ ΚΑΙ ΣΤΡΑΤΗΓΙΚΕΣ ΤΗΣ ΕΥΡΩΠΑΪΚΗΣ ΈΝΩΣΗΣ ΣΤΟΝ ΤΟΜΕΑ ΑΠΟΒΛΗΤΩΝ

Το 7ο Πρόγραμμα δράσης για το Περιβάλλον ορίζει τους ακόλουθους στόχους προτεραιότητας για την πολιτική στον τομέα των αποβλήτων στην ΕΕ:

- μείωση της ποσότητας των παραγόμενων αποβλήτων
- μεγιστοποίηση της ανακύκλωσης και της επαναχρησιμοποίησης
- περιορισμό της αποτέφρωσης στα μη ανακυκλώσιμα υλικά
- σταδιακή μείωση και κατάργηση της υγειονομικής ταφής για τα μη ανακυκλώσιμα και μη ανακτήσιμα απόβλητα
- διασφάλιση της πλήρους εφαρμογής των στόχων πολιτικής για τα απόβλητα σε όλα τα κράτη μέλη της ΕΕ.

Η αναθεωρημένη οδηγία για τα απόβλητα του 2008 έχει διαμορφώσει μια πυραμίδα ιεράρχησης 5 βαθμίδων, όπως παρουσιάζεται παρακάτω, στην οποία βέλτιστη επιλογή αποτελεί η πρόληψη και ακολουθούν η επαναχρησιμοποίηση, η ανακύκλωση, άλλες μορφές ανάκτησης και τέλος η υγειονομική ταφή [12].



Σχήμα 3: Πυραμίδα ιεράρχησης 5 βαθμίδων για τα απόβλητα.

Σύμφωνα με τη νέα στρατηγική της ευρωπαϊκής κυκλικής οικονομίας, όλες οι χώρες μέλη της Ευρωπαϊκής Ένωσης πρέπει να περάσουν σε μια οικονομία που εξοικονομεί πόρους και επαναχρησιμοποιεί τα απόβλητα [15 , 12].

## 3 ΒΙΟΚΑΥΣΙΜΑ

### 3.1 ΕΙΣΑΓΩΓΗ

Για την ανάπτυξη στο βιομηχανικό, εμπορικό και κοινωνικό τομέα αλλά και την προσωπική άνεση και κινητικότητα η ενέργεια έχει κύριο ρόλο [16]. Τα πρώτα καύσιμα που χρησιμοποιήθηκαν από τον άνθρωπο ανήκαν στα βιοκαύσιμα και ήταν το ξύλο, το λίπος και τα άχυρα, τα οποία μετά αντικαταστάθηκαν από τα ορυκτά [17]. Η κύρια πηγή ενέργειας σε όλο τον κόσμο είναι τα ορυκτά καύσιμα, τα οποία αποτελούν υπολείμματα οργανισμών που υπήρχαν στην γη και αφού υποβλήθηκαν στη θερμότητα και πίεση του φλοιού της γης για εκατοντάδες εκατομμύρια χρόνια, έχουν σχηματιστεί από την αερόβια αποσύνθεση νεκρών και θαμμένων οργανισμών (φυσική διεργασία) και έχουν περιλάβει μεγάλη ποσότητα ενέργειας. Με την πάροδο των χρόνων αυτή η αποσύνθεση έχει γίνει ένας υδρογονάνθρακας ικανός να περιέχει ενέργεια [18]. Οι περισσότερες χώρες βασίζονται στα ορυκτά καύσιμα (πετρέλαιο, φυσικό αέριο και άνθρακα), προκειμένου να ικανοποιήσουν την ανάγκη για ενέργεια, χρησιμοποιώντας ως κυριότερη πηγή ενέργειας και χημικών το πετρέλαιο, με τρέχουσα ζήτηση περίπου 12 εκατομμυρίων τόνων την ημέρα και με πρόβλεψη να αυξηθεί στους 16 εκατομμύρια τόνους ημερησίως έως το 2030. Τα ορυκτά καύσιμα, λοιπόν κυριαρχούν στο μείγμα καυσίμων με περίπου το 77% των ενεργειακών αναγκών του μέσου ευρωπαϊκού καλύπτεται από πετρέλαιο, φυσικό αέριο και άνθρακα, η πυρηνική ενέργεια καλύπτει το 14%, ενώ το υπόλοιπο 9% προέρχεται από ανανεώσιμες πηγές ενέργειας. Ωστόσο, η ανανεώσιμη ενέργεια κερδίζει γρήγορα έδαφος [16]. Πολλές ανθρώπινες δραστηριότητες απαιτούν την καύση των ορυκτών, με αποτέλεσμα την αύξηση των συγκεντρώσεων σε διοξείδιο του άνθρακα ( $\text{CO}_2$ ) στην ατμόσφαιρα που έχει ως συνέπεια την υπερθέρμανση του πλανήτη, την κλιματική αλλαγή, την απελευθέρωση και άλλων επιβλαβών ουσιών όπως νιτρικά θειικά ή ανθρακικά οξέα τα οποία με τη σειρά τους είναι υπεύθυνα για την όξινη βροχή [16, 19]. Επιπλέον με την καύση των ορυκτών καυσίμων πέραν του ότι απελευθερώνονται αέρια του θερμοκηπίου συμπεριλαμβανομένου του υποξειδίου του αζώτου ( $\text{N}_2\text{O}$ ) και ιδιαίτερα του διοξειδίου του άνθρακα ( $\text{CO}_2$ ) και του μεθανίου ( $\text{CH}_4$ ), απελευθερώνονται και διάφορες ραδιενεργές ουσίες όπως το ουράνιο (U) και το θόριο (Th), τα οποία περιέχονται στα ορυκτά καύσιμα σε μικρές ποσότητες. Το 2000 απελευθερώθηκαν περίπου 12.000 τόνοι ουρανίου και 5.000 τόνοι θορίου παγκοσμίως από την καύση κάρβουνου. Οι ποσότητες αυτές αναλογικά με την ποσότητα του κάρβουνου που καίγεται είναι πολύ μικρή και δεν έχουν αναφερθεί αρνητικές επιδράσεις στην ανθρώπινη φυσιολογία. Η καύση του λιθάνθρακα παράγει επίσης μεγάλα ποσά τέφρας και έτσι επιβαρύνονται οι γειτονικές, στις μεγάλες μονάδες που χρησιμοποιούν αυτό το καύσιμο, περιοχές, ενώ σημαντικά είναι και τα προβλήματα που προκαλούνται από τις μεθόδους εξόρυξης του άνθρακα, όπως για παράδειγμα στις υπεράκτιες εξορύξεις, που υπάρχει πιθανότητα διαρροής του υγρού στην θάλασσα. Ολέθριες είναι οι συνέπειες και σε περίπτωση θαλάσσιου ατυχήματος μεγάλου δεξαμενόπλοιου κατά την μεταφορά πετρελαίου, που θα οδηγούσε σε καταστροφή των κοντινότερων ακτών σε ακτίνα πολλών χιλιομέτρων [19]. Για τους παραπάνω λόγους διερευνώνται διάφοροι εναλλακτικοί οδοί, συμπεριλαμβανομένης μιας σειράς πηγών χωρίς άνθρακα και ανανεώσιμων πηγών (αιολική και πυρηνική ενέργεια, φωτοβολταϊκά, υδρογόνο) στην προσπάθεια αντικατάστασης του φυσικού αερίου, του πετρελαίου και του άνθρακα στον τομέα παραγωγής ηλεκτρικής ενέργειας. Σχετικά με τα μέσα μεταφοράς δεν έχει βρεθεί εναλλακτική λύση που μπορεί εύκολα να υιοθετηθεί από τον καθένα, αφού τα ηλεκτρικά/υβριδικά αυτοκίνητα απέχουν πολύ για να γίνουν κύρια οχήματά [20].

Τα τελευταία χρόνια έχουν αναπτυχθεί νέοι εναλλακτικοί τρόποι παραγωγής ενέργειας έναντι της χρήσης πετρελαίου και των προϊόντων του, τόσο για περιβαλλοντικούς όσο και για διαχειριστικούς και οικονομικούς λόγους [21]. Οι νέοι τρόποι βασίζονται στην

επαναχρησιμοποίηση των φρέσκων βιοτικών πηγών μετατρέποντας τις σε αέρια, υγρά και στερεά καύσιμα, γνωστά και ως βιοκαύσιμα [17]. Τα βιοκαύσιμα είναι μη ρυπογόνα, τοπικά διαθέσιμα, βιώσιμα και αξιόπιστα καύσιμα που λαμβάνονται από ανανεώσιμες πηγές. Η παραγωγή ηλεκτρικής ενέργειας από βιοκαύσιμα έχει βρεθεί ότι είναι μια πολλά υποσχόμενη μέθοδος στο πλησιέστερο μέλλον [22]. Κυριότεροι λόγοι για τους οποίους ειδικά τα τελευταία χρόνια προωθούνται όλο και περισσότερα τα βιοκαύσιμα είναι:

- το γεγονός ότι παράγουν υψηλά ποσοστά ενέργεια με υψηλή απόδοση.
- απελευθερώνουν πολύ λιγότερα ποσά CO<sub>2</sub> από την καύση τους συγκριτικά με τα συμβατικά καύσιμα και είναι έτσι πιο φιλικά προς το περιβάλλον.
- είναι βιοαποδομήσιμα, βιώσιμα και σχετικά λιγότερο εύφλεκτα.
- μπορούν να συμβάλλουν στη σταθεροποίηση των τιμών της ενέργειας και στη διατήρηση συναλλάγματος.
- η οικιακή χρήση τους δεν προκαλεί απειλή στην υγεία και ασφάλεια των πολιτών σε αντίθεση με τα ορυκτά καύσιμα [17 , 23].

Τα βασικότερα βιοκαύσιμα που κυκλοφορούν σήμερα είναι:

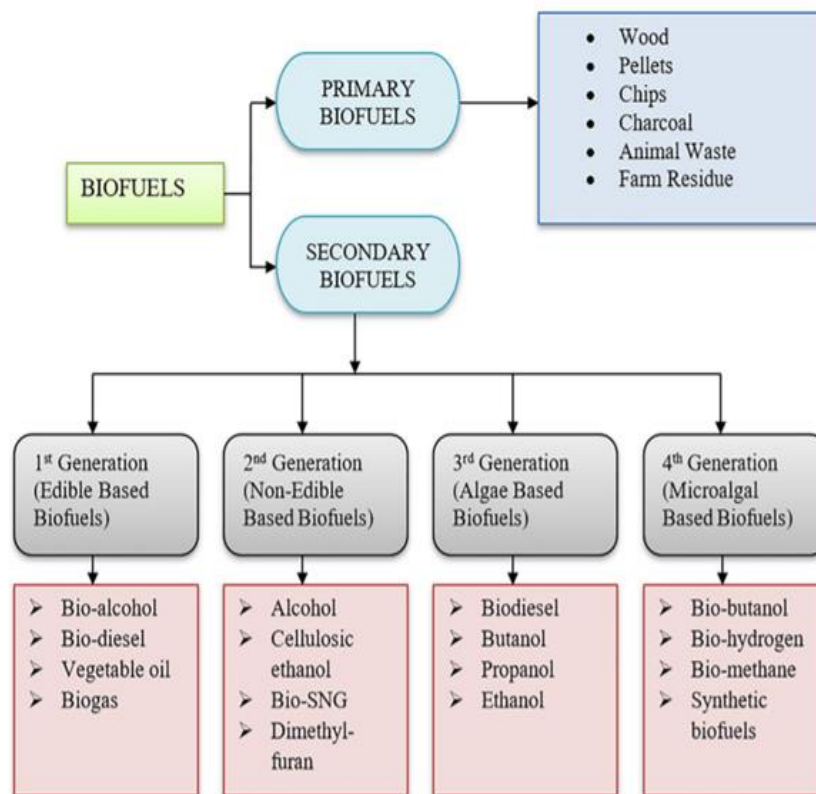
- Το βιοντίζελ που παράγεται από τα φυτικά και ζωικά λίπη και αποτελεί ένα άριστο υποκατάστατο του συμβατικού ντίζελ και μπορεί να χρησιμοποιηθεί αυτούσιο ή και σε συνδυασμό με το συμβατικό στους ήδη υπάρχοντες πετρελαιοκινητήρες [17].
- Η βιοιθανόλη που παράγεται από σακχαρούχα, κυτταρινούχα και αμυλούχα φυτά και μπορεί και αυτή να χρησιμοποιηθεί σε μίγματα με τη βενζίνη [17 , 21].
- Το βιοαέριο που παράγεται από τα οργανικά αγροτοβιομηχανικά και άλλα απόβλητα και υπολείμματα και από ενεργειακά φυτά, όπως τα φύκη, τα μικροφύκη και τα φύκια [24].
- Οι πέλλετς (pellets) και οι μπρικέτες (briquettes) που παράγονται από υπολείμματα γεωργικών καλλιεργειών (γεωργική βιομάζα) και υπολείμματα καλλιέργειας των δασών και επεξεργασίας του ξύλου (δασική βιομάζα) [17 , 21].

Τα βιοκαύσιμα εμφανίζουν και κάποια μειονεκτήματα, όπως το ότι είναι πιο ακριβά συγκριτικά με τα συμβατικά, παρουσιάζοντας υψηλότερο αρχικό κόστος παραγωγής, ότι η παραγωγή τους απαιτεί μεγάλα ποσά ενέργειας, αλλά και τυχόν ανησυχίες ότι η αυξημένη ζήτηση τους θα αυξήσει το κόστος των γεωργικών και ξυλωδών προϊόντων και ότι η συνεχής ζήτηση για ξύλο θα οδηγήσει στην αποψίλωση των δέντρων. Παρά τα παραπάνω μειονεκτήματα, τα βιοκαύσιμα αποτελούν μια βιώσιμη και οικονομικά προσιτή επιλογή ενεργειακού πόρου που μπορεί να αντικαταστήσει τα ορυκτά καύσιμα και να σώσει την ανθρωπότητα από την επικείμενη περιβαλλοντική καταστροφή, επιτυγχάνοντας την μείωση του CO<sub>2</sub> και τον μετριασμό του άνθρακα [23 , 25].

### 3.2 ΚΑΤΗΓΟΡΙΕΣ ΒΙΟΚΑΥΣΙΜΩΝ

Τα βιοκαύσιμα κατατάσσονται σε 4 κατηγορίες, πρώτης, δεύτερης, τρίτης και τέταρτης γενιάς με βάση τις πηγές που προέρχονται για την παραγωγή τους, όπως παρουσιάζονται στην παρακάτω εικόνα (Σχήμα 4) [17].





Σχήμα 4: Τα είδη Βιοκαυσίμων και οι γενιές τους.

### 3.2.1 ΒΙΟΚΑΥΣΙΜΑ 1ΗΣ ΓΕΝΙΑΣ

Τα βιοκαύσιμα πρώτης γενιάς παράγονται χρησιμοποιώντας ως πρώτη ύλη, άμυλο, ζάχαρη ή φυτικά και ζωικά έλαια [22]. Για την παραγωγή των βιοκαυσίμων πρώτης γενιάς, οι πιο κοινές βρώσιμες πρώτες ύλες είναι το σογιέλαιο, το κραμβέλαιο, το φοινικέλαιο, το ηλιέλαιο, το καλαμπόκι, το ζαχαροκάλαμο, τα ζαχαρότευτλα και το σιτάρι. Η πρώτη ύλη μετατρέπεται μέσω ζύμωσης σε βιοκαύσιμο και το τελικό προϊόν οδηγείται προς απόσταση για να απομακρυνθούν τυχόν ακαθαρσίες από τα βιοκαύσιμα. Τα βιοκαύσιμα που έχουν πρώτες ύλες με βάση το άμυλο πριν την ζύμωση απαιτούν μια προκατεργασία καθώς έχουν δομή πολυμερούς μακράς αλυσίδας γλυκόζης και για να εξασφαλιστεί η επιτυχής μετατροπή σε βιοκαύσιμα πρέπει να αναλυθούν σε μικρότερη αλυσίδα. Η διαδικασία παραγωγής βιοκαυσίμων μπορεί να έχει και αρνητικές επιπτώσεις στο περιβάλλον και για αυτό είναι σημαντικό να κατανοήσουμε την αξιολόγηση κύκλου ζωής (ΑΚΖ) της παραγωγής βιοκαυσίμων για να εκτιμήσουμε τις περιβαλλοντικές επιπτώσεις. Τα πιο κοινά βιοκαύσιμα 1<sup>ης</sup> γενιάς είναι το βιοντίζελ και η βιοαιθανόλη. Η χρήση αυτών των πρώτων υλών έχει κερδίσει βιομηχανικό έδαφος λόγω του χαμηλού κόστους παραγωγής και της καλής αναλογίας κόστους/ απόδοσης, όμως υπάρχουν ανησυχίες σχετικά με τη χρήση καλλιεργειών τροφίμων, καθώς η περιορισμένη έκταση καλλιεργήσιμης γης και η εκτενής χρήση τους μπορεί να οδηγήσει σε εκτίναξη των τιμών τους [20]. Τα βιοκαύσιμα αυτής της γενιάς δημιουργούν μεγαλύτερο αποτύπωμα άνθρακα συγκριτικά με των άλλων γενιών και εμφανίζουν και άλλα μειονεκτήματα-πιθανές επιπτώσεις όπως είναι η αποψίλωση των δασών, η εκμετάλλευση των φυσικών οικοσυστημάτων, η καύση θάμνων και οι αυξήσεις στις τιμές των βρώσιμων ελαίων που χρησιμοποιούνται για το βιοντίζελ [26].

### 3.2.2 ΒΙΟΚΑΥΣΙΜΑ 2ΗΣ ΓΕΝΙΑΣ

Τα βιοκαύσιμα 2<sup>ης</sup> γενιάς ή αλλιώς προηγμένα καύσιμα παράγονται από κυτταρίνη ή υδατανθρακική βιομάζα από εναλλακτικές μη βρώσιμες πρώτες ύλες όπως άχυρο σίτου και ξύλο, απορρίμματα φυτικών ελαίων, οργανικά απόβλητα, μη εδώδιμες καλλιέργειες και πηγές βιομάζας [20 , 22]. Η ανάπτυξη αυτής της γενιάς βιοκαυσίμων έγινε προκειμένου να ξεπεραστούν τα μειονεκτήματα των καυσίμων πρώτης γενιάς, αφού πλέον δεν χρησιμοποιούνται εδώδιμες πρώτες ύλες και μπορούν να παρέχουν μεγαλύτερο μέρος προμήθειας καυσίμου με πιο βιώσιμο και οικονομικό τρόπο [20]. Τα βιοκαύσιμα αυτής της γενιάς είναι και πιο ανταγωνιστικά όσον αφορά το κόστος συγκριτικά με τα συμβατικά ορυκτά καύσιμα. Για τις λιγνοκυτταρινικές βιομάζες πριν από την μετατροπή τους απαιτείται προεπεξεργασία που διακρίνεται σε 4 διαδικασίες, την φυσική, την βιολογική, την χημική και συνδυαστική. Εκτός από αυτές τις διαδικασίες για τη μετατροπή σε αιθανόλη πραγματοποιούνται και οι διαδικασίες υδρόλυσης, ζύμωσης και απόσταξης [27].

### 3.2.3 ΒΙΟΚΑΥΣΙΜΑ 3ΗΣ ΓΕΝΙΑΣ

Τα βιοκαύσιμα 3<sup>ης</sup> γενιάς ή αλλιώς προηγμένα βιοκαύσιμα βασίζονται σε βελτιώσεις σχετικά με την παραγωγή βιομάζας, εκμεταλλεύοντας ως πηγή ενέργειας τις ειδικά σχεδιασμένες ενεργειακές καλλιέργειες, όπως τα φύκη, τα οποία καλλιεργούνται ώστε να αποτελούν ταυτόχρονα χαμηλού κόστους και υψηλής παρεχόμενης ενέργειας, πρώτες ύλες. Τα φύκια αυτά χρησιμοποιούνται ως πηγή επειδή περιέχουν έλαια πλούσια σε ενέργεια [17]. Η βιομάζα των φυκών καταναλώνει το CO<sub>2</sub> από τις εκπομπές των σταθμών παραγωγής ενέργειας αξιοποιώντας το για την ανάπτυξή της και μετατρέπεται μέσω φωτοσύνθεσης σε CO<sub>2</sub>. Με την φωτοσύνθεση εκπέμπεται στην ατμόσφαιρα οξυγόνο άρα η καλλιέργεια και η χρήση των φυκών ως πρώτη ύλη για την παραγωγή βιοκαυσίμων είναι μία από τις στρατηγικές για την επίτευξη της μείωσης των εκπομπών του CO<sub>2</sub> [23]. Τα καύσιμα με βάση τα φύκη στοχεύουν στον περιορισμό των καυσίμων προηγούμενων γενιών. Τα φύκη κοστίζουν παραπάνω από άλλες καλλιέργειες βιοκαυσίμων λόγω της υψηλής επένδυσης τους και του κόστους εργασίας, παράγουν όμως 10-100 φορές περισσότερα βιοκαύσιμα, τα οποία έχουν χαμηλή απόδοση επένδυσης [17 , 21 , 28].

### 3.2.4 ΒΙΟΚΑΥΣΙΜΑ 4ΗΣ ΓΕΝΙΑΣ

Πρόκειται για βιοκαύσιμα που βρίσκονται ακόμα σε πειραματικό εργαστηριακό στάδιο και αναπτύσσονται από την γενετική ή μεταβολική τροποποίηση των φυκών, ώστε να έχουν υψηλότερη περιεκτικότητα σε έλαιο και αυξημένη ικανότητα δέσμευσης CO<sub>2</sub> [17 , 22]. Τα βιοκαύσιμα αυτά στοχεύουν στην ανάπτυξη διεργασιών παραγωγής βιοκαυσίμων αρνητικού άνθρακα με γεω-αποθήκευση CO<sub>2</sub> και βασίζονται στη χρήση προηγμένης τεχνολογίας για τη μετατροπή του φυτικού ελαίου και του βιοντίζελ σε βιοβενζίνη [21]. Η παροχή ενέργειας στα βιοκαύσιμα 4<sup>ης</sup> γενιάς προέρχεται από μικροφύκη, μακροφύκη και κυανοβακτήρια [17 , 23].

## 3.3 ΠΡΩΤΕΣ ΥΛΕΣ ΓΙΑ ΤΗΝ ΠΑΡΑΓΩΓΗ ΒΙΟΚΑΥΣΙΜΩΝ

Τα βιοκαύσιμα πρώτης γενιάς ή αλλιώς συμβατικά βιοκαύσιμα παράγονται από εδώδιμες καλλιέργειες όπως σιτάρι, δημητριακά, ζαχαροκάλαμο, τεύτλα, ξύλο, καλαμπόκι, φοινικέλαιο, σόγια κ.λ.π.

Τα βιοκαύσιμα 2<sup>ης</sup> , 3<sup>ης</sup> και 4<sup>ης</sup> γενιάς συγκαταλέγονται στα προηγμένα βιοκαύσιμα. Τα βιοκαύσιμα 2<sup>ης</sup> γενιάς μπορούν να παραχθούν από μη βρώσιμες πρώτες ύλες, όπως απόβλητα από μαγειρικά έλαια από ζωικά λίπη, λιγνοκυτταρινική βιομάζα, όπως ξύλο, γρασίδι, γεωργικά και δασικά υπολείμματα. Για τα βιοκαύσιμα 3<sup>ης</sup> γενιάς ως πρώτη ύλη χρησιμοποιούνται τα φύκη, ενώ άλλες πρώτες ύλες αποτελούν και η μαγιά, οι μύκητες και τα κυανοβακτήρια. Τέλος τα βιοκαύσιμα 4<sup>ης</sup> γενιάς παράγονται χρησιμοποιώντας ως πρώτη ύλη γενετικά ή μεταβολικά τροποποιημένα φύκη.

Τα βιοκαύσιμα, λοιπόν όπως έχει ήδη αναφερθεί έχουν τη δυνατότητα υποκαταστήσουν τα ορυκτά καύσιμα μεταφοράς, αφού μπορούν να παρέχουν άνθρακα, ο οποίο προέρχεται από ανανεώσιμες πηγές [17].

## 4 ΒΙΟΑΙΘΑΝΟΛΗ

### 4.1 ΕΙΣΑΓΩΓΗ

Η χρήση της αιθανόλης ως αλκοόλ από την αρχαιότητα και αργότερα τον 20<sup>ο</sup> αιώνα ως καύσιμο έχει προκαλέσει ένα ευρύτερο ενδιαφέρον όσον αφορά την παραγωγή της, ιδιαίτερος από τότε που έγιναν γνωστές οι μεγάλες προοπτικές της σε διάφορους τομείς που περιλαμβάνουν την καλή βιοδιασπασιμότητα της, τη μείωση του διοξειδίου του άνθρακα, του μονοξειδίου του άνθρακα και την μείωση της εκπομπής σωματιδίων.

Η παραγωγή βιοαιθανόλης από ανανεώσιμες πηγές και τα πλεονεκτήματα για πιο πράσινες εναλλακτικές λύσεις έχουν οδηγήσει τους επιστήμονες σε όλο τον κόσμο για την ανάπτυξη τεχνολογιών για την επίτευξη υψηλότερης μετατροπής βιομάζας και, κατά συνέπεια, υψηλότερη απόδοση και καθαρότητα βιομηχανικού επιπέδου. Με αυτόν τον τρόπο, η παραγωγή βιοαιθανόλης μπορεί να μειώσει την κατανάλωση αργού πετρελαίου. Η παγκόσμια παραγωγή αιθανόλης αυξήθηκε σε σχεδόν 41.000 εκατομμύρια γαλιόνια, σύμφωνα με τις πρόσφατες ενημερώσεις της αγοράς. Κάποιες πρόσφατες εξελίξεις στον τομέα των τεχνολογιών, όπως η χρήση γεωργικών αποβλήτων που περιέχουν πολυσακχαρίτες, ή πολυσακχαρίτες φυκιών, και γενετικούς μετασχηματισμούς για την ανάπτυξη καλλιεργειών με υψηλή περιεκτικότητα σε άνθρακα, ή για να περιέχουν κυτταρινάση στα φύλλα τους, έχουν ανοίξει νέους ορίζοντες στην παραγωγή βιοαιθανόλης [29].

Η βιομηχανία αιθανόλης χρειάστηκε σχεδόν έναν αιώνα (1920-2015) για να φτάσει στο επίπεδο ανάπτυξης που βρίσκεται σήμερα από την ίδρυσή της τη δεκαετία του 1920. Ξεκίνησε όταν τα καύσιμα που χρησιμοποιούσαν ως βάση το πετρέλαιο ακρίβυναν και οι περιβαλλοντικοί κίνδυνοι λόγω της μολυβδούχου βενζίνης δημιούργησαν την ανάγκη για ένα καύσιμο με βάση το οκτάνιο.

Αρχικά, το καλαμπόκι ήταν η μόνη πρώτη ύλη που χρησιμοποιούνταν για την παραγωγή αιθανόλης λόγω της μεγάλης διαθεσιμότητάς του και της ευκολίας μετατροπής του σε αλκοόλη [30]. Η ανακάλυψη ότι τα αναμειγμένα με αιθανόλη καύσιμα προκαλούν σημαντική μείωση των εκπομπών μονοξειδίου του άνθρακα, και έτσι αποτελούν μια πιο φιλική προς το περιβάλλον εναλλακτική, οδήγησε στην αυξημένη παραγωγή αυτού του καυσίμου κατά τη δεκαετία του 1990. Η βιοαιθανόλη δεν αποτελεί λοιπόν μια νέα πηγή ενέργειας δεδομένου ότι έχει χρησιμοποιηθεί εκτενώς στην Ευρώπη και τις Ηνωμένες Πολιτείες στις αρχές του 1900, αλλά αγνοήθηκε λόγω του υψηλού κόστους παραγωγής της σε σύγκριση με τη βενζίνη. Η πρώτη χρήση αιθανόλης καταγράφηκε από τον Nicolaus Otto για την τροφοδοσία μιας τεσσάρων κύκλων μηχανής εσωτερικής καύσης, το 1826, και το 1876 [30, 31]. Οι παρατηρήσεις αυτές οδήγησαν στον πρώτο κινητήρα με μείγμα αιθανόλης, ο οποίος τροφοδοτούσε με καύσιμα το Model T Henry Ford το 1908. Η χρήση αιθανόλης αναμειγμένης με βενζίνη άρχισε κατά τη διάρκεια των δεκαετιών του 1920 και 1930, και η ζήτηση κορυφώθηκε κατά τη διάρκεια του Β' Παγκοσμίου Πολέμου λόγω των ελλείψεων σε καύσιμα [32, 33, 34]. Το 1933, ένας Αμερικανός έμπορος πετρελαίου, Earl Coryell, άρχισε να προμηθεύει βενζίνη καλαμποκιού-αλκοόλης στο βενζινάδικό του στο Λίνκολν. Σε αυτή τη φάση τα καύσιμα αυτά ονομάζονταν ευρέως "gasohol", ένας όρος που υποδήλωνε ένα μείγμα από 10% αλκοόλη με βάση το καλαμπόκι (αιθανόλη) και 90% βενζίνη [29, 35].

Η παγκόσμια παραγωγή αιθανόλης το 1998 ήταν 33.3 δισεκατομμύρια λίτρα και η Βραζιλία ήταν ο μεγαλύτερος παραγωγός αλκοόλ με παραγωγή 16.1 δισεκατομμυρίων λίτρων το 1998 [32]. Τα κυτταρινούχα υλικά ήταν η κύρια πρώτη ύλη που χρησιμοποιήθηκε. Τον 20<sup>ο</sup> αιώνα δόθηκε μεγαλύτερη έμφαση στην ανάπτυξη της διύλισης πετρελαίου, άνθρακα και φυσικού αερίου από φθηνά διαθέσιμα ορυκτά καύσιμα και σύμφωνα με το Energy Information Administration, τα ορυκτά καύσιμα αντιπροσώπευαν σχεδόν το 87% της

κατανάλωσης πρωτογενούς ενέργειας στον κόσμο το 2007, αλλά από οικονομικής, οικολογικής και περιβαλλοντικής άποψη, τα ορυκτά καύσιμα δεν θεωρούνται βιώσιμοι πόροι [29]. Η καύση ορυκτών καυσίμων αυξάνει σημαντικά το επίπεδο του ατμοσφαιρικού CO<sub>2</sub>, η οποία συνδέεται άμεσα με την αύξηση της παγκόσμιας θέρμανσης. Όπως παρατηρήθηκε από το National Oceanic and Atmospheric Administration (NOAA, USA) το 2012, η μέση ετήσια συγκέντρωση CO<sub>2</sub> ήταν 392.82 ppm σε σύγκριση με την τιμή της προβιομηχανικής εποχής που άγγιζε τα 280 ppm. Ως εκ τούτου, η αναζήτηση και η ανάπτυξη βιώσιμων, οικονομικών, οικολογικών και φιλικών προς το περιβάλλον πηγών καυσίμων αποτελεί ένα πρωταρχικό θέμα της έρευνας σε αυτόν τον αιώνα. Τα βιοκαύσιμα που παράγονται από αυτές τις ανανεώσιμες πηγές χρησιμοποιούνται για την ελαχιστοποίηση της καύσης ορυκτών καυσίμων και της παραγωγής CO<sub>2</sub>. Η βιομάζα όπως τα φυτά ή τα οργανικά απόβλητα μπορούν να χρησιμοποιηθούν ως πηγή ή πρώτη ύλη για τη μείωση της παγκόσμιας παραγωγής CO<sub>2</sub> [36]. Η αιθανόλη έχει υψηλότερη περιεκτικότητα σε οξυγόνο, η οποία προάγει την καλύτερη καύση, χαμηλότερες εκπομπές καυσαερίων και υψηλότερο αριθμό οκτανίων, πράγμα το οποίο επιτρέπει στους κινητήρες να λειτουργούν με υψηλότερο ρυθμό συμπίεσης. Επίσης, η χρήση φυτικής βιομάζας ως πρώτη ύλη για την παραγωγή βιοαιθανόλης επιτρέπει την ανακύκλωση του CO<sub>2</sub> που απελευθερώνεται κατά την καύση, μειώνοντας τις εκπομπές του [36]. Για τη μετατροπή της βιομάζας σε βιοκαύσιμα, ένα σύστημα γνωστό ως βιοδιυλιστήριο, είναι απαραίτητο. Η βιοδιύλιση περιλαμβάνει 3 φάσεις [37, 29]. Στην φάση 1 περιλαμβάνονται δυνατότητες επεξεργασίας χρησιμοποιώντας ως τροφοδοσία, δημητριακά. Στην φάση 2 περιλαμβάνεται η διαδικασία υγρής άλεσης με πρώτη ύλη τα δημητριακά και τα βασικά προϊόντα που παράγονται είναι το άμυλο, το πλούσιο σε φρουκτόζη σιρόπι καλαμποκιού (HFCS), η αιθανόλη και το καλαμποκέλαιο. Η φάση 3 χρησιμοποιεί ένα μείγμα των γεωργικών πρώτων υλών και παράγει διάφορους τύπους προϊόντων (κυρίως σακχάρων) με τη χρήση διαφόρων μεθόδων επεξεργασίας. Πλέον οι Ηνωμένες Πολιτείες αποτελούν τον μεγαλύτερο παραγωγό αιθανόλης στον κόσμο παράγοντας σχεδόν τα διπλάσια ποσά αιθανόλης συγκριτικά με την Βραζιλία, τον δεύτερο παγκοσμίων παραγωγό. Οι κύριες πρώτες ύλες που χρησιμοποιούνται για τη παραγωγή βιοκαυσίμων 2<sup>ης</sup> γενιάς είναι η βαγάσα ζαχαροκάλαμου, τα φύλλα, τους μίσχους και τα στάχυα των καλαμποκιών, το καλαμπόκι, τα δασικά υπολείμματα, το αναποφλοίωτο ρύζι, το γλυκό σόργο, το σιτάρι, τα ζαχαρότευτλα και τα φύκη. Οι πλέον προτιμώμενες πρώτες ύλες προέρχονται από γεωργικές πηγές ή υπολείμματα και μεταξύ αυτών το καλαμπόκι μαζί με τα υπολείμματα του. Παρόλο που τα φύκια θεωρητικά έδειξαν τις μεγαλύτερες δυνατότητες και προοπτικές για την παραγωγή βιοκαυσίμων, η πρόοδος της διαδικασίας δεν έχει ακόμη γίνει για τη μετατροπή της σε μια κερδοφόρα επιχείρηση [29].

#### 4.2 ΙΔΙΟΤΗΤΕΣ ΒΙΟΑΙΘΑΝΟΛΗΣ

Η αιθανόλη (EtOH ή αιθυλική αλκοόλη) έχει μοριακό τύπο CH<sub>3</sub>CH<sub>2</sub>OH (C<sub>2</sub>H<sub>6</sub>O), μοριακό βάρος 46.07 g/mol και είναι ένα ελκυστικό εναλλακτικό καύσιμο, διότι είναι ανανεώσιμος πόρος βιολογικής προέλευσης και οξυγονώνεται, παρέχοντας έτσι τη δυνατότητα μείωσης των εκπομπών σωματιδίων σε κινητήρες ανάφλεξης με συμπίεση [22]. Αποτελεί ένα πτητικό, διαφανές και ευδιάλυτο στο νερό υγρό, καθώς επίσης και σημαντικός διαλύτης [38]. Συγκριτικά με τη βενζίνη έχει ευρύτερα όρια ευφλεκτότητας, υψηλότερο αριθμό οκτανίων, υψηλότερες θερμότητες εξάτμισης και ταχύτητες φλόγας. Χάρη σε αυτές τις ιδιότητες επιτρέπει την υψηλότερη αναλογία συμπίεσης, την μείωση του απαιτούμενου χρόνου καύσης και οδηγεί θεωρητικά σε μεγαλύτερες αποδόσεις. Παρουσιάζει όμως σημαντικά μειονεκτήματα που έχουν να κάνουν με τη χαμηλότερη ενεργειακή της πυκνότητα από τη βενζίνη, τη διαβρωτικότητα της, τη χαμηλότερη πίεση ατμών (καθιστώντας δύσκολες τις κρύες εκκινήσεις), την αναμειξιμότητα με το νερό και την τοξικότητα στα οικοσυστήματα, την αύξηση των εκπομπών καυσαερίων ακεταλδεΐδης και την αύξηση της τάσης όταν αναμειγνύεται με βενζίνη. Βραχυπρόθεσμα, η παραγωγή βιοαιθανόλης ως καυσίμου

οχημάτων εξαρτάται σχεδόν εξ ολοκλήρου από το άμυλο και τα σάκχαρα από τις υπάρχουσες καλλιέργειες τροφίμων. Ένα ακόμα σημαντικό πρόβλημα με την παραγωγή βιοαιθανόλης είναι η διαθεσιμότητα πρώτων υλών για την παραγωγή. Η διαθεσιμότητα των πρώτων υλών για τη βιοαιθανόλη μπορεί να ποικίλει σημαντικά από εποχή σε εποχή και εξαρτάται από γεωγραφικές τοποθεσίες. Η τιμή των πρώτων υλών, που αντιπροσωπεύει το 60 – 75% του συνολικού κόστους παραγωγής βιοαιθανόλης, είναι επίσης εξαιρετικά ασταθής, γεγονός που μπορεί να επηρεάσει σε μεγάλο βαθμό το κόστος παραγωγής της [22]. Αναμιγνύεται με το νερό σε κάθε αναλογία και κατά την ανάμειξη τους παρατηρείται ελάττωση όγκου, ενώ εκλύεται θερμότητα. Μίγμα 95% αλκοόλης και 5% νερού χαρακτηρίζεται ως αζεοτροπικό, επειδή κατά την απόσταξη τους δεν διαχωρίζονται τα συστατικά τους, καθώς έχουν παρόμοια θερμοκρασία ζέσεως. Η καθαρή αιθανόλη έχει πυκνότητα 0.789 g/mL και σημείο βρασμού 78.5°C και σημείο τήξης στους -117 °C. Είναι ουσία που δεν επιφέρει κανένα κίνδυνο για την ανθρώπινη υγεία. Είναι ουσία που μπορεί να αναφλεγεί σε θερμοκρασία περιβάλλοντος με σημείο ανάφλεξης 13.85 °C και μπορεί να χρησιμοποιηθεί ως εναλλακτικό καύσιμο, ως προσθετικό καυσίμου ή ακόμη ως πρώτη ύλη για την παραγωγή ETBE (αιθυλοτριτοταγής βουτυλ-αιθέρας), που αποτελεί βελτιωτικό της βενζίνης για την αύξηση του αριθμού των οκτανίων. Στην Ελλάδα η βιοαιθανόλη μπορεί να παραχθεί από σιτηρά, αραβόσιτο, ζαχαρότευτλα και γλυκό σόργο [38].

#### 4.3 ΧΡΗΣΕΙΣ ΑΙΘΑΝΟΛΗΣ

Η αιθανόλη αποτελεί την ουσία του κρασιού και το μεθυστικό συστατικό πολλών ποτών, καθώς και μία από τις σημαντικότερες χημικές ουσίες που διαθέτει η βιομηχανία. Η διαλυτική ικανότητα της αιθανόλης την καθιστά ιδιαίτερα χρήσιμη για την εκχύλιση πολύτιμων φυσικών προϊόντων από φυτικούς και ζωικούς ιστούς. Ως βιομηχανική πρώτη ύλη, η αιθανόλη συμμετέχει στην παρασκευή:

- συγκολλητικών
- προϊόντων υγιεινής
- απορρυπαντικών
- εκρηκτικών
- μελανιών
- χημικών
- κρεμών χεριών
- πλαστικών
- χρωμάτων
- διαλυτικών
- κλωστοϋφαντουργικών προϊόντων
- ξυδιού και άλλων

Δύο τύποι αιθανόλης παράγονται παγκοσμίως, η ζυμωμένη και η συνθετική αιθανόλη. Η αιθανόλη που έχει υποστεί ζύμωση (βιοαιθανόλη) παράγεται από καλαμπόκι ή άλλο υλικό βιομάζας και χρησιμοποιείται κυρίως για καύσιμα, αν και ένα μικρό μέρος της χρησιμοποιείται από τη βιομηχανία ποτών. Η συνθετική αιθανόλη παράγεται από το αιθυλένιο, ένα υποπροϊόν του πετρελαίου και χρησιμοποιείται κυρίως σε βιομηχανικές εφαρμογές. Ως αλκοόλη εφαρμόζεται ευρέως σε τρόφιμα, φαρμακευτικά προϊόντα, καλλυντικά και άλλες βιομηχανικές εφαρμογές.

Υπάρχουν διάφοροι τύποι αιθανόλης, ανάλογα με την καθαρότητα της, αλλά δεν είναι όλοι κατάλληλοι για όλες τις εργασίες. Διακρίνονται σε:

- Αιθανόλη 95% (95.6%): Αυτή είναι η υψηλότερη συγκέντρωση αιθανόλης που μπορεί να ληφθεί μέσω απόσταξης. Η 95.6% αιθανόλη είναι αζεοτροπική, δηλαδή η φάση ατμού έχει την ίδια αναλογία αιθανόλης: νερού με την υγρή φάση. Αυτή η αλκοόλη μπορεί να

παραχθεί είτε συνθετικά στο εργαστήριο από μια ποικιλία αρχικών υλικών είτε με τη διαδικασία ζύμωσης διαφόρων βιομαζών. Η ποιότητα αυτής της αλκοόλης θεωρείται συμβατή με τις βιομηχανίες τροφίμων και θα μπορούσε να χρησιμοποιηθεί σε αρώματα, γλυκά, προϊόντα προσωπικής φροντίδας και ως φορέας για ένα ευρύ φάσμα φαρμάκων, όπως αυτά για τον βήχα, αποσυμφορητικά και διαλύματα ιωδίου.

- Καθαρή αιθανόλη (99-100%): Ορισμένα πειράματα είναι ευαίσθητα στο νερό, επομένως απαιτείται πολύ υψηλής καθαρότητας αιθανόλης. Μια κοινή μέθοδος για την παραγωγή αιθανόλης με συγκέντρωση μεγαλύτερη από 95% είναι η χρήση προσθέτων, όπως τολουόλιο, επτάνιο, κυκλοεξάνιο και 2-βουτανόνη, τα οποία διαταράσσουν τη σύνθεση του αζεότροπου και επιτρέπουν την περαιτέρω απόσταξη. Για το λόγο αυτό, η απόλυτη αιθανόλη περιέχει ίχνη αυτών των προσθέτων. Επειδή η αιθανόλη είναι υγροσκοπική, το νερό μπορεί εύκολα να απορροφηθεί από την αιθανόλη, επομένως η καθαρή αιθανόλη πρέπει είτε να παρασκευάζεται και να χρησιμοποιείται σε σύντομο χρονικό διάστημα είτε να διατηρείται πάνω από μέταλλο μαγνησίου και να αποστάζεται όταν χρειάζεται [39]. Η καθαρή αλκοόλη δεν προορίζεται για ανθρώπινη κατανάλωση, αλλά χρησιμοποιείται ως διαλύτης για εργαστηριακές και βιομηχανικές εφαρμογές, όπου το νερό αντιδρά με άλλες χημικές ουσίες, και ως καύσιμο [38].
- Μόνο ένα πολύ μικρό ποσοστό του συνόλου της αιθυλικής αλκοόλης που παράγεται για βιομηχανικούς σκοπούς πωλείται ως καθαρή αιθυλική αλκοόλη. Οι απολυμαντικές ιδιότητες, η ισχύς του διαλύτη και η υψηλή καθαρότητα καθιστούν την καθαρή αιθυλική αλκοόλη το αντιδραστήριο επιλογής για πολλές κλινικές και εργαστηριακές εφαρμογές.
- Μετουσιωμένη αιθανόλη: Η ειδικά μετουσιωμένη αλκοόλη είναι ανθυγιεινή για ανθρώπινη κατανάλωση με την προσθήκη μιας ή περισσότερων χημικών ουσιών και αποτελεί τον μεγαλύτερο και πιο ευρέως χρησιμοποιούμενο τύπο αλκοόλης. Η μετουσιωμένη αιθανόλη (είτε 95% είτε απόλυτη) περιέχει χημικές ουσίες, όπως μεθανόλη και ισοπροπανόλη, και επομένως δεν είναι ασφαλής για πόση. Συνήθως είναι φθηνότερη από την καθαρή αιθανόλη γιατί αποφεύγεται η καταβολή υψηλής φορολογίας και χρησιμοποιείται συχνά ως καθαριστικό και απολυμαντικό. Η μετουσιωμένη αιθανόλη είναι αποτελεσματικό απολυμαντικό σε συγκεντρώσεις μεταξύ 70 και 90%. Η υδατική αιθανόλη είναι αποτελεσματικότερη στην μετουσίωση πρωτεϊνών από την απόλυτη αιθανόλη. Η μετουσιωμένη αιθανόλη χρησιμοποιείται συνήθως στις βιομηχανίες αρωμάτων και σε προϊόντα προσωπικής φροντίδας που περιλαμβάνουν αποσμητικά, παρασκευάσματα για τα μαλλιά και το τριχωτό μέρος της κεφαλής, στοματικά διαλύματα, λοσιόν, κρέμες, σαπούνια και παρασκευάσματα μπάνιου και λοσιόν για πλύσιμο χεριών χωρίς νερό. Χρησιμοποιείται επίσης ευρέως ως διαλύτες στην παρασκευή αντιβιοτικών, χαπιών, εμβολίων και βιταμινών.

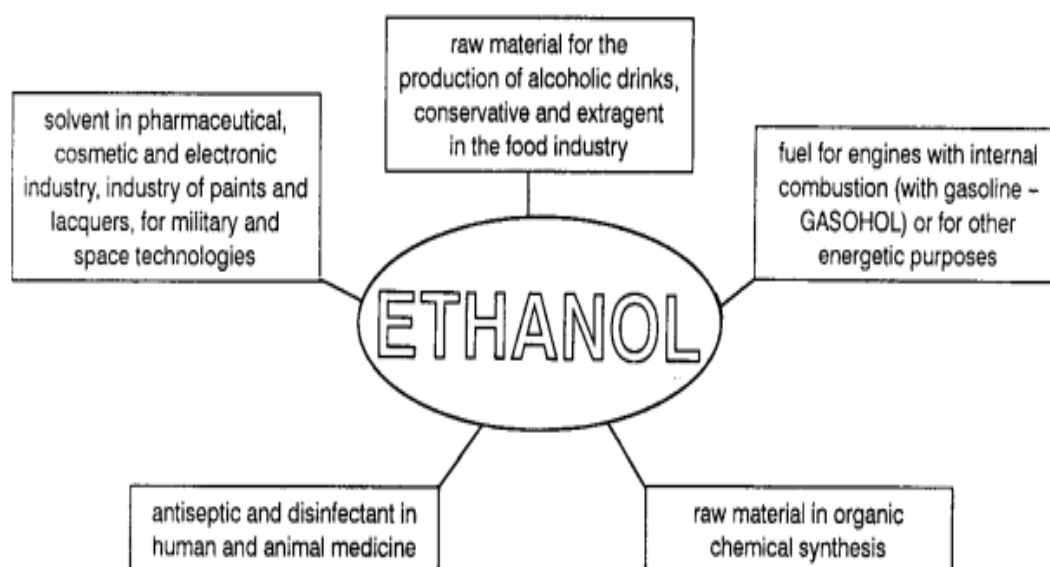
Συγκεκριμένα η αιθυλική αλκοόλη βρίσκει εφαρμογές στα:

1. Προϊόντα προσωπικής φροντίδας: Η αιθανόλη αποτελεί κοινό συστατικό σε πολλά καλλυντικά και προϊόντα ομορφιάς και έχει ρόλο στυπτικό για να βοηθήσει στο καθαρισμό του δέρματος, σε λοσιόν ως συντηρητικό και για να διασφαλίσει ότι τα συστατικά της λοσιόν δεν διαχωρίζονται και σε προϊόντα που ψεκάζονται στα μαλλιά, για να βοηθήσουν το σπρέι να κολλήσει στα μαλλιά.
2. Απολυμαντικά προϊόντα: Η αιθανόλη είναι αποτελεσματική στη θανάτωση μικροοργανισμών όπως βακτηρίων, μυκήτων και ιών και αποτελεί ένα κοινό συστατικό σε πολλά απολυμαντικά χεριών [40, 42].
3. Προϊόντα οικιακής χρήσης: Η αιθανόλη αναμιγνύεται εύκολα με νερό και πολλές οργανικές ενώσεις και αποτελεί αποτελεσματικό διαλύτη για χρήση σε χρώματα και βερνίκια, καθώς και σε προϊόντα προσωπικής φροντίδας και οικιακού καθαρισμού. Ως πρόσθετο στα προϊόντα καθαρισμού, η αιθανόλη χρησιμοποιείται και ως συντηρητικό

επειδή είναι αποτελεσματική στην εξάλειψη οργανισμών που θα μπορούσαν να προκαλέσουν κίνδυνο για τους καταναλωτές [40].

4. Πρόσθετα τροφίμων: Ως πρόσθετο τροφίμων, η αιθανόλη μπορεί να βοηθήσει στην ομοιόμορφη κατανομή του χρωματισμού των τροφίμων, καθώς και στην ενίσχυση της γεύσης των εκχυλισμάτων τροφίμων. Για παράδειγμα, το εκχύλισμα βανίλιας, ένα κοινό αρωματικό φαγητού, παρασκευάζεται με σκλήρυνση και επεξεργασία των κόκκων βανίλιας σε διάλυμα αιθανόλης και νερού. Επομένως, το καθαρό εκχύλισμα βανίλιας πρέπει να περιέχει τουλάχιστον 35% αλκοόλ. Ο Οργανισμός Τροφίμων και Φαρμάκων των ΗΠΑ (FDA) επιτρέπει τη ονομασία της βανίλιας ως εκχύλισμα μόνο όταν είναι με βάση το αλκοόλ ή την αιθανόλη [41].
5. Οινοπνευματώδη ποτά: Αναλόγως με την πηγή σακχάρων που χρησιμοποιείται και τον μικροοργανισμό που συμμετέχει στη ζύμωση λαμβάνονται τα είδη των αλκοολούχων ποτών. Στο κρασί η πηγή σακχάρων είναι τα σταφύλια, ενώ στη μπίρα το κριθάρι. Με απόσταξη της αιθανόλης που παράγεται από τη ζύμωση, προκύπτουν τα διάφορα είδη αποσταγμάτων (π.χ. τσίπουρο, ρακί) [43].
6. Καύσιμα: Στις ΗΠΑ το περισσότερο από το 97% της βενζίνης περιέχει αιθανόλη, συνήθως σε ένα μείγμα το οποίο ονομάζεται E10, που υποδηλώνει την περιεκτικότητα 10% σε αιθανόλη και 90% σε βενζίνη, για να οξυγονώσει το καύσιμο και να μειώσει την ατμοσφαιρική ρύπανση. Η αιθανόλη έχει υψηλότερο αριθμό οκτανίων από τη βενζίνη, παρέχοντας επίσης εξαιρετικές ιδιότητες ανάμειξης. Οι ελάχιστες απαιτήσεις αριθμού οκτανίων αποτρέπουν το χτύπημα του κινητήρα και διατηρούν την απόδοση της μηχανής σε υψηλά επίπεδα.

Στο Σχήμα 5 παρουσιάζονται συνοπτικά οι εφαρμογές της αιθανόλης:



Σχήμα 5: Συνοπτικό Διάγραμμα εφαρμογών αιθανόλης [42].

#### 4.4 ΒΙΟΑΙΘΑΝΟΛΗ ΩΣ ΚΑΥΣΙΜΟ

Όπως φαίνεται υπάρχουν διάφορες χρήσεις της βιοαιθανόλης. Όταν, όμως, πρόκειται για την χρήση της σαν καύσιμο, πέραν των πλεονεκτημάτων της, συνοδεύεται και με τα μειονέκτημα της χρήσης της, τα οποία και πρέπει να λαμβάνονται υπόψιν.

Η βιοαιθανόλη πλεονεκτεί των καυσίμων που έχουν ως βάση το πετρέλαιο, γιατί προέρχεται από ανανεώσιμες καλλιέργειες και όχι από ένα εξαντλήσιμο πόρο, και οι



καλλιέργειες από όπου προέρχεται μπορούν να αυξηθούν (όπως τα δημητριακά, ζαχαρότευτλα και αραβόσιτο). Η ανάμειξη της με βενζίνη, μπορεί συμβάλλει στην παράταση της ζωής των αποθεμάτων πετρελαίου και θα εξασφαλισθεί μεγαλύτερη παγκόσμια ασφάλεια, αφού έτσι επιτυγχάνεται η μείωση της εξάρτησης από εισαγόμενα καύσιμα και βελτίωση του εμπορικού ισοζυγίου, η εξασφάλιση του ενεργειακού εφοδιασμού και η εξοικονόμηση του συναλλάγματος. Επίσης, με την ενθάρρυνση εναλλακτικών καλλιεργητικών λύσεων, όπως είναι η χρήση της βιοαιθανόλης, θα επέλθει μείωση των περιφερειακών ανισοτήτων με την ενδυνάμωση του γεωργικού χώρου και συνεπώς αύξηση του αγροτικού εισοδήματος. Ένα άλλο πλεονέκτημα της βιοαιθανόλης είναι η ευκολία, με την οποία μπορεί να ενσωματωθεί στο υπάρχον σύστημα μεταφοράς καυσίμων κίνησης. Θετικό επίσης είναι το ότι σε ποσότητες έως και 5%, το βιοκαύσιμο μπορεί να αναμιχθεί με συμβατικά καύσιμα, χωρίς την ανάγκη τροποποιήσεων του κινητήρα. Με τη χρήση της βιοαιθανόλης επιτυγχάνεται μείωση των εκπομπών διοξειδίου του άνθρακα κατά 60- 90% σε σχέση με τη βενζίνη. Επιπλέον, το CO<sub>2</sub> που απελευθερώνεται κατά τη διάρκεια της ζύμωσης και της καύσης, ανακυκλώνεται από τα φυτά μέσω της φωτοσύνθεσης. Περιέχει μεγαλύτερο αριθμό οκτανίων (ικανότητα αντίστασης στη συμπίεση) από τη βενζίνη, με αποτέλεσμα οι μηχανές καύσης να λειτουργούν με υψηλότερο λόγο συμπίεσης, δίνοντας καλύτερη καθαρή απόδοση και καθιστώντας την περισσότερο αποτελεσματική σαν καθαρό καύσιμο από την βενζίνη. Είναι λιγότερο τοξική, συγκριτικά με άλλα καύσιμα και είναι εύκολα βιοδιασπώμενη στο νερό και στο έδαφος, ελαττώνοντας τις καταστρεπτικές συνέπειες τυχόν διαρροών συγκριτικά με τα ορυκτά καύσιμα. Η πολύ χαμηλή συγκέντρωση του θείου στα βιοκαύσιμα συμβάλλει σημαντικά στον περιορισμό των εκπομπών του διοξειδίου του θείου που είναι υπεύθυνοι για την όξινη βροχή [33 , 35].

Πέραν των πλεονεκτημάτων του βιοκαυσίμου, υπάρχουν και ανησυχίες που πρέπει να αναλογιστούν. Μια από αυτές, είναι το γεγονός ότι η βιοαιθανόλη μπορεί να απαιτήσει τη χρήση πολύ μεγάλης έκτασης καλλιεργήσιμης γης με αποτέλεσμα την καταστροφή φυσικών οικοτύπων συμπεριλαμβανομένων και των τροπικών δασών. Ακόμη θεωρείται πιθανό λόγω των προσοδοφόρων τιμών της βιοαιθανόλης ορισμένοι αγρότες να θυσιάζουν τις καλλιέργειες τροφίμων για την παραγωγή βιοαιθανόλης με αποτέλεσμα την αύξηση των τιμών των τροφίμων για την παραγωγή βιοαιθανόλης. Επιπλέον, η εποχιακή παραγωγή της βιομάζας δυσκολεύουν την συνεχή τροφοδοσία με πρώτη ύλη των μονάδων ενεργειακής αξιοποίησης της βιομάζας. Ο αυξημένος όγκος και η μεγάλη περιεκτικότητα σε υγρασία, σε σχέση με τα ορυκτά καύσιμα δυσχεραίνουν την ενεργειακή αξιοποίηση της. Για αυτούς τους λόγους παρουσιάζονται δυσκολίες κατά τη συλλογή, μεταφορά και αποθήκευση της βιομάζας, οι οποίες τείνουν να αυξάνουν το κόστος της ενεργειακής αξιοποίησης της.

Οι σύγχρονες και βελτιωμένες τεχνολογίες μετατροπής της βιομάζας απαιτούν υψηλό κόστος εξοπλισμού, συγκρινόμενες με αυτό των συμβατικών καυσίμων. Έχει μικρή ενεργειακή απόδοση σε ογκομετρικό επίπεδο, οπότε απαιτείται μεγαλύτερη ποσότητα καυσίμου για την ίδια ενεργειακή ανάγκη. Η τιμή των πρώτων υλών και η πορεία των τιμών των συμβατικών καυσίμων κίνησης αποτελούν δύο ιδιαίτερα ασταθείς παράγοντες που δεν μπορούν να προβλεφθούν, και επηρεάζουν την ανταγωνιστικότητα της παραγωγής της σε σχέση με το κόστος [33 , 35 , 36].

#### 4.5 ΠΡΩΤΕΣ ΥΛΕΣ ΓΙΑ ΤΗΝ ΠΑΡΑΓΩΓΗ ΒΙΟΑΙΘΑΝΟΛΗΣ

Οι πρώτες ύλες από τις οποίες μπορεί να παραχθεί η αιθανόλη ταξινομούνται σε τρεις κατηγορίες γεωργικών πρώτων υλών:

- πρώτες ύλες που περιέχουν σακχαρόζη, όπως ζαχαροκάλαμα, ζαχαρότευτλα, γλυκό σόργο και φρούτα
- αμυλούχα ύλες, όπως καλαμπόκι, σιτάρι, ρύζι, πατάτες, μανιόκα, γλυκοπατάτες και κριθάρι

- λιγνοκυτταρινικά υλικά, όπως ξύλο, άχυρο και χόρτα

Επί του παρόντος, η προσοχή επικεντρώνεται στην παραγωγή βιοαιθανόλης από καλλιέργειες, όπως το καλαμπόκι, το σιτάρι, το ζαχαροκάλαμο, καθώς και από τα άφθονα γεωργικά απόβλητα. Ένα σημαντικό πρόβλημα με την παραγωγή βιοαιθανόλης είναι η διαθεσιμότητα των πρώτων υλών για την παραγωγή. Η διαθεσιμότητα των πρώτων υλών για τη βιοαιθανόλη μπορεί να διαφέρει σημαντικά από εποχή σε εποχή και εξαρτάται από τις γεωγραφικές τοποθεσίες. Για μια δεδομένη γραμμή παραγωγής, η σύγκριση των πρώτων υλών περιλαμβάνει διάφορα ζητήματα όπως:

1. τη χημική σύνθεση της βιομάζας
2. τις πρακτικές καλλιέργειας
3. τη διαθεσιμότητα γης και πρακτικές χρήσης γης
4. τη χρήση πόρων
5. το ενεργειακό ισοζύγιο
6. την εκπομπή αερίων του θερμοκηπίου, αερίων που προκαλούν οξίνιση και αερίων που καταστρέφουν το όζον
7. την απορρόφηση ανόργανων συστατικών στο νερό και το έδαφος
8. την έγχυση φυτοφαρμάκων
9. τη διάβρωση του εδάφους
10. τη συμβολή στην απώλεια βιοποικιλότητας και αξίας του τοπίου
11. την τιμή της βιομάζας στο αγρόκτημα
12. το κόστος εφοδιασμού (μεταφορά και αποθήκευση της βιομάζας)
13. την οικονομική αξία των πρώτων υλών λαμβάνοντας υπόψη τα συμπαράγωγα
14. τη δημιουργία ή διατήρηση θέσεων εργασίας και
15. τις απαιτήσεις σε νερό και διαθεσιμότητα νερού [46].

Οι πρώτες ύλες (πρώτης γενιάς) που περιέχουν ζάχαρη και άμυλο χρησιμοποιούνται και ως τρόφιμα είτε ανθρώπων είτε ζώων, δημιουργώντας προβληματισμούς σχετικά με την βιωσιμότητα. Για αυτόν τον λόγο η λιγνοκυτταρινική βιομάζα (δεύτερης γενιάς) αντιπροσωπεύει μια εναλλακτική λύση για την παραγωγή βιοαιθανόλης λόγω του χαμηλού κόστους, της μεγάλης διαθεσιμότητας, της ευρείας διανομής της και του μη ανταγωνισμού της με τις καλλιέργειες τροφίμων [47].

#### 4.5.1 ΣΑΚΧΑΡΟΥΧΕΣ ΠΗΓΕΣ

Τα ζαχαροκάλαμο και τα ζαχαρότευτλα είναι τα σημαντικότερα φυτά παραγωγής ζάχαρης στον κόσμο και μπορούν εύκολα να υδρολυθούν από το ένζυμο ινβερτάση, που συντίθεται από τα περισσότερα είδη *Saccharomyces*. Άρα αυτές οι πρώτες ύλες δεν απαιτούν κάποια προεπεξεργασία για την παραγωγή βιοαιθανόλης, γεγονός που καθιστά αυτή τη βιοδιεργασία πιο εφικτή από ό,τι από πρώτες ύλες που περιέχουν άμυλο. Οι καλλιέργειες ζάχαρης χρειάζονται μόνο μια διαδικασία άλεσης για την εκχύλιση των σακχάρων στο μέσο της ζύμωσης και εδώ η αιθανόλη μπορεί να παραχθεί απευθείας από τον χυμό ή τη μελάσα [48]. Το ζαχαροκάλαμο ως πρώτη ύλη για την παραγωγή βιοαιθανόλης παρέχει ορισμένα πλεονεκτήματα, δεδομένου ότι είναι μια καλλιέργεια που δεν απαιτεί πολλές γεωργικές εργασίες που συνήθως απαιτούνται για την επεξεργασία των ακατέργαστων καλλιεργειών, και η βιομάζα της χρησιμοποιείται για θέρμανση και ηλεκτρισμό. Το ζαχαροκάλαμο είναι φθηνότερο από τις άλλες πρώτες ύλες που χρησιμοποιούνται για την παραγωγή βιοαιθανόλης λόγω της ευκολότερης επεξεργασίας και της υψηλότερης παραγωγικότητας [48 , 49]. Ωστόσο, πολλές προσπάθειες εξακολουθούν να αποσκοπούν στη βελτίωση της παραγωγής βιοαιθανόλης από ζαχαροκάλαμο μεταξύ των οποίων η ανάπτυξη νέων ποικιλιών ζαχαροκάλαμου με υψηλότερη περιεκτικότητα σε σάκχαρα και ανθεκτικότητα στις ασθένειες, μεγαλύτερη απόδοση και μεγαλύτερη μακροζωία [48]. Ακατέργαστος, αραιός και παχύς χυμός, ως ενδιάμεσο προϊόν που σχηματίζεται κατά την επεξεργασία ζαχαρότευτλων,

καθώς και η υψηλής καθαρότητας κρυσταλλική ζάχαρη, θα μπορούσαν να μετατραπούν σε βιοαιθανόλη ή/και προϊόντα βιολογικής βάσης. Τα ακατέργαστα ζαχαρότευτλα είναι επίσης κατάλληλα υποστρώματα για την παραγωγή βιοαιθανόλης. Το σιρόπι ζάχαρης και η κρυσταλλική ζάχαρη μπορούν να χρησιμεύσουν ως υποστρώματα για την παραγωγή βιοαιθανόλης καθ' όλη τη διάρκεια του έτους.

Η μελάσα, κύριο υποπροϊόν της βιομηχανίας ζάχαρης, χρησιμεύει κυρίως ως υπόστρωμα για την παραγωγή μαγιάς και βιοαιθανόλης, αλλά μπορεί επίσης να είναι κατάλληλο για την παραγωγή ζωοτροφών. Τα συνολικά υπολειμματικά σάκχαρα στη μελάσα μπορεί να κυμαίνονται στο 50-60 % (m/V), εκ των οποίων το 60 % περίπου είναι σακχαρόζη, γεγονός που την καθιστά κατάλληλο υπόστρωμα για την παραγωγή βιοαιθανόλης μεγάλης κλίμακας [48].

#### 4.5.2 ΑΜΥΛΟΥΧΕΣ ΠΗΓΕΣ

Οι καλλιέργειες σιτηρών (π.χ. καλαμπόκι, κριθάρι, σιτάρι, σόργο) και οι καλλιέργειες ρίζας (π.χ. μανιόκα, πατάτα, γλυκοπατάτα, αγκινάρα, κάκτος) περιέχουν μεγάλες ποσότητες αμύλου [50]. Το απομονωμένο, από διαφορετικές πηγές, φυσικό μπορεί να χρησιμοποιηθεί για περαιτέρω μετατροπή σε προϊόντα βιολογικής βάσης και στην παραγωγή βιοαιθανόλης. Το υπόλειμμα από την απομόνωση αμύλου περιέχει πρωτεΐνες και φυτικές ίνες, οι οποίες έχουν μεγάλες δυνατότητες εφαρμογής στην παραγωγή τροφίμων και ζωοτροφών. Στις ΗΠΑ, το καλαμπόκι αποτελεί πηγή πάνω από το 95% της παραγωγής βιοαιθανόλης και το υπόλοιπο παράγεται από κριθάρι, σιτάρι, ορό γάλακτος και υπολείμματα ποτών.

Το άμυλο είναι ένα μείγμα γραμμικών μορίων γλυκόζης που συνιστούν την αμυλόζη και διακλαδισμένων, που συνιστούν την αμυλοπηκτίνη. Το απαραίτητο ένζυμο για την υδρόλυση του αμύλου είναι η  $\alpha$ -αμυλάση, που δρα στους δεσμούς  $\alpha$ -1,4, αλλά όχι στους  $\alpha$ -1,6 στην αμυλοπηκτίνη. Για την παραγωγή βιοαιθανόλης από πρώτες ύλες που περιέχουν άμυλο, είναι απαραίτητο να γίνει η υδρόλυση αμύλου σε σιρόπι γλυκόζης, το οποίο μπορεί να μετατραπεί σε αιθανόλη από τον ζυμομύκητα *Saccharomyces cerevisiae*. Αυτό το βήμα είναι ένα πρόσθετο κόστος σε σύγκριση με την παραγωγή βιοαιθανόλης από τις σακχαρούχες πηγές. Η μέγιστη απόδοση μετατροπής της γλυκόζης σε αιθανόλη είναι 51% κατά μάζα. Ωστόσο, η μαγιά χρησιμοποιεί επίσης γλυκόζη για την ανάπτυξη των κυττάρων και τη σύνθεση άλλων μεταβολικών προϊόντων, μειώνοντας έτσι τη μέγιστη απόδοση μετατροπής. Στην πράξη, 40-48% κατά μάζα γλυκόζης μετατρέπεται σε αιθανόλη [48]. Σε σύγκριση με την παραγωγή αιθανόλης από πρώτες ύλες που περιέχουν ζάχαρη, η αιθανόλη που λαμβάνεται από αμυλούχες πρώτες ύλες βελτιώνει την εφαρμογή ενζύμων και των ζυμομυκήτων με υψηλή ανοχή σε αιθανόλη [51].

Τα μικροφύκη είναι μια δυναμική ανανεώσιμη πηγή βιομάζας για την παραγωγή βιοκαυσίμων, επειδή έχουν την ικανότητα να μετατρέπουν το CO<sub>2</sub> σε λιπίδια και πολυσακχαρίτες. Ως εκ τούτου, το βιομηχανικό CO<sub>2</sub> θα μπορούσε να συλλεχθεί και να χρησιμοποιηθεί για την καλλιέργεια μικροφυκών ως μέρος της στρατηγικής για τη μείωση των εκπομπών CO<sub>2</sub> στην ατμόσφαιρα. Τα μικροφύκη μπορούν να συσσωρεύσουν άμυλο ως εφεδρικό πολυσακχαρίτη, ο οποίος μπορεί να χρησιμοποιηθεί για την παραγωγή βιοαιθανόλης (τρίτης γενιάς) μετά την απαραίτητη διαδικασία προεπεξεργασίας. Επιπλέον, η υπολειμματική βιομάζα (που περιέχει οργανική ύλη και μέταλλα) μετά την παραγωγή βιοαιθανόλης μπορεί να χρησιμεύσει ως βιολίπασμα [48].

#### 4.5.3 ΛΙΓΝΟΚΥΤΤΑΡΙΝΙΚΕΣ ΠΗΓΕΣ

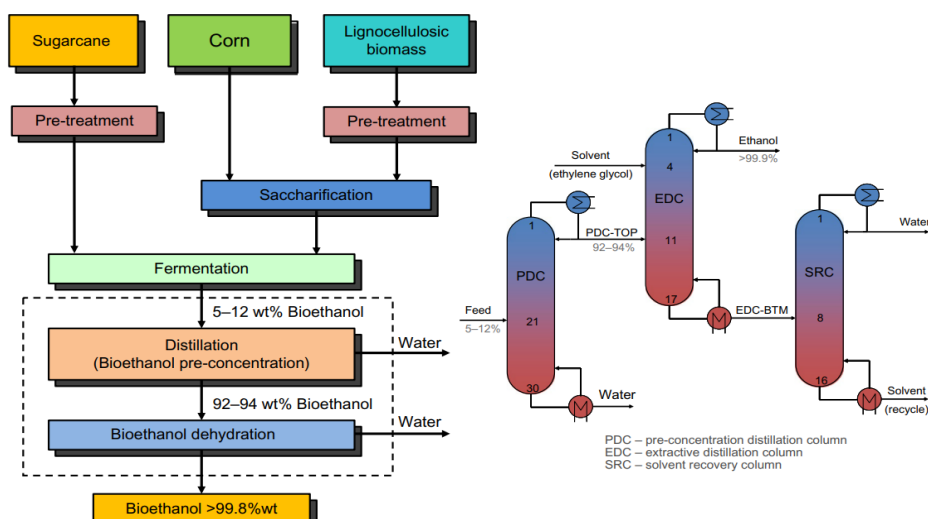
Η παραγωγή βιοαιθανόλης από πρώτες ύλες που περιέχουν λιγνοκυτταρίνη είναι ελκυστική και βιώσιμη επειδή η λιγνοκυτταρινική βιομάζα είναι ανανεώσιμη και μη ανταγωνιστική με τις καλλιέργειες τροφίμων. Επιπλέον, η χρήση βιοαιθανόλης που λαμβάνεται από τη λιγνοκυτταρινική βιομάζα σχετίζεται με τη μείωση των εκπομπών αερίων

του θερμοκηπίου. Η λιγνοκυτταρινική βιομάζα είναι σχεδόν ισομερώς κατανομημένη στη Γη, σε σύγκριση με τους ορυκτούς πόρους, γεγονός που παρέχει ασφάλεια εφοδιασμού με τη χρήση των εγχώριων πηγών ενέργειας και την ανεξαρτησία από άλλες χώρες. Μπορεί να ληφθεί από διαφορετικά υπολείμματα ή να συγκομιστεί απευθείας από το δάσος και η τιμή του είναι συνήθως χαμηλότερη από τις πρώτες ύλες που περιέχουν ζάχαρη ή άμυλο. Οι πρώτες ύλες που περιέχουν λιγνοκυτταρίνη για την παραγωγή βιοαιθανόλης διακρίνονται σε έξι κύριες ομάδες: υπολείμματα καλλιεργειών (βαγάσα από ζαχαροκάλαμο και γλυκό σόργο, υπολείμματα καλαμποκιού, διάφοροι τύποι αχύρου, φλοιός ρυζιού), σκληρά ξύλα, μαλακά ξύλα (πεύκο, έλατο), απόβλητα κυτταρίνης (π.χ. απορρίμματα χαρτιού και ανακυκλωμένη ίλος χαρτιού), ποώδη βιομάζα και αστικά στερεά απόβλητα [48].

Η μέση λιγνοκυτταρινική βιομάζα περιέχει 43% κυτταρίνη, 27% λιγνίνη, 20% ημικυτταρίνη και 10% άλλα συστατικά. Η ποικιλία σύνθεσης της λιγνοκυτταρινικής βιομάζας θα μπορούσε να είναι πλεονέκτημα (διαθεσιμότητα περισσότερων προϊόντων από αυτά που λαμβάνονται στα διυλιστήρια πετρελαίου και ευρύτερο φάσμα πρώτων υλών), αλλά και μειονέκτημα (ανάγκη για ένα μεγάλο φάσμα τεχνολογιών). Αυτή η ετερογενής δομή της λιγνοκυτταρινικής βιομάζας απαιτεί πιο πολύπλοκες χημικές διεργασίες από τις ομοιόμορφες και σταθερές πρώτες ύλες που απαιτούνται στη χημική βιομηχανία. Επιπλέον, η συγκομιδή λιγνοκυτταρινικών καλλιεργειών συνήθως δεν είναι συνήθως δυνατή καθ' όλη τη διάρκεια του έτους. Ως εκ τούτου, αυτό το πρόβλημα πρέπει να λυθεί με τη σταθεροποίηση της βιομάζας, προκειμένου να είναι διαθέσιμη για μακροπρόθεσμη αποθήκευση και να εξασφαλιστεί η συνεχής εργασία του βιοδιυλιστηρίου καθ' όλη τη διάρκεια του έτους [45].

#### 4.6 ΠΑΡΑΓΩΓΗ ΑΙΘΑΝΟΛΗΣ

Η παραγωγή αιθανόλης βασίζεται σε διάφορες διεργασίες, μετατροπή καλαμποκιού σε αιθανόλη, μετατροπή ζαχαροκάλαμου σε αιθανόλη καθώς και μετατροπή λιγνοκυτταρινικής βιομάζας. Οι πρώτες ύλες υποβάλλονται σε διάφορα στάδια προεπεργασίας πριν ξεκινήσει η διεργασία ζύμωσης κατά την οποία παράγεται η βιοαιθανόλη. Όταν το στάδιο της διάσπασης των πολυσακχαριτών σε μονομερή (υδρόλυση, σακχαροποίηση) και της ζύμωσης γίνονται ξεχωριστά σε διαφορετικές συνθήκες, τότε η παραγωγή της βιοαιθανόλης χαρακτηρίζεται ως *Separate Hydrolysis and Fermentation (SHF)*, διαφορετικά, όταν τα δύο στάδια γίνονται ταυτόχρονα σε ίδιες συνθήκες, λέγεται *Simultaneous Saccharification and Fermentation (SSF)*. Ένα κοινό χαρακτηριστικό και για τα 3 είδη πρώτων υλών είναι η παραγωγή ενός αραιωμένου ρεύματος (5-12 % w/w αιθανόλης), το οποίο έπειτα πρέπει να συμπυκνωθεί περαιτέρω πέρα από την αζεοτροπική σύνθεση σε καθαρότητες της τάξης 99-99.8% w/w σε αιθανόλη. Για την επίτευξη του στόχου καθαρότητας απαιτούνται πολλά απαιτητικά ενεργειακά στάδια διαχωρισμού, κυρίως λόγω της παρουσίας του δυαδικού αζεότροπου αιθανόλης-νερού. Στο Σχήμα 7 παρουσιάζεται ένα σχηματικό διάγραμμα της διαδικασίας που εφαρμόζεται [52].



Σχήμα 6: Διάγραμμα Παραγωγής αιθανόλης.

#### 4.6.1 ΠΑΡΑΓΩΓΗ ΑΙΘΑΝΟΛΗΣ ΑΠΟ ΣΑΚΧΑΡΟΥΧΕΣ ΠΗΓΕΣ

Ο μικροοργανισμός που χρησιμοποιείται περισσότερο για την παραγωγή βιοαιθανόλης από πρώτες ύλες που περιέχουν ζάχαρη είναι ο *Saccharomyces cerevisiae* λόγω της ικανότητάς του να αποδομεί τη σακχαρόζη σε εξόζες (γλυκόζη και φρουκτόζη). Τα κύτταρα του *S. cerevisiae* απαιτούν μικρές ποσότητες οξυγόνου για τη σύνθεση λιπαρών οξέων και στερολών κατά τη διάρκεια παραγωγή βιοαιθανόλης, οπότε ο αερισμός είναι μια σημαντική παράμετρος βιολογικής διεργασίας. Ο *S. cerevisiae* δεν ανέχεται υψηλότερες συγκεντρώσεις σακχάρων και αλάτων σε μεσαίες ή υψηλότερες θερμοκρασίες. Η μαγιά *Schizosaccharomyces pombe* χρησιμοποιείται επίσης στην παραγωγή βιοαιθανόλης, καθώς ανέχεται υψηλές οσμωτικές πιέσεις (υψηλές συγκεντρώσεις αλάτων) και υψηλή περιεκτικότητα σε στερεά. Η διεργασία Melle-Boinot είναι η τυπική διεργασία για την παραγωγή βιοαιθανόλης με batch ζύμωση. Αποτελείται από την προετοιμασία του ζωμού (ρύθμιση του pH, 14-22 % κατά μάζα) και αποστείρωση, ακολουθούμενη από ζύμωση με μαγιά. Ο ζυμωμένος ζωμός οδηγείται για φυγοκεντρικό διαχωρισμό, ενώ το υγρό μέρος του μεταφέρεται στο στάδιο διαχωρισμού της αιθανόλης (συνήθως απόσταξη) και η μαγιά ανακυκλώνεται για την επόμενη ζύμωση σε προκειμένου να επιτευχθούν υψηλότερες συγκεντρώσεις κυττάρων.

#### 4.6.2 ΠΑΡΑΓΩΓΗ ΑΙΘΑΝΟΛΗΣ ΑΠΟ ΑΜΥΛΟΥΧΕΣ ΠΗΓΕΣ

Υπάρχουν δύο κύριες διεργασίες για την παραγωγή βιοαιθανόλης από αμυλούχες πηγές: το ξηρό άλεσμα το υγρό. Και στις δύο διαδικασίες χρησιμοποιούνται ζύμες (*Saccharomyces cerevisiae*, *Saccharomyces pastorianus*, *Schizosaccharomyces pombe* και *Kluyveromyces sp.*) που είναι ικανές να μεταβολίζουν το υδρολυμένο άμυλο. Η ξηρή άλεση χρησιμοποιείται συχνά για την παραγωγή βιοαιθανόλης στις ΗΠΑ λόγω του χαμηλότερου κόστους κεφαλαίου και λειτουργίας. Σε αυτήν την διαδικασία, ολόκληρο το καλαμπόκι αλέθεται και αναμιγνύεται με νερό για να προκύψει πολτός. Ο πολτός μαγειρεύεται σε jet cooker (μια μοναδική συσκευή θέρμανσης σχεδιασμένη για να θερμαίνει πολτούς αμύλου με υψηλή περιεκτικότητα σε στερεό) στους 80 – 90°C για 15-20 λεπτά και κατά τη διάρκεια αυτή προστίθεται α-αμυλάση (σε σχετικά μικρές ποσότητες) προκειμένου να ευνοηθεί η ρευστοποίηση. Η α-αμυλάση προστίθεται και κατά τη διάρκεια της δευτερογενούς υγροποίησης, η οποία διαρκεί 90 λεπτά στους 95 °C. Μετά από αυτό, ο πολτός ψύχεται στους 60 °C και αναμιγνύεται με τη γλυκοαμυλάση για να υδρολυθεί το άμυλο σε σάκχαρα τα οποία μπορούν να μεταβολιστούν περαιτέρω σε αιθανόλη με τη βοήθεια της μαγιάς. Η σακχαροποίηση και η ζύμωση συχνά συμβαίνουν ταυτόχρονα (ταυτόχρονη σακχαροποίηση και ζύμωση, SSF) και η βιοδιεργασία πραγματοποιείται συνήθως σε pH=4.8-5.0 και 30 °C για

48 ώρες. Ο ζυμωμένος ζυμός στη συνέχεια αποστάζεται για να παραχθεί ένα 95 % κατά όγκο διάλυμα αιθανόλης. Η αφυδάτωση της 95 % κατ' όγκο αιθανόλης απαιτεί μοριακά κόσκινα για να επιτευχθεί 99.5 % καθαρότητα σε αιθανόλη. Η φυγοκέντρωση των υπολειμμάτων της ζύμωσης (ολόκληρο το αποστάγμα) παράγει μια υγρή μάζα, η οποία πρέπει να αποξηραθεί για να ληφθούν οι αποξηραμένοι κόκκοι απόσταξης (distiller's dried grains (DDG)). Το υγρό τμήμα από την φυγοκέντρωση που πρέπει να εξατμιστεί για να ληφθεί σιρόπι. Το σιρόπι αναμειγνύεται στη συνέχεια με τα DDG για να σχηματιστούν αποξηραμένοι κόκκοι με διαλυτά (DDGS). Το υπολειπόμενο μέρος του αποστάγματος ανακυκλώνεται ως νερό διεργασίας.

#### 4.6.3 ΠΑΡΑΓΩΓΗ ΑΙΘΑΝΟΛΗΣ ΑΠΟ ΛΙΓΝΟΚΥΤΤΑΡΙΝΙΚΕΣ ΠΗΓΕΣ

Έχει γίνει τεράστια έρευνα στον τομέα της βιοδιύλισης για τη μετατροπή λιγνοκυτταρινικών πρώτων υλών σε ζυμώσιμα σάκχαρα. Παρά το τεράστιο ενδιαφέρον και την επαρκή πρόοδο στην έρευνα και ανάπτυξη της λιγνοκυτταρινικής βιοαιθανόλης, υπάρχουν ακόμη πολλές προκλήσεις που πρέπει ακόμη να επιλυθούν. Τα πιο συχνά χρησιμοποιούμενα στάδια στην παραγωγή βιοαιθανόλης από πρώτες ύλες που περιέχουν λιγνοκυτταρίνη είναι: (i) η προεπεξεργασία της κυτταρίνης και της ημικυτταρίνης ώστε να καταστούν πιο εύκολα διαχειρίσιμα στα επόμενα στάδια, (ii) η όξινη ή ενζυμική υδρόλυση των πολυσακχαρίτων σε απλά σάκχαρα, (iii) μικροβιακή ζύμωση των απλών σακχάρων (εξόζες και πεντόζες) σε αιθανόλη, και (iv) διαχωρισμός και συγκέντρωση αιθανόλης. Διαφορετικοί μικροοργανισμοί χρησιμοποιούνται για τη ζύμωση της γλυκόζης σε αιθανόλη, μεταξύ των οποίων ο πιο συχνά χρησιμοποιούμενος ο *Saccharomyces cerevisiae* [53]. Είναι σε θέση να μεταβολίζει μονο- και δισακχαρίτες (π. χ. γλυκόζη, φρουκτόζη, μαλτόζη και σακχαρόζη), αλλά όχι πεντόζες (π. χ. ξυλόζη και αραβινόζη). Επιπλέον, ο ζυμομύκητας *S. cerevisiae* δεν είναι ικανός για άμεση αφομοίωση κυτταρίνης και ημικυτταρίνης [54]. Η τεχνολογία ανασυνδυασμένου DNA ή οι μικροοργανισμοί που ζυμώνουν πεντόζες (π.χ. *Pichia stipitis*, *Pachysolen tannophilus* και *Candida shehatae*) χρησιμοποιούνται για να ξεπεραστεί αυτό το μειονέκτημα. Αυτοί οι μικροοργανισμοί που ζυμώνουν πεντόζες έχουν τουλάχιστον πέντε φορές χαμηλότερο ρυθμό παραγωγής αιθανόλης από την παραγωγή αιθανόλης από μετατροπή γλυκόζης από τον *S. cerevisiae* [48]. Ο *S. cerevisiae* έχει τροποποιηθεί με μεταβολικά γονίδια αραβινόζης από ζυμομύκητες όπως η *Candida aurigiensis* [53]. Επομένως, τον τελευταίο καιρό έχουν γίνει πολλές προσπάθειες για την απόκτηση ενός ιδανικού μικροοργανισμού που θα είναι σε θέση να παράγει αιθανόλη απευθείας από οποιοδήποτε υδατάνθρακα [48].

## 5 ΓΑΛΑΚΤΙΚΟ ΟΞΥ

### 5.1 ΕΙΣΑΓΩΓΗ

Το γαλακτικό οξύ ανακαλύφθηκε το 1780 από τον C. W. Scheele στο ξινόγαλα και το 1881 ο Fermi παρήγαγε γαλακτικό οξύ με ζύμωση. Το ενδιαφέρον για το γαλακτικό οξύ σχετίζεται με πολλές πτυχές, μεταξύ των οποίων είναι η σχετικά υψηλή προστιθέμενη αξία του. Επιπλέον, μια τέτοια χημική ουσία είναι GRAS (Generally Recognized As Safe), αναγνωρίζεται ως ακίνδυνη από την Υπηρεσία Τροφίμων και Φαρμάκων των Ηνωμένων Πολιτειών, έχει μεγάλες δυνατότητες ανάπτυξης, μπορεί να παραχθεί εναλλακτικά με ζύμωση ή χημική σύνθεση και μπορεί να χρησιμοποιήσει μια μεγάλη ποικιλία διαφορετικών αποβλήτων ως υποστρώματα [55]. Αυτό το σημαντικό οργανικό οξύ παράγεται με χημική σύνθεση και με μικροβιακή ζύμωση. Με την χημική σύνθεση παράγεται μόνο ένα ρακεμικό μείγμα D- και L-γαλακτικού οξέος. Από την άλλη πλευρά, μέσω ζύμωσης, παράγεται ένα οπτικά καθαρό L - ή D -γαλακτικό οξύ. Πολλά φθηνά υλικά όπως η μελάσα και άλλα υπολείμματα από τη γεωργία έχουν χρησιμοποιηθεί ως υποστρώματα για τη ζύμωση του γαλακτικού οξέος και επιπλέον, έχει μελετηθεί η βελτίωση της αποτελεσματικότητας των μικροοργανισμών για την παραγωγή γαλακτικού οξέος μέσω γονιδιακής τροποποίησης. Τα γαλακτικά βακτήρια (LAB) παραδοσιακά συνδέονται με τη ζύμωση τροφίμων και ζωοτροφών και γενικά θεωρούνται ευεργετικοί μικροοργανισμοί. Τα LAB έλαβαν τον χαρακτηρισμό «γενικά αναγνωρισμένα ως ασφαλή» από τον Οργανισμό Τροφίμων και Φαρμάκων των ΗΠΑ (FDA) [56]. Λόγω μιας σειράς διαφορετικών ιδιοτήτων, το γαλακτικό οξύ είναι ένα σημαντικό βιομηχανικό προϊόν που χρησιμοποιείται ως πρόδρομη ουσία μικρών (προπυλενογλυκόλη) ή μεγάλων (ακρυλικά πολυμερή) ενώσεων.

### 5.2 ΕΦΑΡΜΟΓΕΣ ΓΑΛΑΚΤΙΚΟΥ ΟΞΕΟΣ ΚΑΙ ΠΟΛΥΜΕΡΩΝ ΤΟΥ

Στη βιομηχανία καλλυντικών, το γαλακτικό οξύ χρησιμοποιείται για την παρασκευή προϊόντων υγιεινής και αισθητικής, λόγω των ενυδατικών, αντιμικροβιακών και αναζωογονητικών επιδράσεων του στο δέρμα, καθώς και προϊόντων στοματικής υγιεινής. Τα παράγωγα γαλακτικού οξέος, όπως οι γαλακτικοί εστέρες, χρησιμοποιούνται ευρέως λόγω των υγροσκοπικών και γαλακτωματοποιητικών ιδιοτήτων τους [57].

Στη φαρμακευτική βιομηχανία χρησιμοποιείται ως συμπλήρωμα στη σύνθεση δερματολογικών φαρμάκων και κατά της οστεοπόρωσης. Περίπου το 70% του παραγόμενου γαλακτικού οξέος χρησιμοποιείται στη βιομηχανία τροφίμων λόγω του ρόλου του στην παραγωγή γιαουρτιού και τυριού.

Στην παρασκευή γιαουρτιών είναι το κύριο προϊόν της ζύμωσης των *Streptococcus thermophilus* και *Lactobacillus bulgaricus*. Κατά την παρασκευή του τυριού, η μείωση του pH λόγω της απελευθέρωσης γαλακτικού οξέος προκαλεί τη συσσωμάτωση των μικκυλίων καζεΐνης. Μερικές φορές, ανάλογα με τα επιθυμητά οργανοληπτικά χαρακτηριστικά του τελικού προϊόντος, χρησιμοποιείται η άμεση οξίνιση με γαλακτικό οξύ για να αποφευχθεί ο κίνδυνος πολλαπλασιασμού ανεπιθύμητων μικροοργανισμών και για να προστατευτεί από επιμολύνσεις, στο διάστημα από την παραγωγή μέχρι την ημερομηνία λήξης του [55, 58].

Στον τομέα της παραγωγής σιτηρών, το γαλακτικό οξύ που σχηματίζεται αυθόρμητα εξαιτίας της παρουσίας μικροοργανισμών που πραγματοποιούν τη γαλακτική ζύμωση της πρώτης ύλης (για παράδειγμα, υγρή επεξεργασία καλαμποκιού), οδηγεί σε αλλαγές στα παρασκευάσματα αρώματος και γεύσης και προκαλεί μείωση του pH που εμποδίζουν την ανάπτυξη παθογόνων βακτηρίων.

Όσον αφορά τη διατροφή των ζώων, η ελεγχόμενη γαλακτική ζύμωση αυξάνει τη διάρκεια ζωής, τη γευστικότητα και τη θρεπτική αξία του ενσιρώματος (είδος ζωοτροφής που

παράγεται από καλλιέργειες πράσινου φυλλώματος, που έχουν διατηρηθεί με ζύμωση μέχρι το σημείο της οξίνισης) [55].

Τα πολυμερή του γαλακτικού οξέος είναι βιοδιασπώμενα, χρησιμοποιούνται ως υλικά συσκευασίας και επισήμανσης και βιοσυμβατά, χρήσιμα για την κατασκευή προσθετικών συσκευών, ραμμάτων και εσωτερικής δοσολογίας φαρμάκων [55]. Επίσης το γαλακτικό οξύ χρησιμοποιείται και σαν πρώτη ύλη για την παραγωγή του βιοδιασπώμενου πολύ-L-γαλακτικού οξέος (PLA), που αποτελεί ένα καλό υποκατάστατο των συνθετικών πολυμερών που προέρχονται από πετρελαϊκές πηγές [56]. Το πολυγαλακτικό οξύ έχει πολλές εφαρμογές στην κλωστοϋφαντουργία, την ιατρική και τη φαρμακευτική βιομηχανία [59 , 60]. Το PLA αναμένεται να αντικαταστήσει τα πλαστικά με βάση τα ορυκτά καύσιμα σε πολλές εφαρμογές, αλλά προκειμένου να είναι ανταγωνιστικό, πρέπει το κόστος παραγωγής της PLA να μειωθεί στο μισό της σημερινής τιμής της. Το αρνητικό με το PLA είναι το υψηλό κόστος παραγωγής του μονομερούς με ζύμωση, το οποίο περιλαμβάνει το κόστος του υποστρώματος, των πηγών αζώτου και της διαδικασίας ανάκτησης και καθαρισμού του. Είναι, λοιπόν, πολύ σημαντικό να αναζητηθούν πιο παραγωγικά στελέχη μικροοργανισμών για τη βελτίωση της αποδοτικότητας της λειτουργικής διαδικασίας και της απόδοσης της παραγωγής γαλακτικού οξέος μαζί με την αναγκαιότητα παραγωγής διαλύματος γαλακτικού οξέος υψηλής καθαρότητας για τη βελτίωση της αντίδρασης πολυμερισμού [56].

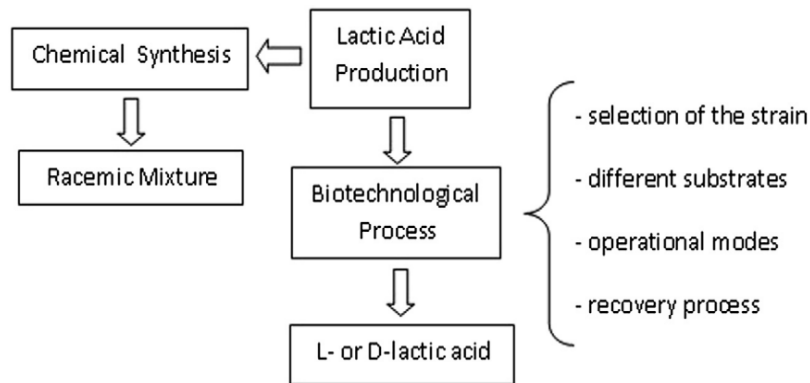
### 5.3 ΦΥΣΙΚΟΧΗΜΙΚΕΣ ΙΔΙΟΤΗΤΕΣ ΓΑΛΑΚΤΙΚΟΥ ΟΞΕΟΣ

Το καθαρό (άνυδρο) γαλακτικό οξύ είναι στερεό, λευκό, άοσμο κρυσταλλικό σώμα που διαλύεται πολύ εύκολα στο νερό με το οποίο σχηματίζει ένα διαυγές έως υποκίτρινο υγρό. Είναι πολύ υγροσκοπικό (απορροφά υγρασία από την ατμόσφαιρα), γι' αυτό και στο εμπόριο διατίθεται ως διάλυμα σε νερό με περιεκτικότητα που κυμαίνεται από 22-90%. Ανήκει στην οικογένεια των α-υδρόξυ καρβοξυλικών οξέων καθώς τόσο το υδροξύλιο όσο και το καρβοξύλιο του είναι ενωμένα με το ίδιο άτομο άνθρακα. Στο εμπόριο συνήθως διατίθεται η ρακεμική του μορφή (DL-lactic acid) η οποία είναι μείγμα των δύο ισομερών σε αναλογία 1 προς 1 [58]. Το γαλακτικό οξύ (2-υδροξυκαρβοξυλικό οξύ) αποτελεί ένα ευρέως διαδεδομένο στη φύση οργανικό οξύ. Είναι το απλούστερο 2-υδροξυκαρβοξυλικό οξύ και συναντάται σε 2 εναντιομερείς μορφές. Η οπτικά ανενεργή μορφή είναι το ισομοριακό (ρακεμικό) μείγμα D και L-εναντιομερών [56]. Τα διαχωρισμένα εναντιομερή έχουν αρκετά υψηλότερη θερμοκρασία τήξης 53°C από ότι το ισομοριακό μείγμα, το οποίο έχει σημείο τήξης 16.8°C [58]. Η χημική συμπεριφορά του καθορίζεται από τις φυσικοχημικές ιδιότητες του, μεταξύ των οποίων είναι ο όξινος χαρακτήρας σε υδατικό μέσο και η διλειτουργική αντιδραστικότητα που συνδέεται με την παρουσία μιας καρβοξυλομάδας και μιας υδροξυλομάδας, που του προσδίδουν μεγάλη ευελιξία στις αντιδράσεις [55]. Η συγκέντρωση του L-γαλακτικού οξέος στο αίμα είναι συνήθως 1-2 mM σε ηρεμία, αλλά μπορεί να ξεπεράσει τα 20 mM, κατά τη διάρκεια έντονης άσκησης, καθώς και τα 25 mM μετά την άσκηση [58].

### 5.4 ΠΑΡΑΓΩΓΗ ΓΑΛΑΚΤΙΚΟΥ ΟΞΕΟΣ

Το γαλακτικό οξύ μπορεί να παραχθεί με χημική σύνθεση ή με βιοτεχνολογικές διεργασίες (ζύμωση), όπως φαίνεται στο Σχήμα 7.





Σχήμα 7: Διάγραμμα Παραγωγής Γαλακτικού οξέος.

Το γαλακτικό οξύ που παράγεται με χημική σύνθεση είναι ένα ρακεμικό μείγμα των L- και D- ισομερών του γαλακτικού οξέος και η διαδικασία αυτή βασίζεται κυρίως στη χρήση λακτονιτριλίου υδρολυομένο με ισχυρά οξέα. Υπάρχουν και άλλες χημικές διαδρομές μέσω των οποίων είναι δυνατή η παραγωγή γαλακτικού οξέος, αλλά δεν είναι τεχνικά ή οικονομικά εφικτές διεργασίες .

Οι βιοτεχνολογικές διεργασίες πλεονεκτούν καθώς χρησιμοποιούν εναλλακτικές πρώτες ύλες ως υποστρώματα. Επιπλέον, μέσω αυτών των διεργασιών παράγεται οπτικά καθαρό L- ή D-γαλακτικού οξύ.

#### 5.4.1 ΠΑΡΑΓΩΓΗ ΓΑΛΑΚΤΙΚΟΥ ΟΞΕΟΣ ΜΕΣΩ ΧΗΜΙΚΗΣ ΣΥΝΘΕΣΗΣ

Για τη χημική σύνθεση γαλακτικού οξέος, η ακεταλδεΐδη αφήνεται να αντιδράσει σε υγρή φάση και υπό υψηλή πίεση με υδροκυάνιο παρουσία βάσης για την παραγωγή λακτονιτριλίου. Μετά την ανάκτηση και τον καθαρισμό του μέσω απόσταξης, προστίθεται υδροχλωρικό οξύ ή θειικό οξύ για την υδρόλυση του λακτονιτριλίου σε γαλακτικό οξύ. Το γαλακτικό οξύ στη συνέχεια εστεροποιείται με μεθανόλη για την παραγωγή γαλακτικού αιθυλεστέρα, ο οποίος με τη σειρά του ανακτάται και καθαρίζεται με απόσταξη. Το καθαρισμένο γαλακτικό μεθύλιο υδrolύεται τελικά σε όξινο υδατικό διάλυμα σε γαλακτικό οξύ και μεθανόλη [61]. Άλλες χημικές οδοί για τη σύνθεση γαλακτικού οξέος περιλαμβάνουν την καταλυόμενη από βάσεις αποικοδόμηση σακχάρων, την οξείδωση προπυλενογλυκόλης, μονοξειδίου του άνθρακα και νερού σε υψηλή θερμοκρασία και πίεση, την υδρόλυση του χλωροπροπιονικού οξέος και την οξείδωση του προπυλενίου με νιτρικό οξύ, μεταξύ άλλων [62].

#### 5.4.2 ΠΑΡΑΓΩΓΗ ΓΑΛΑΚΤΙΚΟΥ ΟΞΕΟΣ ΜΕΣΩ ΖΥΜΩΣΗΣ

Η γαλακτική ζύμωση είναι μια σχετικά γρήγορη αντίδραση, με υψηλές αποδόσεις και μπορεί να οδηγήσει, επιλεκτικά, σε ένα από τα δύο στερεοϊσομερή του γαλακτικού οξέος ή στο ρακεμικό μείγμα τους. Μετά την παροχή των θρεπτικών συστατικών, τα διαλύματα σακχάρων εμβολιάζονται με τον επιλεγμένο μικροοργανισμό και λαμβάνει χώρα η ζύμωση. Είναι απαραίτητο να επιλεγθούν οι ευνοϊκότερες συνθήκες ζύμωσης, όσον αφορά τη θερμοκρασία, το pH, τον αερισμό, την ανάδευση κ.ο.κ. , οι οποίες ποικίλλουν ανάλογα με τον μικροοργανισμό.

Τα υλικά που χρησιμοποιούνται συχνότερα για το σκοπό αυτό μπορούν να ταξινομηθούν σε δύο ομάδες, δηλαδή τους μονοσακχαρίτες και δισακχαρίτες και τα πολυμερή υποστρώματα [55]

Ορισμένα από τα σάκχαρα που χρησιμοποιούνται στη ζύμωση του γαλακτικού οξέος είναι η γλυκόζη, η ξυλόζη, η σακχαρόζη, η λακτόζη και η σελοβιόζη. Ωστόσο, η γλυκόζη είναι το πιο ευνοϊκό σάκχαρο για αφομοίωση από τα μικροβιακά στελέχη για την παραγωγή γαλακτικού

οξέος. Τα περισσότερα από τα μικροβιακά στελέχη δεν μπορούν να χρησιμοποιήσουν άμεσα την ξυλόζη. Μερικές φορές, όταν η συγκέντρωση της γλυκόζης είναι υψηλή, δεν καταναλώνονται άλλα σάκχαρα από τα μικρόβια. Τα βακτήρια του γαλακτικού οξέος ακολουθούν ένα ιεραρχικό μοτίβο αξιοποίησης των σακχάρων, ξεκινώντας με τη γλυκόζη, οδηγώντας έτσι στην καταστολή του καταβολίτη του άνθρακα, που συμβαίνει όταν τα σάκχαρα δεν αξιοποιούνται πλήρως, με αποτέλεσμα την μειωμένη αποτελεσματικότητα της ζύμωσης και την αύξηση του κόστους παραγωγής [63].

Το κόστος παραγωγής του γαλακτικού οξέος βασίζεται κυρίως στις πρώτες ύλες και στη σχετική μεταγενέστερη επεξεργασία και η ανάκτηση του προϊόντος είναι μια σημαντική διαδικασία μέσω της οποίας διαχωρίζεται το τελικό προϊόν από τα απόβλητα που περιέχουν ακαθαρσίες, θρεπτικά συστατικά, οργανικά οξέα και υπολείμματα σακχάρων. Για να επιτευχθεί η ποιότητα του γαλακτικού οξέος βιομηχανικής ποιότητας, είναι απαραίτητο να επιτευχθούν μεγάλες ποσότητες οπτικά καθαρού γαλακτικού οξέος με κατάλληλες τεχνικές ανάκτησης.

Ανάλογα με τα παραπροϊόντα που λαμβάνονται και την ικανότητα ζύμωσης των συγκεκριμένων σακχάρων, τα γένη των βακτηρίων ακολουθούν ένα από τα παρακάτω μονοπάτια :

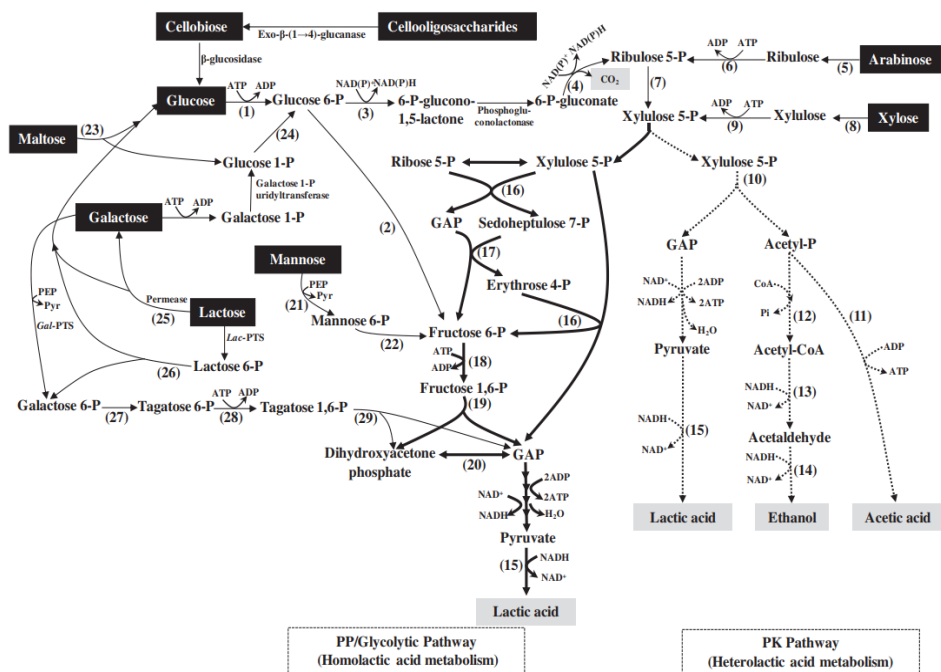
(1) Ομοζυμωτικά: Το γαλακτικό οξύ παράγεται κατά κύριο λόγο έως και 85% από τη γλυκόζη, δηλαδή ένα μόριο γλυκόζης κατά τη ζύμωση παράγει γαλακτικό οξύ έως 2 μόρια, με αποτέλεσμα να παράγονται 2 μόρια τριφωσφορικής αδενοσίνης για κάθε ένα μόριο γλυκόζης που μεταβολίζεται.

(2) Ετεροζυμωτικά: Η παραγωγή γαλακτικού οξέος από τη γλυκόζη είναι περίπου 50% σε αυτή τη διαδικασία ζύμωσης. Ένα μόριο γλυκόζης παράγει 1 μόριο γαλακτικού οξέος, 1 μόριο αιθανόλης και 1 μόριο διοξειδίου του άνθρακα με αποτέλεσμα να παράγεται 1 μόριο τριφωσφορικής αδενοσίνης που παράγεται για κάθε ένα μόριο γλυκόζης που μεταβολίζεται [63].

Οι μεταβολικές οδοί που μπορεί να ακολουθηθούν με τα δύο παραπάνω είδη ζύμωση παρουσιάζονται στο Σχήμα 8.

Μέσω των ομοζυμωτικών βακτηρίων, θεωρητικά, πρέπει να παραχθούν 4 mol γαλακτικού οξέος από 1 mol λακτόζης αφού διασπαστεί σε 1 mol γλυκόζης και 1 mol γαλακτόζης. (Σχήμα 8) [64].

Τα ετεροζυμωτικά γαλακτικά βακτήρια παράγουν παραπροϊόντα όπως το οξικό οξύ και την αιθανόλη, εκτός από γαλακτικό οξύ, με αποτέλεσμα να μειώνεται η παραγωγικότητα και να αυξάνεται το σχετικό κόστος για την ανάκτηση του γαλακτικού οξέος [63].



Σχήμα 8: Μεταβολικές οδοί για την παραγωγή γαλακτικού οξέος από διάφορα σάκχαρα με γαλακτικά βακτήρια.

#### 5.4.2.1 ΜΟΝΟΣΑΚΧΑΡΙΤΕΣ ΚΑΙ ΔΙΣΑΚΧΑΡΙΤΕΣ

Θεωρητικά, οποιαδήποτε πηγή υδατανθράκων που περιέχει πεντόζες ή εξόζες θα μπορούσε να χρησιμοποιηθεί ως πρώτη ύλη για την παραγωγή γαλακτικού οξέος. Αυτή η κατηγορία πηγών άνθρακα περιλαμβάνει υποπροϊόντα της βιομηχανίας τροφίμων, όπως η μελάσα και ο ορός γάλακτος. Οι μελάσες έχουν υψηλή περιεκτικότητα σε σακχαρόζη και είναι φθηνές και άφθονες, ενώ ο ορός γάλακτος έχει υψηλή περιεκτικότητα σε λακτόζη, η απόρριψη της οποίας αποτελεί μια σοβαρή περιβαλλοντική πρόκληση [65, 66]. Ένα άλλο υποπροϊόν που χρησιμοποιήθηκε με επιτυχία ως υπόστρωμα για την παραγωγή γαλακτικού οξέος είναι ο χυμός χουρμά [55].

#### 5.4.2.2 ΠΟΛΥΜΕΡΗ ΥΠΟΣΤΡΩΜΑΤΑ

Αυτά τα υποστρώματα περιέχουν πολυσακχαρίτες που τις περισσότερες φορές δεν μπορούν να αφομοιωθούν απευθείας από τους μικροοργανισμούς και χρειάζονται λοιπόν προηγουμένως να υδρολυθούν. Τα αμυλούχα υλικά περιέχουν άμυλο, ένα βιοπολυμερές από μονάδες γλυκόζης συνδεδεμένες μέσω δεσμών α(1-4) που σχηματίζουν αλυσίδες μεταβλητού μήκους, διακλαδισμένες μέσω δεσμών α(1-6) ή όχι. Στο άμυλο υπάρχουν δύο διαφορετικά κλάσματα πολυσακχαριτών, δηλαδή η αμυλόζη που έχει λίγες διακλαδώσεις και μακριές γραμμικές αλυσίδες και η αμυλοπηκτίνη με αντίθετα χαρακτηριστικά. Η παρασκευή διαλυμάτων γλυκόζης από αμυλούχα υλικά απαιτεί την υποβολή του υλικού σε προκαταρκτική υγροποίηση με θερμοσταθερή α-αμυλάση και την επακόλουθη σακχαροποίηση με α-αμυλάση και αμυλογλυκοσιδάση, η οποία αποτρέπει την ζελατινοποίηση του αμύλου [55, 67]. Τα διαλύματα γλυκόζης που προκύπτουν μπορούν να χρησιμοποιηθούν απευθείας ως πηγή άνθρακα για την παραγωγή γαλακτικού οξέος. Η ζύμωση αυτών των πρώτων υλών μπορεί να γίνει και άμεσα χωρίς την προεργασία υδρόλυσης με τη βοήθεια κάποιων μικροοργανισμών και της ικανότητας τους να απελευθερώνουν εξωκυτταρικές αμυλάσες. Από την άλλη πλευρά, η λιγνοκυτταρινική βιομάζα αποτελεί την πιο άφθονη παγκόσμια πηγή βιομάζας και για το λόγο αυτό έχει χρησιμοποιηθεί σε μεγάλο βαθμό σε πολλές εφαρμογές. Αποτελείται κυρίως από κυτταρίνη, ημικυτταρίνη και λιγνίνη που συνιστούν περίπου το 90% της ξηράς ουσίας. Τα λιγνοκυτταρινούχα υλικά μπορούν να χρησιμοποιηθούν για τη παραλαβή διαλυμάτων

σακχάρων που μπορούν να αξιοποιηθούν για την παραγωγή γαλακτικού οξέος μέσω των ακόλουθων σταδίων: α) προεπεξεργασία για τη διάσπαση της λιγνοκυτταρινούχου δομής, β) ενζυμική υδρόλυση για τον αποπολυμερισμό της λιγνοκυτταρίνης σε ζυμώσιμα σάκχαρα, γ) ζύμωση των σακχάρων σε γαλακτικό οξύ από βακτήρια γαλακτικού οξέος και δ) διαχωρισμός και καθαρισμός του γαλακτικού οξέος. Τα τελευταία χρόνια, μία από τις πιο συχνά χρησιμοποιούμενες διεργασίες για την παραλαβή γαλακτικού οξέος από λιγνοκυτταρινικά υλικά είναι η ταυτόχρονη σακχαροποίηση και ζύμωση (SSF), η οποία είναι σε θέση να αποτρέψει την αναστολή των ενζύμων από το προϊόν [55].

#### 5.4.3 ΑΜΕΣΗ ΖΥΜΩΣΗ ΑΠΟ ΜΥΚΗΤΕΣ

Οι μύκητες και τα βακτήρια είναι οι πιο ευρέως χρησιμοποιούμενοι μικροοργανισμοί για την παραγωγή γαλακτικού οξέος. Τα κύρια πλεονεκτήματα της χρήσης των μυκήτων ως ζυμωτικοί παράγοντες είναι η ικανότητά τους να απελευθερώνουν εξωκυτταρικές αμυλάσες, που είναι ικανές να υδρολύουν αμυλούχα υλικά, χωρίς να απαιτείται προηγούμενο στάδιο υδρόλυσης. Αυτοί οι μύκητες, οι οποίοι συνήθως ανήκουν στο γένος *Rhizopus* και παράγουν κυρίως το ισομερές I(+), έχουν χρησιμοποιηθεί με άμυλα από καλαμπόκι, ρύζι, πατάτα, σιτάρι και ανανά, καθώς και με υδρολυμένα κοτσάνια καλαμποκιού, ξύλο πεύκου και απόβλητα χαρτιού.

Τα βακτήρια γαλακτικού οξέος ονομάστηκαν έτσι λόγω της ικανότητάς τους να παράγουν γαλακτικό οξύ ως το κύριο (και μερικές φορές το μοναδικό) προϊόν της ζύμωσης της ζάχαρης. Τα περισσότερα βακτήρια γαλακτικού οξέος είναι αρνητικά ως προς την καταλάση, ακίνητα, δεν σχηματίζουν σπόρια και έχουν βέλτιστη θερμοκρασία ανάπτυξης μεταξύ 20 και 45 °C. Επιπλέον, έχουν υψηλή ανοχή σε όξινες συνθήκες (pH < 5), γεγονός που τους προσδίδει ανταγωνιστικό πλεονέκτημα έναντι άλλων βακτηρίων. Η επιλογή ενός κατάλληλου μικροοργανισμού επιτρέπει τη ζύμωση διαλυμάτων σακχάρων διαφορετικής προέλευσης [55]. Οι μικτές καλλιέργειες είναι προτιμότερες για ταυτόχρονη σακχαροποίηση και ζύμωση, όπου ο ένας οργανισμός χρησιμοποιείται για τη σακχαροποίηση και ο άλλος χρησιμοποιείται για τη ζύμωση [63].

#### 5.4.4 ΕΠΑΝΑΛΑΜΒΑΝΟΜΕΝΗ ΖΥΜΩΣΗ

Η ελαχιστοποίηση του απαιτούμενου χρόνου ζύμωσης, η οποία θα αύξανε και την παραγωγικότητα, είναι καθοριστικής σημασίας για την παραγωγή γαλακτικού οξέος με μικροβιακή ζύμωση. Για αυτό το λόγο, έχει εξεταστεί πειραματικά η εφαρμογή της επαναλαμβανόμενης ζύμωσης.

Η επαναλαμβανόμενη ζύμωση περιλαμβάνει επαναλαμβανόμενους κύκλους με εμβολιασμό ενός μέρους ή όλων των κυττάρων από μια προηγούμενη εκτέλεση στην επόμενη. Συγκριτικά με την απλή ζύμωση, η επαναλαμβανόμενη έχει πολλά πλεονεκτήματα, συμπεριλαμβανομένων της αύξησης της απόδοσης, της εξοικονόμησης χρόνου και των διαδικασιών εργασίας που απαιτούνται για τον καθαρισμό και την αποστείρωση του αντιδραστήρα, την υψηλή συγκέντρωση και παραγωγικότητα γαλακτικού οξέος, και σύντομο χρόνο ζύμωσης λόγω του υψηλού αρχικού όγκου εμβολιασμού [64].

### 5.5 ΚΑΘΑΡΙΣΜΟΣ ΓΑΛΑΚΤΙΚΟΥ ΟΞΕΟΣ

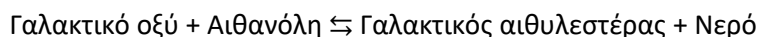
Ο καθαρισμός του γαλακτικού οξέος είναι ένα από τα πιο δαπανηρά στάδια της παραγωγικής διαδικασίας [68]. Μεγάλη προσοχή θα πρέπει να δοθεί στην προσθήκη υπολειμμάτων χαμηλού κόστους ή άλλων θρεπτικών ουσιών στο μέσο, διότι η απομάκρυνση των προσμίξεων μπορεί να αυξήσει σημαντικά το κόστος των σταδίων καθαρισμού. Οι μέθοδοι για τη μείωση των προσμίξεων στο τελικό προϊόν περιλαμβάνουν την εκχύλιση, το διαχωρισμό με μεμβράνες, την ανταλλαγή ιόντων, την ηλεκτροδιάλυση και την απόσταξη με χημική αντίδραση [55].

Η απόσταξη είναι μια εξαιρετικά δύσκολη διεργασία, λόγω της χαμηλής πτητικότητας του γαλακτικού οξέος και η ηλεκτροδιάλυση δεν μπορεί να διαχωρίσει τα φορτισμένα συστατικά, ιδίως τα μολυσματικά αμινοξέα και οργανικά οξέα. Από την άλλη πλευρά, η νανοδιήθηση σε συνδυασμό με τη διπολική ηλεκτροδιάλυση στον μεταγενέστερο καθαρισμό μπορεί να αντικαταστήσει τα πολλαπλά στάδια καθαρισμού με δύο μόνο στάδια [69].

## 6 ΓΑΛΑΚΤΙΚΟΣ ΑΙΘΥΛΕΣΤΕΡΑΣ

### 6.1 ΕΙΣΑΓΩΓΗ

Ο γαλακτικός αιθυλεστέρας (ethyl lactate) αποτελεί ένα φιλικό προς το περιβάλλον διαλύτη με δυνατότητες συγκρίσιμες με αυτές των διαλυτών που έχουν ως βάση το πετρέλαιο. Πρόκειται, λοιπόν για έναν πράσινο διαλύτη που παράγεται από την εστεροποίηση της αιθανόλης και του γαλακτικού οξέος, σύμφωνα με την αμφίδρομη αντίδραση [70]:



Οι οργανικοί εστέρες είναι μια πολύ σημαντική κατηγορία χημικών ουσιών που έχουν εφαρμογές σε διάφορους τομείς της χημικής βιομηχανίας, όπως στα αρώματα, στα φαρμακευτικά προϊόντα, ως πλαστικοποιητές, ως διαλύτες κ.τ.λ. Ο γαλακτικός αιθυλεστέρας είναι ένας σημαντικός μονοβασικός εστέρας, γνωστός και ως αιθυλεστέρας γαλακτικού οξέος (ονομασία IUPAC: Ethyl (S)-2-υδροξυπροπανοϊκό), με μοριακό τύπο  $C_5H_{10}O_3$ . Είναι ένα διαυγές έως ελαφρώς κίτρινο υγρό και βρίσκεται φυσικά σε μικρές ποσότητες σε μια ευρεία ποικιλία τροφίμων, όπως είναι το κρασί, το κοτόπουλο και μερικά φρούτα. Ο γαλακτικός αιθυλεστέρας μπορεί να είναι είτε σε μορφή λενο (S) είτε σε μορφή δεξτρο (R), και παράγεται βιομηχανικά ως ρακεμικό μείγμα μέσω αντιστρεπτής αντίδρασης μεταξύ αιθανόλης και γαλακτικού οξέος, όπου το νερό είναι υποπροϊόν [10].

Για να αξιολογηθεί πόσο πράσινο είναι ένα προϊόν, θα πρέπει να ποσοτικοποιούνται οι περιβαλλοντικές επιπτώσεις του χρησιμοποιώντας τη μεθοδολογία αξιολόγησης του κύκλου ζωής. Ο γαλακτικός αιθυλεστέρας είναι σύμφωνος με 8 από τις 12 αρχές της Πράσινης Χημείας που αναφέρθηκαν στην ενότητα 1.5.

Συγκεκριμένα, ο γαλακτικός αιθυλεστέρας:

- μπορεί να παραχθεί από ανανεώσιμες πρώτες ύλες και αποτελεί έτσι μια εναλλακτική, πιο φιλική προς το περιβάλλον λύση στους πετροχημικούς διαλύτες (7<sup>η</sup> αρχή).
- είναι 100% βιοδιασπώμενος, εύκολος στην ανακύκλωση, μη διαβρωτικός, μη καρκινογόνος και μη καταστρεπτικός για το όζον. Είναι πράγματι τόσο καλοήθης που μέχρι και ο Οργανισμός Τροφίμων και Φαρμάκων των ΗΠΑ ενέκρινε τη χρήση του στα τρόφιμα (3<sup>η</sup>, 4<sup>η</sup>, 10<sup>η</sup> αρχή).
- μπορεί να παραχθεί μέσω ετερογενούς κατάλυσης χωρίς τη χρήση περίσσειας οποιουδήποτε από τα αντιδρώντα. Με την εξάλειψη των ομοιογενών καταλυτών (συνήθως ορυκτά οξέα), μπορεί να αποφευχθεί η χρήση διαβρωτικών καταλυτών και ως εκ τούτου να εξαλειφθεί ένα περαιτέρω βήμα εξουδετέρωσης τους (1<sup>η</sup> και 9<sup>η</sup> αρχή).
- μπορεί να παραχθεί με τη χρήση υβριδικών τεχνολογιών, όπου η αντίδραση και ο διαχωρισμός τουλάχιστον ενός προϊόντος πραγματοποιείται σε μία μόνο ενότητα, εξαλείφοντας τη χρήση διαλυτών, μειώνοντας το κόστος κεφαλαίου (λιγότερες μονάδες διαχωρισμού) και απαιτώντας μικρότερη κατανάλωση ενέργειας (5<sup>η</sup> και 6<sup>η</sup> αρχή).

Όπως φαίνεται στο Σχήμα 9, ο γαλακτικός αιθυλεστέρας μπορεί εύκολα να ληφθεί από πρώτες ύλες υδατανθράκων, καθώς παράγεται από αιθανόλη και γαλακτικό οξύ, που με τη σειρά τους λαμβάνονται από τη ζύμωση βιομάζας. Επιπλέον, αποτελεί μια βιοδιασπώμενη ένωση με καλές ιδιότητες που μπορεί να έχει τις προδιαγραφές για χρήση ως πράσινος διαλύτης σε διάφορες εφαρμογές, όπως η οργανική σύνθεση, φαρμακευτικές προεργασίες, αρώματα, βιομηχανίες μελανιών και επιστρώσεων και πρόσθετα τροφίμων.



Σχήμα 9: Ο κύκλος ζωής του γαλακτικού αιθυλεστέρα.

## 6.2 ΙΔΙΟΤΗΤΕΣ ΚΑΙ ΕΦΑΡΜΟΓΕΣ ΤΟΥ ΓΑΛΑΚΤΙΚΟΥ ΑΙΘΥΛΕΣΤΕΡΑ

Ο γαλακτικός αιθυλεστέρας μπορεί να χρησιμοποιηθεί ως πρόσθετο στον τομέα των τροφίμων, στην αρωματοποιία, ως ενισχυτικό γεύσης και ως διαλύτες, που μπορούν να διαλύσουν την κυτταρίνη οξικού οξέος και πολλές ρητίνες [71]. Η κύρια εφαρμογή του είναι ως διαλύτης, και είναι ιδιαίτερα ελκυστικός στη βιομηχανία επιχρισμάτων λόγω της υψηλής διαλυτικότητας (Πίνακας 5) , του υψηλού σημείου ζέσεως (151 έως 155 °C), της χαμηλής πίεσης ατμών και επιφανειακής τάσης του (Πίνακας 5 , Πίνακας 6) [10].

Σχεδόν όλες οι βιομηχανίες παραγωγής και επεξεργασίας εξαρτώνται σε μεγάλο βαθμό από τη χρήση των διαλυτών. Ορισμένοι εμπειρογνώμονες του κλάδου των βιομηχανιών υποστηρίζουν ότι ο γαλακτικός αιθυλεστέρας θα μπορούσε να αντικαταστήσει τους παραδοσιακούς διαλύτες σε περισσότερο από το 80% των εφαρμογών τους. Παρ' όλα αυτά, η άποψη αυτή φαίνεται εξαιρετικά διογκωμένη, μιας που ο γαλακτικός αιθυλεστέρας είναι ένα πολικό πρωτικό προϊόν με πολύ υψηλό σημείο βρασμού και υπάρχουν εφαρμογές, για τις οποίες απαιτούνται μη πολικοί, απρωτικοί και με χαμηλότερο σημείο βρασμού διαλύτες. Ετησίως, μόνο στις ΗΠΑ η ζήτηση διαλυτών είναι περίπου 10 δισεκατομμύρια λίβρες με τιμές 0.90-1.79 \$ ανά λίβρα. Οι τιμές για τον γαλακτικό αιθυλεστέρα κυμαίνονται από 1.50 μέχρι 2.00 \$ ανά λίβρα, αλλά με την πρόοδο της επεξεργασίας θα μπορούσαν να φτάσουν τα 0.85-1.00 \$ ανά λίβρα, επιτρέποντας του έτσι να ανταγωνίζεται άμεσα τους διαλύτες που προέρχονται από πετρέλαιο και χρησιμοποιούνται ευρέως σήμερα. Επιπλέον, η ραγδαία αύξηση που παρουσιάζει το αργό πετρέλαιο καθιστούν τον γαλακτικό αιθυλεστέρα, ως πράσινο διαλύτη, πράγμα το οποίο είναι πιο ελκυστικό στον τομέα του εμπορίου, λόγω της αυξανόμενης όξυνσης της περιβαλλοντικής συνείδησης των πολιτών, οι οποίοι είναι πιο πρόθυμοι να πληρώσουν ακόμα και περισσότερο για προϊόντα που όμως είναι λιγότερο επιβλαβή για τον πλανήτη.

Πίνακας 5: Διαλυτικές ικανότητες του ethyl lactate και του πετροχημικού N-methyl pyrrolidone.

	Ethyl lactate	N-methyl pyrrolidone
Τιμή Kauri βουτανόλης (μέτρηση ισχύος του διαλύτη)	>1.000	350
<i>Παράμετροι Διαλυτότητας</i>		
Παράμετρος Hildebrand	21.3	23.1
Παράμετρος διασποράς Hansen	7.8	8.8
Παράμετρος πολικότητας Hansen	3.7	6.0
Παράμετρος δεσμών υδρόγονου Hansen	6.1	3.5
Αναμειξιμότητα	Αναμείξιμο με νερό και υδατάνθρακες	Αναμείξιμο με νερό και υδατάνθρακες

Πίνακας 6: Ιδιότητες γαλακτικού αιθυλεστέρα σε διάφορες θερμοκρασίες.

	278.15 K	298.15 K	318.15 K
<i>Πυκνότητα <math>\rho</math> (g.cm<sup>3</sup>)</i>	1.06	1.03	0.99
<i>Ιξώδες <math>\eta</math> (cP)</i>	4.55	2.21	1.26
<i>Πίεση Ατμών <math>P_{vp}</math> (mmHg)</i>	1.07	3.75	$1.12 \cdot 10^1$
<i>Ειδική θερμοχωρητικότητα υπό σταθερή πίεση <math>C_p</math> (Jmol<sup>-1</sup> K<sup>-1</sup>)</i>	$2.46 \cdot 10^{-2}$	$2.55 \cdot 10^{-2}$	$2.64 \cdot 10^{-2}$
<i>Ενθαλπία εξάτμισης <math>\Delta H^V</math> (Jmol<sup>-1</sup>)</i>	$6.17 \cdot 10^4$	$6.01 \cdot 10^4$	$5.84 \cdot 10^4$
<i><math>\lambda</math> (Wm<sup>-1</sup> K<sup>-1</sup>)</i>	$1.73 \cdot 10^{-1}$	$1.68 \cdot 10^{-1}$	$1.63 \cdot 10^{-1}$



Πίνακας 7: Ιδιότητες γαλακτικού αιθυλεστέρα.

Ιδιότητες	Ethyl lactate
Μοριακό Βάρος – $M$ (g/mol)	118.133
Σημείο τήξης – $T_f$ (K)	248.25
Σημείο ζέσης – $T_b$ (K)	426.15–427.15
Κρίσιμη Θερμοκρασία – $T_c$ (K)	588.00
Κρίσιμη Πίεση – $P_c$ (bar)	38.60
Κρίσιμος Όγκος – $V_c$ (cm <sup>3</sup> /mol)	354.0

Άλλες χρήσεις της ένωσης αυτής έχουν να κάνουν με την επίστρωση επιφανειών από ξύλο, πολυστυρένιο και μέταλλα, καθώς επίσης έχει αποδειχθεί η αποτελεσματικότητά του για την αφαίρεση χρωμάτων και γκράφιτι. Μπορεί, επίσης, να χρησιμοποιηθεί στις επιστρώσεις μαγνητικών ταινιών αντικαθιστώντας τους επικίνδυνους ατμοσφαιρικούς ρύπους. Ο γαλακτικός αιθυλεστέρας μπορεί να αντικαταστήσει διαλύτες όπως την Ν-μεθυλοπυρρολιδόνη, το τολουόλιο, την ακετόνη και το ξυλόλιο, γεγονός που καθιστά τον χώρο εργασίας ασφαλέστερο. Οι εφαρμογές του αιθυλεστέρα επεκτείνονται και χρησιμοποιείται ως μέσο καθαρισμού για τη βιομηχανία πολυουρεθάνης και για μεταλλικές επιφάνειες, συντελώντας αποτελεσματικά στην απομάκρυνση λιπών, ελαίων, συγκολλητικών ουσιών και στερεών καυσίμων. Έχει αποδειχθεί, ακόμη, η χρήση του στην απομάκρυνση του χαλκού από εδάφη που έχουν ρυπανθεί. Επίσης, έχει χρήσεις στις φαρμακοβιομηχανίες ως διαλυτικό/μέσο διασποράς για διάφορες βιολογικά δραστικές ενώσεις, χωρίς να παρεμποδίζεται ή να καταστρέφεται η φαρμακολογική δραστηριότητα του δραστικού συστατικού. Έχει, επιπλέον πολύ σημαντικό ρόλο στη διαλυτοποίηση βιολογικά ενεργών ενώσεων που είναι δύσκολο να διαλυθούν στα συνήθη έκδοχα. Ο γαλακτικός αιθυλεστέρας μπορεί ακόμα να χρησιμοποιηθεί ως μια πιο φιλική προς το περιβάλλον εναλλακτική λύση για την παραγωγή 1,2-προπανοδιόλης, η οποία συνήθως παράγεται από την αντίδραση ενυδάτωσης του οξειδίου του προπυλενίου, που προέρχεται από πετροχημικές πηγές.

Στις διεργασίες φαρμακευτικών βιομηχανιών χρησιμοποιούνται πληθώρα διαλυτών, καθώς περίπου το 80% της συνολικής μάζας των χημικών ουσιών που χρησιμοποιούνται για τη φαρμακευτική παραγωγή είναι διαλύτες [71, 10]. Ο επανασχεδιασμός των συνθετικών διεργασιών προκειμένου να μειωθεί η ποσότητα του διαλύτη που χρησιμοποιείται και η χρήση μη τοξικών και μη επιβλαβών διαλυτών που ανακτώνται και επαναχρησιμοποιούνται εύκολα είναι μείζονος σημασίας. Για τον λόγο αυτό, ο γαλακτικός αιθυλεστέρας προβάλλεται σήμερα ως ένας ελκυστικός διαλύτης για χημικές αντιδράσεις από περιβαλλοντικής άποψης, καθώς έχει χρησιμοποιηθεί για την πιο πράσινη σύνθεση αρυλικών αλδιμινών, για την εκχύλιση φυτοστερολών από υγρές ίνες καλαμποκιού, οι οποίες παρέχουν ένα ελαιώδες προϊόν με ελεύθερες φυτοστερόλες και ελεύθερα λιπαρά οξέα και για την εκχύλιση καρροτενοειδών, που αποτελούν αποτελεσματικούς διαλύτες τόσο για τα cis όσο και για τα trans ισομερή του λυκοπενίου από ξηρή σκόνη ντομάτας [10].

### 6.3 ΤΡΟΠΟΣ ΠΑΡΑΓΩΓΗΣ ΤΟΥ ΓΑΛΑΚΤΙΚΟΥ ΑΙΘΥΛΕΣΤΕΡΑ

Όπως προαναφέρθηκε ο γαλακτικός αιθυλεστέρας είναι ένας εστέρας που παράγεται από την αντίδραση της αιθανόλης με το γαλακτικό οξύ. Η αντίδραση αυτή λειτουργεί σε όξινο περιβάλλον και για τον λόγο αυτό χρησιμοποιούνται είτε ομογενείς είτε ετερογενείς όξινοι καταλύτες [71]. Η προσέγγιση αυτή όμως είναι ακριβή λόγω των δαπανηρών διαδικασιών διαχωρισμού και καθαρισμού του γαλακτικού οξέος, το κόστος των οποίων εκτιμάται ότι αποτελούν περίπου το μισό του συνολικού για την παραγωγή υψηλής καθαρότητας γαλακτικού οξέος. Η σύνθεση του γαλακτικού αιθυλεστέρα απευθείας από γαλακτικά άλατα που λαμβάνονται από τη ζύμωση γαλακτικού οξέος μπορεί να συμβάλει στη μείωση του μεγάλου κόστους παραγωγής αυτής της ένωσης.

Και τα δυο αντιδρώντα που χρησιμοποιούνται, αιθανόλη και γαλακτικό οξύ, αποτελούν σημαντικά δομικά στοιχεία των βιοδιυλιστηρίων και είναι διαθέσιμα σε βιομηχανική κλίμακα. Οι διεργασίες παρασκευής του γαλακτικού αιθυλεστέρα έχουν πατενταριστεί και έχουν λάβει χώρα στη βιομηχανία. Ωστόσο οι διεργασίες αυτές χαρακτηρίζονται από χαμηλούς ρυθμούς αντίδρασης και κατά συνέπεια υψηλό κόστος κεφαλαίου και κόστος λειτουργίας. Έχουν αναπτυχθεί διάφοροι εναλλακτικοί τρόποι παραγωγής του, από τους οποίους οι διεργασίες με χρήση μεμβρανών και η δραστική απόσταξη είναι οι πιο υποσχόμενοι.

Κατά την διάρκεια της αντίδρασης εστεροποίησης παράγεται ως παραπροϊόν νερό, με την απομάκρυνση του οποίου υπερνικάται ο περιορισμός της ισορροπίας των συμβατικών αντιδραστηρίων. Η χημική ισορροπία αποκαθίσταται ακολουθώντας τον νόμο της μαζικής δράσης, και επομένως μπορεί να επιτευχθεί η μετατροπή του γαλακτικού οξέος και πάνω από την ισορροπία της παρτίδας. Η κινητήρια δύναμη διατηρείται σε υψηλό επίπεδο και η κινητική της αντίδρασης ενισχύεται, με αποτέλεσμα η ενεργειακή απόδοση και η χωροχρονική απόδοση τέτοιων διαδικασιών να είναι σημαντικά υψηλότερη.

Η παραγωγή γαλακτικού αιθυλεστέρα μέσω αντιδραστικής απόσταξης έχει εξεταστεί και έχει επιτευχθεί πάνω από 90% μετατροπή γαλακτικού οξέος και απόδοση σε παραγωγή γαλακτικού οξέος 73%. Επειδή η εστεροποίηση και ο διαχωρισμός αιθανόλης-νερού γίνεται σε μία μόνο συσκευή λαμβάνονται ως αποτέλεσμα μεγάλες ποσότητες ολιγομερών στο ρεύμα του ακτέργαστου προϊόντος και άρα κρίνεται απαραίτητη μια πρόσθετη μονάδα επεξεργασίας για εξευγενισμό. Η διεργασία βελτιστοποιήθηκε όσον αφορά την κινητική της αντίδρασης με πειράματα σε εργαστηριακό επίπεδο και συγκρίθηκε με μια σειριακή διάταξη αντιδραστήρων και μονάδων απόσταξης. Μείζονος σημασίας αποτέλεσαν οι απαιτήσεις για τις πρώτες ύλες και ο αποτελεσματικός διαχωρισμός του νερού και πραγματοποιήθηκαν υπολογισμοί σχετικά με τα ισοζύγια υλικών και ενέργειας. Με βάση τα αποτελέσματα προτάθηκε μια συνεχής διαδικασία παραγωγής που χρησιμοποιεί απόσταξη για εντατικοποίηση της διαδικασίας. Αυτές οι ενέργειες περιγράφουν την προετοιμασία για πιλοτική εφαρμογή. Για τον ευκολότερο διαχωρισμό χρησιμοποιήθηκε ετερογενής καταλύτης και συγκεκριμένα επιλέχθηκαν οι ρητίνες Amberlyst επειδή παρουσιάζουν ευνοϊκές καταλυτικές ιδιότητες σε χαμηλές συγκεντρώσεις του νερού. Δοκιμάστηκαν 3 διαφορετικές ρητίνες ανταλλαγής κατιόντων σε αντιδραστήρες διαλλείποντος έργου. Η χρήση των αντιδρώντων με μοριακό λόγο αιθανόλης-γαλακτικού οξέος  $n_{\text{EtOH}}/n_{\text{LA}} = 3/1$  βρέθηκε ως βέλτιστη τιμή, η οποία και εφαρμόστηκε στα πειράματα [72].

Οι χημικές ουσίες που προστίθενται στην είσοδο, ειδικά το γαλακτικό οξύ έχουν υψηλές ποσότητες νερού, το οποίο είναι ανεπιθύμητο στη διαδικασία, και ως παραπροϊόν στην αντίδραση εστεροποίησης περιορίζει τον ρυθμό αντίδρασης και τη μετατροπή του γαλακτικού οξέος [72, 10]. Η κινητική της αντίδρασης έχει μελετηθεί για διάφορες συγκεντρώσεις γαλακτικού οξέος, από αραιό διάλυμα 20% w/w σε γαλακτικό οξύ μέχρι πυκνό 88% w/w. Λόγω της δομής του, το γαλακτικό οξύ υφίσταται ενδομοριακή αυτοεστεροποίηση και τείνει

να σχηματίζει ολιγομερή σε συμπυκνωμένα διαλύματα. Ο ολιγομερισμός αυτός μειώνεται με την αύξηση της συγκέντρωσης της αιθανόλης. Έτσι εάν ένα διάλυμα γαλακτικού οξέος 88% w/w αναμιγνύεται με αιθανόλη σε μοριακή αναλογία  $n_{\text{EtOH}}/n_{\text{LA}} = 1/1$ , η περιεκτικότητα σε ολιγομερή είναι στο 2.4% ενώ για αναλογία  $n_{\text{EtOH}}/n_{\text{LA}} = 3/1$  μειώνεται στο 0.4%.

Η παραγωγή του γαλακτικού αιθυλεστέρα δεν είναι μια απλή εργασία απόσταξης, όπου ένα από τα προϊόντα της αντίδρασης παρουσιάζει τη χαμηλότερη ή την υψηλότερη πτητικότητα του μίγματος. Η ολική μετατροπή του οξέος και η ανάκτηση του εστέρα ως καθαρό προϊόν, δεν μπορεί να επιτευχθεί εύκολα, με απλή βελτιστοποίηση των συνθηκών λειτουργίας της αποστακτικής στήλης. Χρησιμοποιώντας για τον σχηματισμό του γαλακτικού οξέος, μια στήλη απόσταξης με reflux ratio > 0, θα οδηγούσε στη συγκέντρωση της αιθανόλης στο απόσταγμα και στη συγκράτηση του νερού στο σύστημα. Θεωρείται ότι με την αύξηση της καθαρότητας της τροφοδοσίας της αιθανόλης αυξάνεται και η ικανότητα απομάκρυνσης νερού [10].

Στη δραστική απόσταξη, όπου η ετερογενώς καταλυόμενη αντίδραση εστεροποίησης συνδυάζεται με τον ταυτόχρονο διαχωρισμό, διάφορες είναι οι επιπλοκές που μπορεί να συμβούν και να δράσουν περιοριστικά στη μετατροπή του γαλακτικού οξέος:

- Η χημική αντίδραση στο καταλυτικό σημείο, χαρακτηριζόμενη από την συγκέντρωση των συστατικών και την καταλυτική ικανότητα των σωματιδίων του καταλύτη.
- Μεταφορά μάζας μεταξύ καταλύτη και του όγκου του διαλύματος (για τις ρητίνες Amberlyst αυτό μπορεί να προσπελαθεί με μέτρια ταχύτητα ανάδευσης).
- Σχετικά με την απόσταξη, ο διαχωρισμός του νερού από τον κύριο όγκο μπορεί να είναι αυτός που καθορίζει τον ρυθμό της αντίδρασης [10].

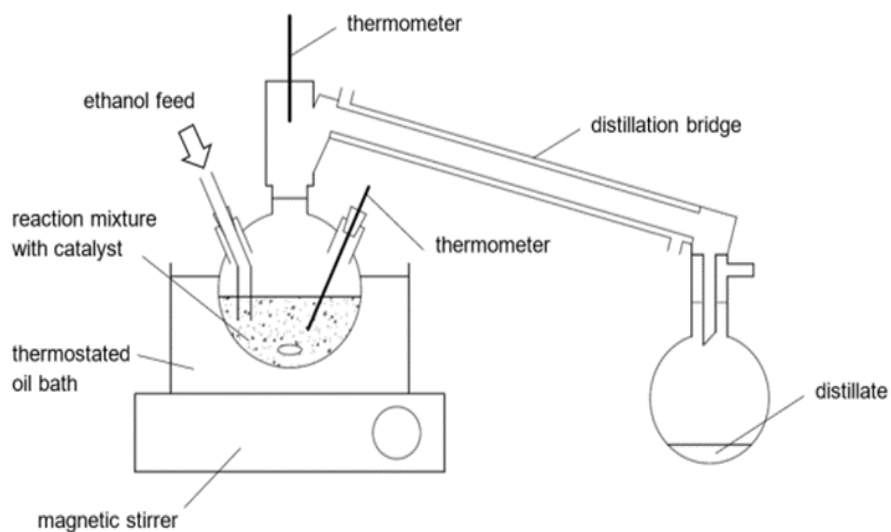
#### 6.3.1 ΠΕΙΡΑΜΑΤΑ ΣΕ BATCH ΑΝΤΙΔΡΑΣΤΗΡΑ

Σύμφωνα με τους Stipsitz P., Mandl M., & Harasek M., που έκαναν αξιολόγηση των διαφορετικών καταλυτών και των διαφορετικών αρχικών ποσοτήτων των αντιδρώντων (kg μίγματος) σε πειράματα διαλλείποντος έργου, προέκυψαν τα παρακάτω συμπεράσματα:

- μεταξύ των τριών καταλυτών (Amberlyst 46, Amberlyst 48, Amberlyst 15 που δοκιμάστηκαν για την εστεροποίηση σε κλάσμα βάρους  $w_{\text{cat}}=0.1$ , την υψηλότερη καταλυτική δραστηριότητα παρουσίασε το Amberlyst 46.
- μεταξύ των διαφορετικών διαλυμάτων γαλακτικού οξέος, αυτά με το χαμηλότερο κλάσμα νερού ευνοούν την μετατροπή στην ισορροπία. Με την αφυδάτωση η χημική ισορροπία επιτεύχθηκε μετά από 1h και με 71% μετατροπή, ενώ χωρίς αφυδάτωση με αρχικό κλάσμα νερού ίσο με 19% η ισορροπία επιτεύχθηκε μετά από 2.5 ώρες με μετατροπή γαλακτικού οξέος 59%. Η αφαίρεση του νερού, λοιπόν, από την τροφοδοσία γαλακτικού οξέος πριν από την ανάμιξη με αιθανόλη έδειξε βέλτιστα αποτελέσματα.

#### 6.3.2 ΔΡΑΣΤΙΚΗ ΑΠΟΣΤΑΞΗ ΣΕ ΗΜΙΔΙΑΛΕΙΠΟΝΤΟΣ ΕΡΓΟΥ ΑΝΤΙΔΡΑΣΤΗΡΕΣ

Για την πραγματοποίηση της δραστικής απόσταξης χρησιμοποιήθηκε μια συμβατική απόσταξη όπως παρουσιάζεται και στο Σχήμα 10 με διαφορετικές καθαρότητες των αρχικών αντιδραστηρίων. Το απόσταγμα συλλεγόταν συνεχώς μέσω μιας γέφυρας απόσταξης και ανά 10 λεπτά γινόταν προσθήκη αιθανόλης για να αντισταθμιστούν οι απώλειες σε αιθανόλη και να διατηρηθεί η αρχική μοριακή αναλογία αιθανόλη/γαλακτικού οξέος στο 3/1.



Σχήμα 10: Διάταξη παραγωγής γαλακτικού αιθυλεστέρα.

Τα αποτελέσματα έδειξαν ότι όταν χρησιμοποιήθηκε αιθανόλη καθαρότητας 96%, η αντιδραστική απόσταξη είχε παρόμοια απόδοση με αυτή των batches, ενώ η μετατροπή ήταν κάτω από την αντίστοιχη που επιτεύχθηκε στα batches. Μετά από 1 ώρα επιτεύχθηκε 70% μετατροπή και έπειτα η αντίδραση προχώρησε περαιτέρω και μετά από 3.1 ώρες, η μετατροπή ήταν ίση με 75%. Χρησιμοποιώντας αφυδατωμένη αιθανόλη (99.9%) από την αρχή τα αποτελέσματα είναι βέλτιστα με μετατροπή 90% μετά από 2.27 ώρες αντίδρασης [72].

## ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ

### 7 ΣΚΟΠΟΣ

Στόχος της παρούσας διπλωματικής είναι η διερεύνηση παραγωγής βιοαιθανόλης και γαλακτικού οξέος, χρησιμοποιώντας ως πρώτη ύλη απόβλητο βιομηχανίας παραγωγής βρεφικών τροφών, καθώς και της παραγωγής του εστέρα που προκύπτει από την αντίδραση αυτών των δύο ενώσεων, του γαλακτικού αιθυλεστέρα. Η πειραματική διαδικασία που ακολουθήθηκε για την παραγωγή αιθανόλης περιλαμβάνει την πραγματοποίηση της σακχαροποίησης των σακχάρων ταυτόχρονα με τη ζύμωση της αιθανόλης (Simultaneous Saccharification and Fermentation – SSF). Αντίστοιχα για την πειραματική διαδικασία παραγωγής του γαλακτικού οξέος πραγματοποιήθηκαν διάφορα πειράματα με τη χρήση μείγματος γαλακτοβακίλλων και μεικτής καλλιέργειας γαλακτοβάκιλλων και ζυμομυκήτων σε ελεύθερες συνθήκες. Έπειτα μελετήθηκε η παραγωγή του γαλακτικού αιθυλεστέρα μέσω της πραγματοποίησης της αμφίδρομης αντίδρασης αιθανόλης (χημική ή βιολογική) και γαλακτικού οξέος.

## 8 ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΗ ΜΕΘΟΔΟΛΟΓΙΑ

### 8.1 ΠΡΩΤΗ ΥΛΗ

Στην παρούσα διπλωματική εργασία, χρησιμοποιήθηκαν απόβλητα βιομηχανίας παραγωγής βρεφικών τροφών ως πρώτη ύλη για την παραγωγή της αιθανόλης και του γαλακτικού οξέος. Η πρώτη ύλη χαρακτηρίστηκε ως προς τις ακόλουθες παραμέτρους, σύμφωνα με τις πρότυπες μεθόδους ανάλυσης που περιγράφονται παρακάτω:

- Υγρασία
- Άμυλο
- Άζωτο
- Μη διαλυτό υπόλειμμα
- Ολικά στερεά (TS)
- Υδατοδιαλυτά στερεά (WS)
- Πτητικά στερεά (VS).

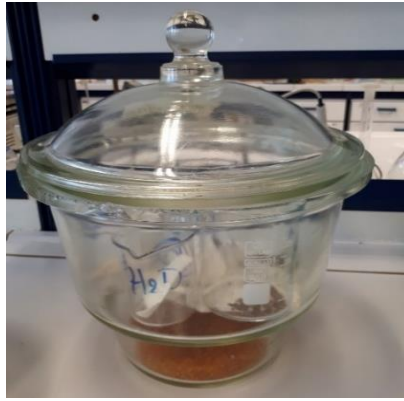
### 8.2 ΜΕΘΟΔΟΙ ΑΝΑΛΥΣΗΣ

#### 8.2.1 ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟΣ ΟΛΙΚΩΝ ΣΤΕΡΕΩΝ (TS)

Για τον προσδιορισμό των ολικών στερεών TS ζυγίζεται ποσότητας 2-3g στερεού σε ζυγό ακριβείας τριών δεκαδικών ψηφίων. Στη συνέχεια, τα δείγματα τοποθετήθηκαν σε προζυγισμένες κάψες πορσελάνης και μπήκαν σε φούρνο ξήρανσης Carbolite, που φαίνεται παρακάτω (Σχήμα 11), στους 105°C για 24 ώρες. Μετά τις 24ώρες τα δείγματα τοποθετούνται για 15λεπτά σε αφυγραντήρα (Σχήμα 12), ώστε να αποκτήσουν θερμοκρασία δωματίου και έπειτα ζυγίζονται. Παράλληλα με την διαδικασία προσδιορισμού των ολικών στερεών TS, σε ένα μεγάλο ποτήρι ζέσεως τοποθετείται δείγμα αποβλήτου (περίπου 10-15 g), το οποίο χρησιμοποιείται για τον υπόλοιπο χαρακτηρισμό. Αφού μπαίνει στο φούρνο ξήρανσης στους 105°C για 24 ώρες, μετριέται η υγρασία από την συσκευή μέτρησης υγρασίας, ώστε να ελεγχθεί ότι είναι κάτω από 10%.



Σχήμα 11: Φούρνος ξήρανσης Carbolite.



Σχήμα 12: Αφυγραντήρας.

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

$$\%TS = \left( \frac{m_f}{m_i} \right) \cdot 100$$

$$m_i = m_2 - m_1$$

$$m_f = m_3 - m_2$$

#### 8.2.2 ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟΣ ΠΗΤΤΙΚΩΝ ΣΤΕΡΕΩΝ (VS)

Η μέθοδος αυτή χρησιμοποιείται για τον προσδιορισμό του περιεχόμενου οργανικού φορτίου ενός στερεού δείγματος μέσω της καύσης του σε υψηλή θερμοκρασία για συγκεκριμένο χρονικό διάστημα. Η πειραματική διαδικασία που ακολουθήθηκε αναλύεται παρακάτω.

Αρχικά, ζυγίστηκε περίπου 0.5-1 g για κάθε δείγμα και αυτά τοποθετήθηκαν σε προζυγισμένες κάψες. Μετά, τα δείγματα μπήκαν στο φούρνο Barnstead Thermolyne (Σχήμα 13) στους 550 °C για 4 ώρες. Ο φούρνος που χρησιμοποιείται για τη μέτρηση των πτητικών στερεών απεικονίζεται στο Σχήμα 13.



Σχήμα 13: Φούρνος Barnstead Thermolyne.

Μετά από 4-5 ώρες οι κάψες τοποθετούνται για 15λεπτά στον αφυγραντήρα, για να έρθουν σε θερμοκρασία περιβάλλοντος και ζυγίζονται ξανά οι κάψες μαζί με τα περιεχόμενα δείγματα.

Η εκτίμηση του οργανικού φορτίου έγινε με τον υπολογισμό της απώλειας μάζας πριν και μετά την εισαγωγή του στο φούρνο στους, όπου πραγματοποιείται καύση και οι οργανικές ουσίες οξειδώνονται. Για αυτό και η απώλεια βάρους που υπολογίζεται αποτελεί στην ουσία

μέτρο των οργανικών ουσιών που περιέχονται στα στερεά, παρόλο που κατά την 48 καύση απομακρύνονται μερικές φορές και ορισμένα ανόργανα πτητικά συστατικά του δείγματος.

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

$$\%VS = \left( \frac{m_i - m_f}{m_i} \right) \cdot 100$$

$$m_i = m_2 - m_1$$

$$m_f = m_3 - m_1$$

όπου:

$m_i$  = η αρχική μάζα ξηρού δείγματος.

$m_f$  = η τελική μάζα μετά από 4 ώρες στους 550°C.

### 8.2.3 ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟΣ ΥΔΑΤΟΔΙΑΛΥΤΩΝ ΣΤΕΡΕΩΝ (WS – WATER SOLUBLE SOLIDS)

Για τον προσδιορισμό των ολικών υδατοδιαλυτών στερεών αρχικά λαμβάνονται 2.5 g από κάθε δείγμα TS. Αυτά τοποθετούνται μαζί με 100 mL απιονισμένου νερού σε γυάλινα μπουκαλάκια τα οποία σφραγίζονται. Στη συνέχεια, τα γυάλινα μπουκαλάκια τοποθετούνται στο ανακινούμενο αερόλουτρο IKA KS 30001 control (Σχήμα 14) σε θερμοκρασία 50 °C και ταχύτητα ανάδευσης 130 rpm για 1 ώρα.



Σχήμα 14: Ανακινούμενο αερόλουτρο IKA KS 30001 control.

Μετά το πέρας της 1 ώρας, τα δείγματα φυγοκεντρούνται (Σχήμα 15) και διηθούνται για να συλλεχθεί η στερεή και η υγρή φάση. Η στερεή φάση των δειγμάτων ζυγίζεται και τοποθετείται σε προζυγισμένα ποτήρια ζέσεως, τα οποία μπαίνουν στον φούρνο ξήρανσης στους 105 °C για 24 ώρες. Μετά το πέρας των 24 ωρών, τα δείγματα τοποθετούνται στον αφυγραντήρα για περίπου 15 λεπτά και ακολούθως ζυγίζονται. Συλλέγεται η υγρή φάση των δειγμάτων, ώστε να μετρηθεί η ελεύθερη γλυκόζη με GOD/PAP.





Σχήμα 15: Φυγόκεντρος IEC CENTRA CL2.

Τα ολικά υδατοδιαλυτά στερεά υπολογίζονται σύμφωνα με την εξίσωση:

$$\%WS = \left( \frac{m_i - m_f}{m_i} \right) \cdot 100$$

$$m_i = m_2 - m_1$$

$$m_f = m_3 - m_1$$

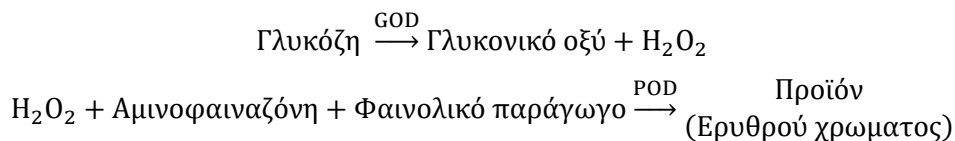
όπου:

$m_i$  = αρχική μάζα στερεού ξηρού δείγματος.

$m_f$  = τελική μάζα στερεού μετά το πέρας 24 ωρών στους 105 °C .

#### 8.2.4 ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟΣ ΕΛΕΥΘΕΡΗΣ ΓΛΥΚΟΖΗΣ (FREE SUGARS)

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 παραγώγου με τη δράση της υπεροξειδάσης μετατρέπεται σε κάποιο προϊόν ερυθρού χρώματος το οποίο παρουσιάζει μέγιστη απορρόφηση στα 510 nm. 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.

##### 8.2.4.1 ΚΑΤΑΣΚΕΥΗ ΚΑΜΠΥΛΗΣ ΑΝΑΦΟΡΑΣ ΜΕ ΤΗ ΜΕΘΟΔΟ 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 1 g/L. Πραγματοποιούνται αραιώσεις του παραπάνω διαλύματος με απιονισμένο νερό, έτσι ώστε να προκύψουν διαλύματα γλυκόζης 0.25, 0.5, 0.75 g/L.

2. Σε 8 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 10 min.

5. Επιλέγεται στο φωτόμετρο (Σχήμα 16) 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.



Σχήμα 16: Φωτόμετρο Spectroquant Pharo 300 Merck.

Από την εξίσωση της καμπύλης λαμβάνεται ο συντελεστής που μετατρέπει την απορρόφηση γλυκόζης στα 510 nm σε συγκέντρωση.

Για τον προσδιορισμό της ελεύθερης γλυκόζης στα προς μελέτη υλικά άγνωστης συγκέντρωσης, χρησιμοποιήθηκαν τα διηθήματα που προέκυψαν μετά από την ενζυμική υδρόλυση των δειγμάτων. Στα διηθήματα αυτά, αρχικά πραγματοποιήθηκε πραγματοποιείται η κατάλληλη αραιώση ανάλογα το υπόστρωμα. Στη συνέχεια, προστέθηκαν σε δοκιμαστικούς σωλήνες 2 mL διαλύματος εργασίας και 0.1 mL διηθήματος από κάθε αραιωμένο διάλυμα. Για την παρασκευή του τυφλού, προστέθηκαν σε δοκιμαστικό σωλήνα 2 mL διαλύματος εργασίας και 0.1 mL απιονισμένου νερού. Ακολούθως, οι δοκιμαστικοί σωλήνες τοποθετήθηκαν για επώαση στο υδατόλουτρο σε θερμοκρασία 37°C για 10 λεπτά.

Μετά το πέρας της επώασης κάθε ένας δοκιμαστικός σωλήνας αναδεύεται στη συσκευή Vortex-Genie 2 και ακολουθεί η φωτομέτρηση, στο φωτόμετρο (Σχήμα 16) σε μήκος κύματος 510 nm. Το φωτόμετρο πριν την έναρξη της φωτομέτρησης των δειγμάτων μηδενίστηκε 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 χρωματιζόταν αυτό θα σήμαινε ή ότι το δείγμα δεν περιείχε γλυκόζη ή ότι η γλυκόζη έχει καταναλωθεί από μικροοργανισμούς αν τυχόν το διήθημα είχε μείνει αρκετή ώρα εκτός ψυγείου.

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

$$\text{Ελεύθερη γλυκόζη}(\% \text{ w/w}) = \frac{0.6254 \cdot \text{ABS}_{\text{mean}} \cdot D \cdot V \cdot 10^{-3}}{\text{Initial Solid}} \cdot 100$$

όπου:

$ABS_{\text{mean}}$  = ο μέσος όρος απορρόφησης.

$D$  = η αραιώση που έχει πραγματοποιηθεί στο διάλυμα ( $D=1$  όταν το διάλυμα παραμένει χωρίς αραιώση,  $D=10$  όταν η αραιώση είναι  $1/10$ ).

$V$  = ο συνολικός όγκος του διηθήματος.

Initial solid: η αρχική μάζα του δείγματος.

#### 8.2.5 ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟΣ ΟΛΙΚΟΥ ΑΜΥΛΟΥ (STARCH)

Η διαδικασία προσδιορισμού του ολικού αμύλου βασίζεται στην ενζυμική μέθοδο η οποία κάνει χρήση των ενζύμων αμυλογλυκοζοξειδάση και  $\alpha$ -αμυλάση. Τα εν λόγω χρησιμοποιούμενα ένζυμα περιλαμβάνονται στο σετ αντιδραστηρίων που παρέχει η εταιρεία Megazyme προκειμένου για τον προσδιορισμό του ολικού αμύλου.

Τα βήματα της διαδικασίας που ακολουθήθηκε είναι τα εξής :

1. Από τα στερεά υπολείμματα τα οποία προέκυψαν από τη διαδικασία προσδιορισμού των ολικών υδατοδιαλυτών σακχάρων λαμβάνεται μάζα ίση με 100 mg και τοποθετείται σε γυάλινα φιαλίδια. Το στερεό πρέπει να βρίσκεται στον πάτο των φιαλιδίων και όχι στα τοιχώματα.
2. Εκτός από τα ανωτέρω γυάλινα φιαλίδια ετοιμάζονται ένα ακόμα με την προσθήκη 0.1 mL Sodium acetate buffer με  $pH = 5$  ή 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. Η ανάδευση είναι πολύ σημαντική, για να βοηθήσει την πλήρη διάλυση του σε δείγματα με υψηλή περιεκτικότητα σε άμυλο.
4. Στα γυάλινα φιαλίδια προστίθενται 2mL NaOH 2M και αναδεύονται για 15 sec στη συσκευή ανάδευσης Vortex Genie 2. Τα φιαλίδια τοποθετούνται σε παγόλουτρο για 15 min, με παράλληλη ανάδευση κάθε 5 min. Είναι σημαντικό να μην υπάρχουν σβώλοι στο δείγμα.
5. Μετά την αφαίρεση τους από το παγόλουτρο ακολουθεί η προσθήκη 8 mL ρυθμιστικού διαλύματος οξικού νατρίου ( $CH_3COONa$ , sodium acetate buffer) με  $pH = 3.8$ , 0.1 mL  $\alpha$ -αμυλάσης ( $\alpha$ -amylase) και 0.1 mL αμυλογλυκοσιδάσης (AMG: amyloglucosidase). Στο τυφλό δείγμα, αντί για την προσθήκη ενζύμων, γίνεται προσθήκη 0.2 mL από το Sodium acetate buffer με  $pH = 5$ .
6. Τα δείγματα αναδεύονται και τοποθετούνται σε υδατόλουτρο σε θερμοκρασία 50 °C για 30 min με παράλληλη έντονη ανάδευση τους κάθε 5 min. Μετά το πέρας των 30 min τα δείγματα τοποθετούνται για φυγοκέντρηση για 10 min, με ταχύτητα φυγοκέντρησης 3000 rpm, στη συσκευή φυγοκέντρησης (Σχήμα 15).
7. Μετά τη φυγοκέντρηση ακολουθεί η μέθοδος προσδιορισμού της ελεύθερης γλυκόζης GOPOD στο υπερκείμενο υγρό. Το υπερκείμενο υγρό αραιώνεται με  $D = 5$  ( $D = 11$  στην περίπτωση υψηλού αμύλου) και στη συνέχεια για κάθε δείγμα συμπεριλαμβανομένων και των τυφλών, ετοιμάζονται δοκιμαστικοί σωλήνες, στους οποίους προστίθενται 0.1 ml αραιωμένου διαλύματος και 3 mL διαλύματος εργασίας (GOPOD). Οι δοκιμαστικοί σωλήνες επωάζονται στους 50 °C για 20 min σε υδατόλουτρο και τέλος φωτομετρώνται σε μήκος κύματος 510 nm, μετά από ανάδευση στη συσκευή ανάδευσης Vortex Genie 2 και μηδενισμό του φωτομέτρου (Σχήμα 16) με απιονισμένο νερό.

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

$$C_{\text{γλυκόζης}} (\% \text{ w/w}) = \frac{0.9053 \cdot ABS_{\text{mean}} \cdot D \cdot 10.4 \cdot 10^{-3}}{\text{initial solid}} \cdot 100$$

$$\text{Ολικό άμυλο (\% w/w)} = C_{\text{γλυκόζης}} \cdot \left( \frac{M_{r,\text{starch}}}{M_{r,\text{glucose}}} \right)$$

όπου:

$ABS_{\text{mean}}$ : ο μέσος όρος απορρόφησης.

$D$ : Η αραίωση που έχει πραγματοποιηθεί στο διάλυμα ( $D=1$  όταν το διάλυμα δεν υφίσταται αραίωση,  $D = 5$  όταν η αραίωση είναι 1:5 και  $D=10$  όταν η αραίωση είναι 1/10)

10.4 (mL): προκαθορισμένη τιμή συνολικού όγκου

Initial Solid: η μάζα του δείγματος που χρησιμοποιήθηκε

$$\frac{M_{r,\text{starch}}}{M_{r,\text{glucose}}} = 0.9$$

### 8.2.6 ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟΣ ΑΙΘΑΝΟΛΗΣ

Για τον προσδιορισμό της αιθανόλης ακολουθείται η μέθοδος Megazymes χρησιμοποιούμενα ένζυμα περιλαμβάνονται στο σετ αντιδραστηρίων που παρέχει η εταιρεία Megazyme προκειμένου για τον προσδιορισμό της αιθανόλης [73].

1. Τοποθετούνται σε γυάλινο φιαλίδιο 2 mL από το πρότυπο διάλυμα αιθανόλης Reagent 1 και προστίθεται 0.1 mL από το δείγμα.
2. Σε ένα άλλο γυάλινο φιαλίδιο κατασκευάζεται το τυφλό δείγμα όπου τοποθετούνται σε γυάλινο φιαλίδιο 2 mL από το πρότυπο δείγμα αιθανόλης Reagent 1 και προστίθεται 0.1 mL από απιονισμένο νερό.
3. Μετά το πέρας 3 λεπτών προστίθενται στα γυάλινα φιαλίδια 0.5 mL από το πρότυπο διάλυμα αιθανόλης Reagent 2 και αφήνονται σε ηρεμία.
4. Μετά το πέρας 7 λεπτών τα δείγματα φωτομετρώνται εφόσον έχει επιλεγθεί η μέθοδος με τον AutoSelector, μετά από ανάδευση στη συσκευή ανάδευσης Vortex Genie 2 και μηδενισμό του φωτομέτρου με απιονισμένο νερό.

### 8.3 ΑΠΟΔΟΣΕΙΣ

Προκειμένου να γίνουν κατανοητοί οι υπολογισμοί που ακολουθούν, παρατίθενται κάποιοι χρήσιμοι ορισμοί.

$$\text{Θεωρητικό άμυλο (g)} = \text{Άμυλο\%} \cdot \text{αρχικό στερεό κλάσμα (g)}$$

Θεωρητική γλυκόζη από το άμυλο είναι η γλυκόζη που θα παραγόταν αν πραγματοποιούνταν πλήρης διάσπαση του αμύλου. Βάση της θεωρίας προκύπτει ότι:

$$\text{Θεωρητική γλυκόζη από αμύλο (g)} = \frac{\text{θεωρητικό άμυλο (g)}}{0.9}$$

Όπου ο συντελεστής 0.9 προκύπτει με βάση τη στοιχειομετρία της αντίδρασης (1/1), καθώς και από τον λόγο των μοριακών βαρών της γλυκόζης και του αμύλου ( $M_{w,\text{starch}}/M_{w,\text{glucose}} = 162/180 = 0.9$ ).

$$\text{Θεωρητική ελεύθερη γλυκόζη (g)} = \text{Ελεύθερη Γλυκόζη\%} \cdot \text{Αρχικό στερεό κλάσμα (g)}$$

Θεωρητική γλυκόζη από τη λακτόζη είναι η γλυκόζη που θα παραγόταν αν πραγματοποιούνταν πλήρης διάσπαση της λακτόζης.

$$\text{Θεωρητική γλυκόζη από λακτόζη (g)} = \text{θεωρητική λακτόζη (g)} \cdot 0.5263$$

Όπου ο συντελεστής 0.5263 προκύπτει από τη στοιχειομετρία της αντίδρασης (1/1), καθώς και από τον λόγο των μοριακών βαρών της γλυκόζης και της λακτόζης ( $MW_{\text{lactose}}/MW_{\text{glucose}} = 342/180 = 0.5263$ ).

Άρα με την χρήση ενζύμων διάσπασης και του αμύλου και της λακτόζης, η θεωρητική γλυκόζη προκύπτει ίση με το άθροισμα της θεωρητικής γλυκόζης από το άμυλο, από τη λακτόζη και από το ποσοστό (% του στερεού) ελεύθερης γλυκόζης:

$$\text{Θεωρητική γλυκόζη (g)} = \frac{\text{θεωρητικό άμυλο (g)}}{0.9} + \text{θεωρητική λακτόζη (g)} \cdot 0.5263 + \\ + \% \text{ελεύθερης γλυκόζης} \cdot \text{αρχ. στερεό (g)}$$

Έτσι, ως θεωρητική αιθανόλη ορίζεται η αιθανόλη που θα παραγόταν εάν γινόταν πλήρης διάσπαση της λακτόζης και του αμύλου σε γλυκόζη, και με τη σειρά της, η παραγόμενη γλυκόζη και η ελεύθερη γλυκόζη μετατρέπονταν πλήρως σε αιθανόλη. Πιο συγκεκριμένα, βάση θεωρίας προκύπτει ότι:

$$\text{Θεωρητική αιθανόλη} = (\text{Θεωρητική γλυκόζη}) \cdot 0.511$$

Ο συντελεστής 0.511 προκύπτει με βάση τη στοιχειομετρία της αντίδρασης (2 μόρια γλυκόζης δίνουν 1 μόριο αιθανόλης) και από τον λόγο των μοριακών βαρών της αιθανόλης και της γλυκόζης ( $MW_{\text{ethanol}}/MW_{\text{glucose}} = 46/180 = 0.2555$ ), άρα  $m_{\text{ethanol}}/m_{\text{glucose}} = 2 \cdot 0.2555 = 0.511$ .

Θεωρητική γαλακτόζη από λακτόζη είναι η γαλακτόζη που θα παραγόταν αν πραγματοποιούνταν πλήρης διάσπαση της λακτόζης.

$$\text{Θεωρητική γαλακτόζη από λακτόζη (g)} = \text{θεωρητική λακτόζη (g)} \cdot 0.5263$$

Όπου ο συντελεστής 0.5263 προκύπτει από τη στοιχειομετρία της αντίδρασης (1/1), καθώς και από τον λόγο των μοριακών βαρών της γαλακτόζης και της λακτόζης ( $MW_{\text{lactose}}/MW_{\text{galactose}} = 342/180 = 0.5263$ ).

Θεωρητικό γαλακτικό οξύ ορίζεται το αρχικό γαλακτικό οξύ του στερεού προσθέτοντας το γαλακτικό οξύ που θα παραγόταν εάν η συνολική γλυκόζη και η γαλακτόζη μετατρέπονταν πλήρως σε γαλακτικό οξύ. Πιο συγκεκριμένα, βάση θεωρίας προκύπτει ότι:

$$\text{Θεωρητικό γαλακτικό οξύ (g)} = \text{Γαλακτικό οξύ\%} \cdot \text{αρχικό στερεό κλάσμα (g)} + \\ + \text{θεωρητική γλυκόζη (g)} \cdot 0.5 + \text{θεωρητική γαλακτόζη (g)} \cdot 0.5$$

Ο συντελεστής 0.5 προκύπτει βιβλιογραφικά και ισχύει ότι για τη γλυκόζη, τη γαλακτόζη και γενικότερα τις εξόζες 0.5g αντιστοιχούν σε 1g γαλακτικού οξέος [64].

## 9 ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΟ ΠΡΩΤΟΚΟΛΛΟ

### 9.1 ΠΑΡΑΓΩΓΗ ΑΙΘΑΝΟΛΗΣ

#### 9.1.1 ΠΑΡΑΓΩΓΗ ΑΙΘΑΝΟΛΗΣ ΜΕ ΧΡΗΣΗ ΑΜΥΛΑΣΗΣ

##### 9.1.1.1 ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΑΚΗ ΚΛΙΜΑΚΑ

Για την παραγωγή αιθανόλης πραγματοποιήθηκαν πειράματα SSF εργαστηριακής κλίμακας και ακολουθήθηκε η εξής πορεία:

1. Αρχικά, ζυγίζεται το ξηρό στερεό ανάλογα με το φορτίο που ορίστηκε (15%, 20%, 25%, 30%, 35%, 40% w/w) και τοποθετείται σε μπουκάλια με την κατάλληλη (ανάλογα με το φορτίο) ποσότητα απιονισμένου νερού.
2. Στην συνέχεια, γίνεται προσθήκη του αμυλολυτικού ενζύμου (Spirizyme EXCEL, 40 μL/g starch, 60 μL/g starch) και σε κάποια πειράματα (ανάλογα με το πειραματικό πρωτόκολλο) και της λακτάσης (Lactozyme Pure, 5 mg/g λακτόζης, 8 mg/g λακτόζης), καθώς και της μαγιάς (*Saccharomyces cerevisiae*, 2% του στερεού, 3% του στερεού).
3. Το πείραμα τοποθετείται στο ανακινούμενο αερόλουτρο σε θερμοκρασία 35°C και ταχύτητα ανάδευσης 130 rpm (για 24 και 48 ώρες).
4. Έπειτα λαμβάνεται δείγμα και ακολουθεί η διαδικασία φυγοκέντρησης και διήθησης.

Μετά τη διήθηση το υγρό λαμβάνεται και χρησιμοποιείται για τον υπολογισμό γλυκόζης και αιθανόλης και το στερεό συλλέγεται και μεταφέρεται σε προζυγισμένο ποτήρι ζέσεως σε φούρνο στους 50°C για 1 μέρα για τον υπολογισμό της αποδόμησης του στερεού και του αμύλου (degradation). Έπειτα το πέρασ των 24h, λαμβάνεται ποσότητα από το στερεό, η οποία έχει προηγουμένως θρυμματιστεί με τη βοήθεια του γουδιού, ώστε να προκύψει μορφή σκόνης και συλλέγεται και στη συνέχεια μετριέται το άμυλο, με βάση τη μέθοδο προσδιορισμού του αμύλου.

Στα πειράματα που πραγματοποιήθηκαν εξετάστηκε η επίδραση της αύξησης του φορτίου, καθώς και η επίδραση της ποσότητας μαγιάς και της ποσότητας των ενζύμων στην απόδοση αιθανόλης.

Στην 1<sup>η</sup> Δοκιμή εξετάστηκε η επίδραση του φορτίου στην απόδοση αιθανόλης, η οποία υπολογίστηκε με βάση την θεωρητική αιθανόλη που θα παραγόταν αν καταναλωνόταν όλη η γλυκόζη από την αποδόμηση αμύλου, καθώς και η ελεύθερη γλυκόζη. Τα πειράματα που πραγματοποιήθηκαν παρουσιάζονται στον ακόλουθο πίνακα (Πίνακας 8) και λήφθηκαν δείγματα μετά από 24 ώρες. Όλα τα πειράματα πραγματοποιήθηκαν με ίδιες ποσότητες αμυλάσης και μαγιάς και σε ίδια θερμοκρασία.

Πίνακας 8: Συνθήκες πειραμάτων παραγωγής αιθανόλης σε SSF για 24 ώρες με αυξανόμενο φορτίο (1<sup>η</sup> δοκιμή).

Πείραμα	Φορτίο στερεού (% w/w)	Αμυλάση (μL/g αμύλου)	Μαγιά (% w/w του ξηρού βάρους)	Θερμοκρασία (°C)	Χρόνος (h)
1	15	40	2	35	24
2	20	40	2	35	24
3	25	40	2	35	24
4	30	40	2	35	24

Στη 2<sup>η</sup> Δοκιμή πραγματοποιήθηκαν πειράματα με 30, 35 και 40% φορτίο (Πίνακας 9), με τις ίδιες συνθήκες των πειραμάτων της 1<sup>ης</sup> δοκιμής και μετρήθηκαν δείγματα στις 48h, για να διαπιστωθεί αν η αύξηση της διάρκειας του πειράματος ευνοεί την παραγωγή αιθανόλης και

την απόδοσή της, καθώς και να διαπιστωθεί με ποιο φορτίο λαμβάνονται υψηλότερες αποδόσεις για τις εξεταζόμενες συνθήκες.

Πίνακας 9: Συνθήκες πειραμάτων παραγωγής αιθανόλης σε SSF για 48 ώρες με 30, 35 και 40% w/w φορτίο στερεού (2<sup>η</sup> δοκιμή).

Πείραμα	Φορτίο στερεού (% w/w)	Αμυλάση (μL/g αμύλου)	Μαγιά (% w/w του ξηρού βάρους)	Θερμοκρασία (°C)	Χρόνος (h)
1	30	40	2	35	48
2	35	40	2	35	48
3	40	40	2	35	48

Στην 3<sup>η</sup> Δοκιμή πραγματοποιούνται πειράματα με φορτία 35% και 40% με αύξηση, όμως αυτή τη φορά της ποσότητας της προστιθέμενης μαγιάς και του ενζύμου και λήψη δειγμάτων στις 48h, ώστε να αποφανθεί ποιο φορτίο είναι το βέλτιστο (Πίνακας 10).

Πίνακας 10: Συνθήκες πειραμάτων παραγωγής αιθανόλης σε SSF για 48 ώρες με αύξηση ποσότητας ενζύμου και μαγιάς με 35 και 40% w/w φορτίο στερεού (3<sup>η</sup> δοκιμή).

Πείραμα	Φορτίο στερεού (% w/w)	Αμυλάση (μL/g αμύλου)	Μαγιά (% w/w του ξηρού βάρους)	Θερμοκρασία (°C)	Χρόνος (h)
1	35	60	3	35	48
2	40	60	3	35	48

#### 9.1.1.2 ΑΝΑΚΛΙΜΑΚΩΣΗ ΣΕ 4L ΑΝΤΙΔΡΑΣΤΗΡΑ

Έγινε προσπάθεια αύξησης της κλίμακας παραγωγής βιοαιθανόλης σε αντιδραστήρα συνεχούς ανάδευσης 4L (Σχήμα 17), με λειτουργικό όγκο τα 3L, ο οποίος συνδέεται με σύστημα θέρμανσης. Το φορτίο και οι συνθήκες του πειράματος είναι οι αναγραφόμενες στον ακόλουθο πίνακα (Πίνακας 11).



Σχήμα 17: Διάταξη 4L αντιδραστήρα

Πίνακας 11: Συνθήκες πειράματος παραγωγής αιθανόλης σε 4L αντιδραστήρα.

Φορτίο στερεού (% w/w)	Αμυλάση (μL/g αμύλου)	Μαγιά (% w/w του ξηρού βάρους)	Θερμοκρασία (°C)	Χρόνος (h)
35	60	3	35	48

Ανά τακτά χρονικά διαστήματα μέχρι τις 48h γινόταν λήψη δείγματος, κλείνοντας τον αναδευτήρα και σηκώνοντας το αποσπώμενο καπάκι (Σχήμα 17) για τις μετρήσεις των συγκεντρώσεων αιθανόλης και γλυκόζης.

#### 9.1.2 ΠΑΡΑΓΩΓΗ ΑΙΘΑΝΟΛΗΣ ΜΕ ΣΥΝΕΡΓΑΤΙΚΗ ΔΡΑΣΗ ΑΜΥΛΑΣΗΣ ΚΑΙ ΛΑΚΤΑΣΗΣ

Πραγματοποιήθηκαν στη συνέχεια πειράματα με την προσθήκη του ενζύμου που διασπάει την λακτόζη, λακτάση – Lactozyme pure, εκτός της αμυλάσης – Spirizyme EXCEL, προκειμένου να διαπιστωθεί, αν η απόδοση και η παραγόμενη ποσότητα αιθανόλης παρουσιάζουν αύξηση.

Αρχικά, για να ελεγχθεί η λειτουργία του ενζύμου πραγματοποιήθηκε υδρόλυση για 4 ώρες (1<sup>η</sup> Δοκιμή).

Πραγματοποιήθηκαν 3 πειράματα, όπως φαίνεται στον παρακάτω Πίνακα (Πίνακας 12) με διαφορετικές συγκεντρώσεις λακτάσης, ώστε να βρεθεί η βέλτιστη.

Πίνακας 12: Συνθήκες πειραμάτων υδρόλυσης σε διάφορες συγκεντρώσεις λακτάσης (1<sup>η</sup> δοκιμή).

Πείραμα	Φορτίο στερεού (% w/w)	Λακτάση (mg/g λακτόζης)	Αμυλάση (μL/g αμύλου)	Θερμοκρασία (°C)	Χρόνος (h)
1	20	2	40	40	4
2	20	8	40	40	4
3	20	0	40	40	4

Στη συνέχεια, πραγματοποιήθηκαν πειράματα σε SSF συνθήκες, για την παραγωγή αιθανόλης με 20% w/w φορτίο στερεού με συνθήκες τις αναγραφόμενες στον παρακάτω πίνακα (Πίνακας 13). Για τον έλεγχο επίδρασης της λακτάσης στην παραγωγή αιθανόλης, πραγματοποιήθηκαν υπό τις ίδιες συνθήκες πειράματα απουσία λακτάσης.

Τα πειράματα που πραγματοποιήθηκαν και οι συνθήκες τους παρουσιάζονται στον παρακάτω πίνακα (Πίνακας 13).

Πίνακας 13: Συνθήκες πειραμάτων παραγωγής αιθανόλης σε SSF με λακτάση και αμυλάση με 20% w/w φορτίο στερεού (2<sup>η</sup> Δοκιμή).

Πείραμα	Φορτίο στερεού (% w/w)	Λακτάση (mg/g λακτόζης)	Αμυλάση (μL/g αμύλου)	Μαγιά (% w/w του ξηρού βάρους)	Θερμοκρασία (°C)
1	20	8	40	2	35
2	20	0	40	2	35

Τέλος, πραγματοποιήθηκαν πειράματα με τις συνθήκες των πειραμάτων με τη χρήση αμυλάσης που παρουσίασαν καλύτερα αποτελέσματα

Με αυτόν τον τρόπο εξετάζεται, αν το μεγαλύτερο φορτίο επιδρά θετικά ή αρνητικά στην ποσότητα και απόδοση της αιθανόλης. Τα πειράματα και οι συνθήκες, στις οποίες πραγματοποιήθηκαν παρουσιάζονται στον ακόλουθο πίνακα (Πίνακας 14).



Πίνακας 14: Συνθήκες πειραμάτων παραγωγής αιθανόλης σε SSF με λακτάση και αμυλάση με 35% w/w φορτίο στερεού (3<sup>η</sup> Δοκιμή).

Πείραμα	Φορτίο στερεού (% w/w)	Λακτάση (mg/g λακτόζης)	Αμυλάση (μL/g αμύλου)	Μαγιά (% w/w του ξηρού βάρους)	Θερμοκρασία (°C)
1	35	8	60	3	35
2	35	0	60	3	35

Μέσω αυτής της δοκιμής εξετάστηκε πέρα από την επίδραση του μεγαλύτερου φορτίου και κατά πόσο η παρουσία του ενζύμου επιδρά θετικά ή αρνητικά στην ποσότητα και απόδοση της αιθανόλης.

## 9.2 ΠΑΡΑΓΩΓΗ ΓΑΛΑΚΤΙΚΟΥ ΟΞΕΟΣ

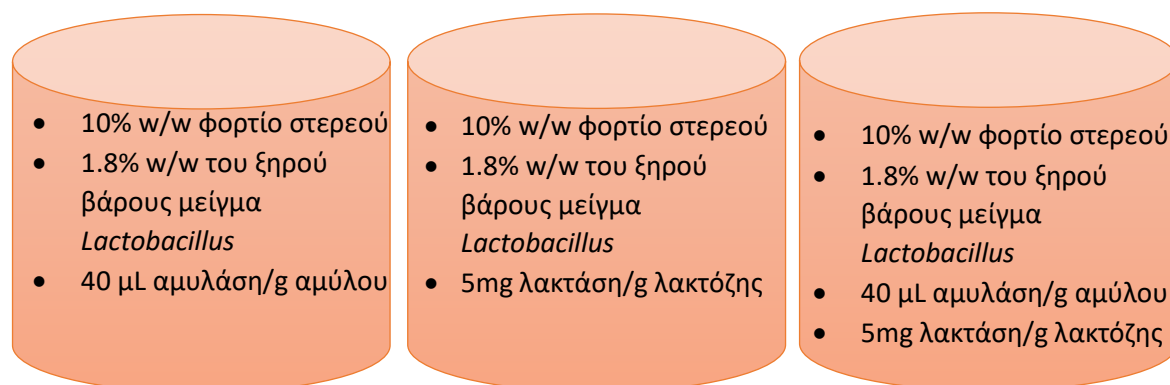
### 9.2.1 ΕΠΙΔΡΑΣΗ ΤΟΥ ΕΙΔΟΥΣ ΤΩΝ ΜΙΚΡΟΟΡΓΑΝΙΣΜΩΝ

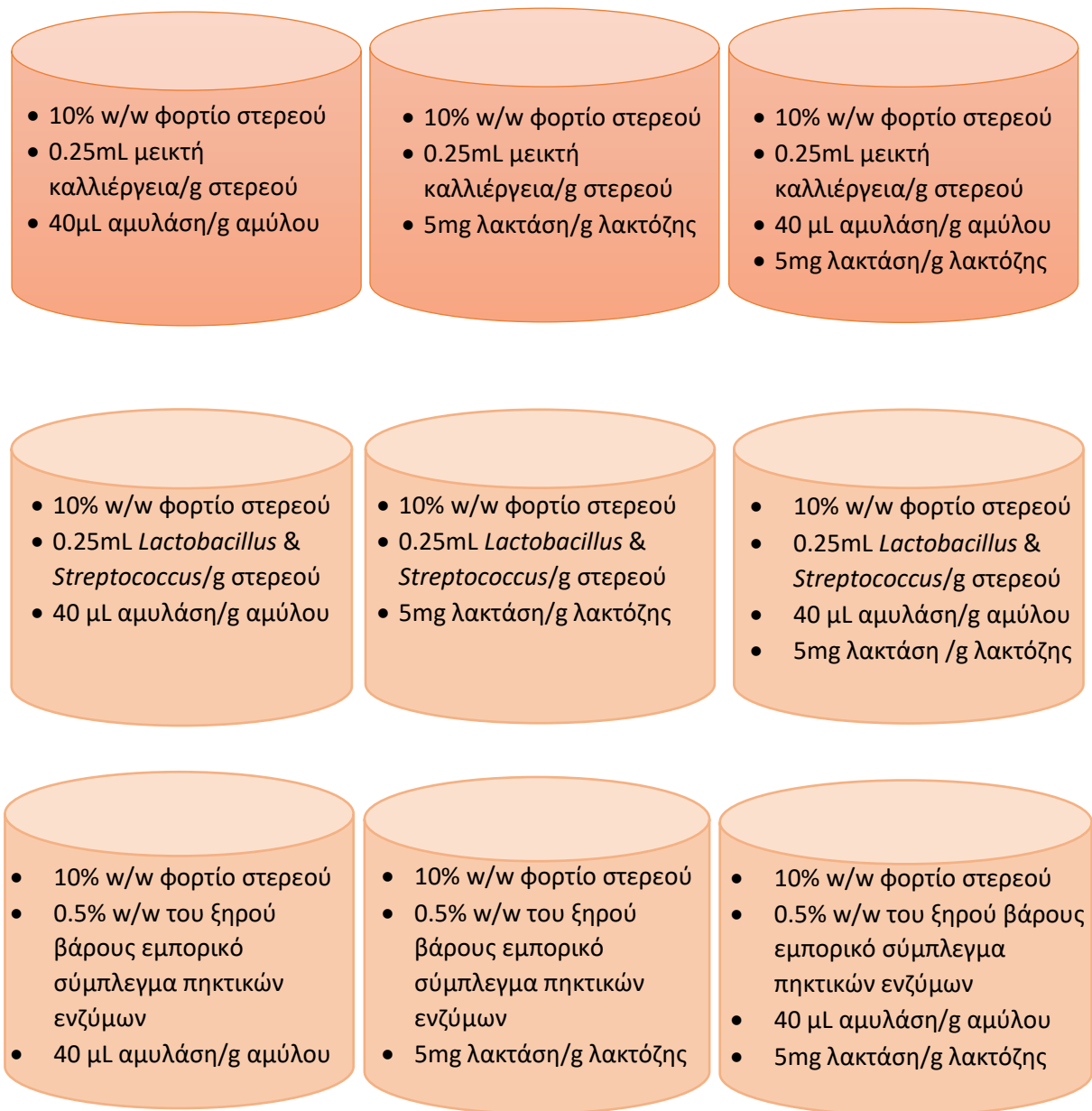
Αρχικά, μελετήθηκε η παραγωγή γαλακτικού οξέος με χρήση του μύκητα *Saccharomyces cerevisiae*, αλλά και αντίστοιχα με προσθήκη εμπορικού μείγματος μαγιάς. Πραγματοποιήθηκαν 3 πειράματα για κάθε μικροοργανισμό, ένα απουσία ενζύμων, ένα μόνο με αμυλάση και τέλος ένα με αμυλάση και λακτάση.

Για την παραγωγή του γαλακτικού οξέος βιβλιογραφικά βρέθηκε ότι απαιτούνται τα Lactic Acid Bacteria (LAB), τα οποία ανήκουν στην οικογένεια *Lactobacillus*. Τα βακτήρια αυτά είναι θερμοφιλά οξυγαλακτικά βακτήρια και λειτουργούν βέλτιστα σε pH: 3.5-5.5 και θερμοκρασία T = 35 – 40°C [74 , 75]. Για αυτόν τον λόγο, έγινε η διερεύνηση παραγωγής γαλακτικού οξέος με χρήση:

- εμπορικού συμπλέγματος πηκτικών ενζύμων (τυροπιτιά)
- καλλιέργειας *Lactobacillus bulgaricus* και *Streptococcus thermophilus* υπό μορφή ημιστερεού εμπορικού προϊόντος (*Lactobacillus* & *Streptococcus*)
- καλλιέργειας γαλακτοβακίλλων (*Lactobacillus acidophilus*, *Lactobacillus plantarum*, *Lactobacillus rhamnosus*, *Lactobacillus bulgaricus* και *Bifidobacterium longum*) υπό μορφή εμπορικού προϊόντος σε σκόνη (μείγμα *Lactobacillus*)
- μεικτής καλλιέργειας γαλακτοβάκιλλων και ζυμομυκήτων σε ελεύθερες συνθήκες (μεικτή καλλιέργεια).

Προκειμένου να διαπιστωθεί πότε και σε ποια πειράματα παρατηρείται η μέγιστη παραγωγή του γαλακτικού οξέος πραγματοποιήθηκαν τα παρακάτω πειράματα, τα οποία ελέγχθηκαν μέχρι τις 72h (3 ημέρες). Οι πειραματικές συνθήκες παρουσιάζονται στο Σχήμα 18.

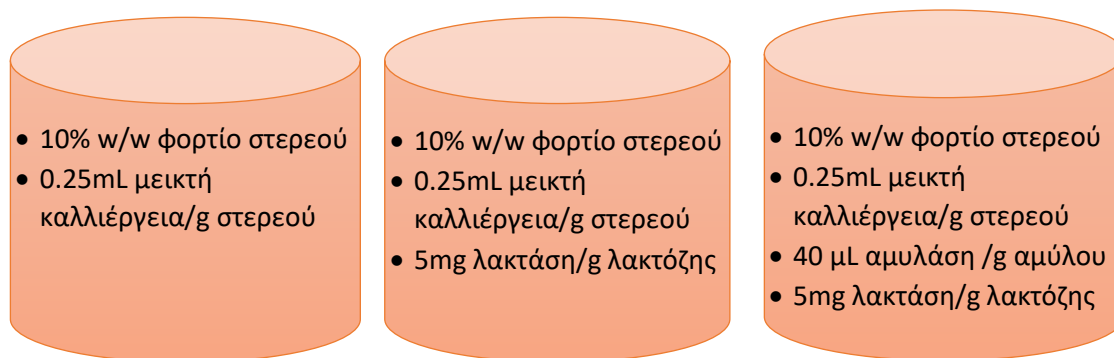




Σχήμα 18: Συνθήκες πειραμάτων για την διερεύνηση μικροοργανισμών για την παραγωγή γαλακτικού οξέος (Δοκιμή 1)

#### 9.2.2 ΕΠΙΔΡΑΣΗ ΤΟΥ ΧΡΟΝΟΥ ΚΑΙ ΤΗΣ ΠΡΟΣΘΗΚΗΣ ENZYMΩΝ

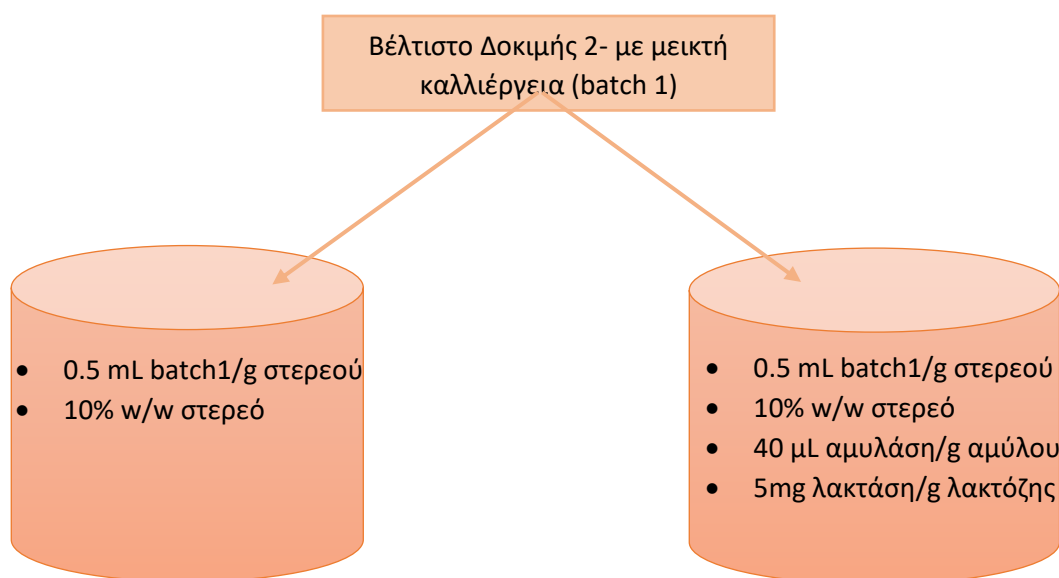
Έπειτα επαναλήφθηκαν τα πειράματα με τη μεικτή καλλιέργεια αλλά για μεγαλύτερη διάρκεια, για να βρεθεί εάν παρατηρείται αύξηση της συγκέντρωσης του γαλακτικού οξέος και εάν η παρουσία των ενζύμων ευνοεί την παραγωγή. Τα πειράματα που πραγματοποιήθηκαν παρουσιάζονται στο Σχήμα 19.



Σχήμα 19: Συνθήκες πειραμάτων με χρήση μεικτής καλλιέργειας προς παραγωγή γαλακτικού οξέος για 9 μέρες.

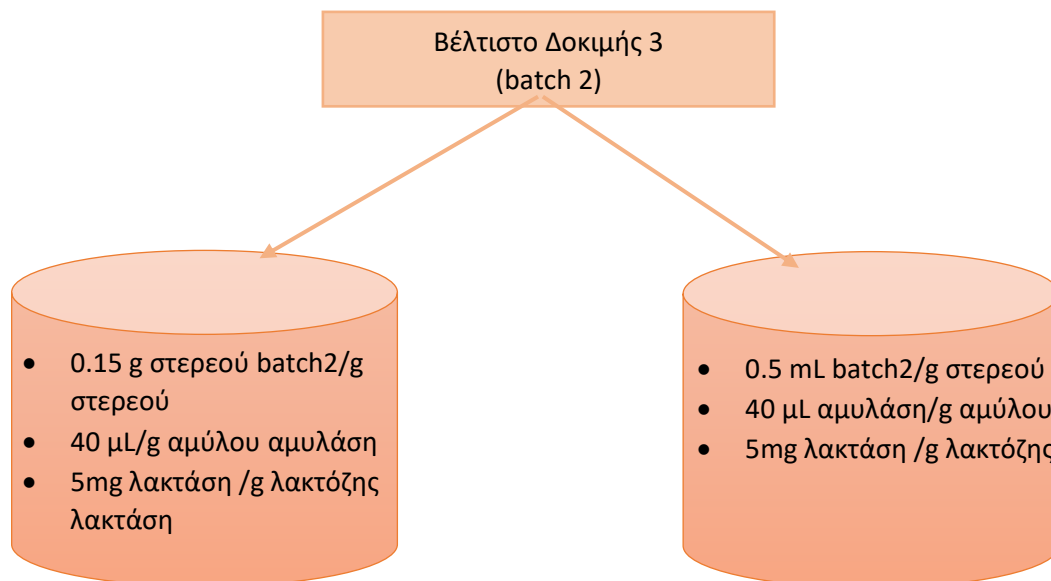
### 9.2.3 ΔΟΚΙΜΕΣ ΕΠΑΝΑΛΑΜΒΑΝΟΜΕΝΩΝ ΖΥΜΩΣΕΩΝ (REPEATED FERMENTATION)

Στην επόμενη δοκιμή, Δοκιμή 3, έγινε προσπάθεια εφαρμογής επαναλαμβανόμενης ζύμωσης (repeated fermentation) με χρήση δείγματος από τα πειράματα με τη μεικτή καλλιέργεια της Δοκιμής 2 (βέλτιστο Δοκιμής 2 – μεικτή καλλιέργεια) που είχαν μεγαλύτερη συγκέντρωση του γαλακτικού οξέος. Έτσι, πραγματοποιήθηκαν τα παρακάτω πειράματα (Σχήμα 20), τα οποία μελετήθηκαν μέχρι τις 216h (9d).



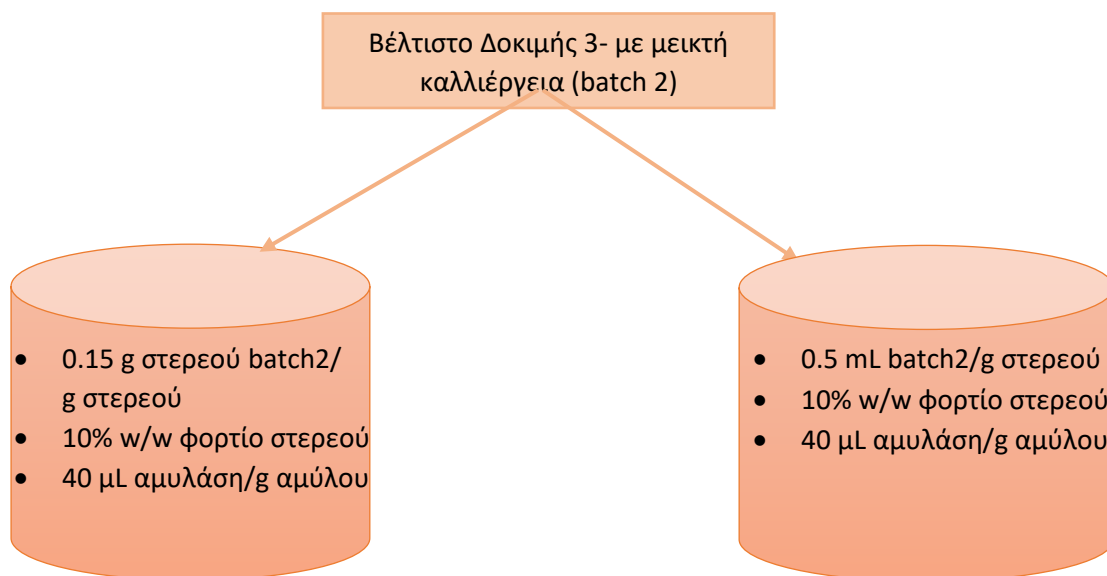
Σχήμα 20: Συνθήκες πειραμάτων 1<sup>ης</sup> επαναλαμβανόμενης ζύμωσης για παραγωγή γαλακτικού οξέος με προσθήκη ομοιογενούς μείγματος της δοκιμής 2 και με προσθήκη αμυλάσης και λακτάσης (Δοκιμή 3).

Από τα πειράματα της επαναλαμβανόμενης ζύμωσης (Δοκιμή 3) το πείραμα με την μεγαλύτερη συγκέντρωση γαλακτικού οξέος (batch 2) (μετά από 6 ημέρες) χρησιμοποιήθηκε εκ νέου για ζύμωση (Δοκιμή 4). Στη δοκιμή αυτή πραγματοποιήθηκαν πειράματα, που μετρήθηκαν στις 72h (3 ημέρες), με χρήση δείγματος μόνο της στερεής φάσης του βέλτιστου πειράματος της Δοκιμής 3 και με χρήση απλά ομοιογενούς δείγματος του πειράματος, για να ελεγχθεί αν υπάρχει διαφορά στην παραγόμενη ποσότητα οξέος. Η στερεή φάση που χρησιμοποιείται προκύπτει έπειτα από φυγοκέντρηση 10mL ομοιογενούς δείγματος του batch 2. Σε όλα τα πειράματα προστέθηκαν και τα δύο ένζυμα αμυλάση και λακτάση, όπως παρουσιάζεται στο Σχήμα 21.



Σχήμα 21: Συνθήκες 2<sup>ης</sup> επαναλαμβανόμενης ζύμωσης για παραγωγή γαλακτικού οξέος με προσθήκη είτε στερεού είτε ομοιογενούς μείγματος της δοκιμής 3 και με προσθήκη αμυλάσης και λακτάσης (Δοκιμή 4).

Στη Δοκιμή 5 χρησιμοποιήθηκε πάλι δείγμα από το βέλτιστο της Δοκιμής 3 (batch 2) για επαναλαμβανόμενη ζύμωση. Πραγματοποιήθηκαν πειράματα για 72h (3 ημέρες), με χρήση δείγματος μόνο από την στερεή φάση και με χρήση απλά ομοιογενούς δείγματος τους. Στα πειράματα αυτά προστέθηκε μόνο αμυλάση, όπως φαίνεται στο Σχήμα 22 (Δοκιμή 5).



Σχήμα 22: Συνθήκες 3<sup>ης</sup> επαναλαμβανόμενης ζύμωσης για την παραγωγή γαλακτικού οξέος με προσθήκη είτε στερεού είτε ομοιογενούς μείγματος της δοκιμής 3 και με προσθήκη αμυλάσης (Δοκιμή 5).

### 9.3 ΠΑΡΑΓΩΓΗ ΓΑΛΑΚΤΙΚΟΥ ΑΙΘΥΛΕΣΤΕΡΑ

Η παραγωγή γαλακτικού αιθυλεστέρα, όπως αναλύθηκε στο Κεφάλαιο 6.3 επιτυγχάνεται με πρώτες ύλες το γαλακτικό οξύ και την αιθανόλη, μέσω αμφίδρομης αντίδρασης εστεροποίησης, που ευνοείται σε όξινο περιβάλλον. Κατά τη διάρκεια της αντίδρασης παράγεται ως παραπροϊόν νερό. Η μοριακή αναλογία αιθανόλης/γαλακτικού οξέος που

βρέθηκε βιβλιογραφικά και μελετήκε είναι  $n_{\text{EtOH}}/n_{\text{LA}} = 3/1$ , καθώς με αυτήν την αναλογία η περιεκτικότητα σε ολιγομερή, που σχηματίζει το γαλακτικό οξύ (ενδομοριακή αυτοεστεροποίηση) είναι περίπου 0.4% (ενώ με αναλογία 1/1 στο 2.4%) [10].

Η αιθανόλη και το γαλακτικό οξύ αναμίχθηκαν σε σφαιρική φιάλη των 250mL η οποία συνδέθηκε με ψυκτήρα και το μείγμα θερμάνθηκε στους 100°C μαζί με την προσθήκη καταλύτη Amberlyst 15 σε κλάσμα βάρους  $w_{\text{cat}} = 0.1$ .



Σχήμα 23: Καταλύτης Amberlyst 15

Η διάταξη που χρησιμοποιήθηκε παρουσιάζεται στο Σχήμα 24.



Σχήμα 24: Διάταξη παραγωγής γαλακτικού αιθυλεστέρα.

Ανά τακτά χρονικά διαστήματα γινόταν λήψη δείγματος για τον έλεγχο της προόδου της αντίδρασης με τη βοήθεια της μεθόδου υγρής χρωματογραφίας (HPLC) και προσθήκη αιθανόλης στη σφαιρική φιάλη για να αντισταθμιστούν οι απώλειες σε αιθανόλη και να

διατηρηθεί η αρχική μοριακή αναλογία αιθανόλη/γαλακτικού οξέος στο 3/1, όταν αυτό οριζόταν από το πειραματικό πρωτόκολλο.

Έπειτα για την παραλαβή του εστέρα πραγματοποιούνταν απόσταξη με περιστροφικό εξατμιστήρα (rotary evaporator) για τον διαχωρισμό του από το νερό.

### 9.3.1 ΠΑΡΑΓΩΓΗ ΓΑΛΑΚΤΙΚΟΥ ΑΙΘΥΛΕΣΤΕΡΑ ΜΕ ΧΗΜΙΚΗ ΑΙΘΑΝΟΛΗ ΚΑΙ ΓΑΛΑΚΤΙΚΟ ΟΞΥ

Στις Δοκιμές 1 και 2 οι ποσότητες που προστέθηκαν αντιστοιχούν σε μοριακή αναλογία  $n_{\text{EtOH}}/n_{\text{LA}} = 3/1$  και φαίνονται στον παρακάτω πίνακα (Πίνακας 15).

- Στη Δοκιμή 1 προστέθηκαν μετά από 90min 0.5mL αιθανόλης και μετά από 195min 0.4mL.
- Στη Δοκιμή 2 δεν έγινε προσθήκη αιθανόλης στις ενδιάμεσες μετρήσεις.

Πίνακας 15: Ποσότητες αντιδραστηρίων για την αντίδραση παραγωγής γαλακτικού αιθυλεστέρα, με μοριακή αναλογία αιθανόλης (99.9%)/γαλακτικού οξέος (80%) 3/1 και καταλύτη σε κλάσμα βάρους  $w_{\text{cat}}=0.1$  (Δοκιμή 1,2).

Αιθανόλη 99.9% (mL)	Γαλακτικό Οξύ 80% (mL)	Amberlyst 15 (g)
4.18	2.23	0.6

Στη Δοκιμή 3 χρησιμοποιήθηκε αιθανόλη 99.9% και γαλακτικό οξύ 88%. Οι ποσότητες που προστέθηκαν ( $n_{\text{EtOH}}/n_{\text{LA}} = 3/1$ ) φαίνονται στον παρακάτω πίνακα (Πίνακας 16).

- Για να αντισταθμιστούν οι απώλειες, προστέθηκαν στα 45min 0.8mL, στα 105min 0.5mL και στα 170min 0.5mL αιθανόλης.

Πίνακας 16: Ποσότητες αντιδραστηρίων για την αντίδραση παραγωγής γαλακτικού αιθυλεστέρα, με μοριακή αναλογία αιθανόλης (99.9%)/γαλακτικού οξέος (88%) 3/1 και καταλύτη με κλάσμα βάρους  $w_{\text{cat}}=0.1$  (Δοκιμή 3).

Αιθανόλη 99.9% (mL)	Γαλακτικό Οξύ 88% (mL)	Amberlyst 15 (g)
9.73	4.70	1.34

Στη Δοκιμή 4 έγινε διερεύνηση παραγωγής του γαλακτικού αιθυλεστέρα χωρίς τη χρήση ρητίνης με μοριακή αναλογία  $n_{\text{EtOH}}/n_{\text{LA}} = 3/1$ . Έτσι οι ποσότητες που προστέθηκαν παρουσιάζονται παρακάτω (Πίνακας 17).

Πίνακας 17: Ποσότητες αντιδραστηρίων για την αντίδραση παραγωγής γαλακτικού αιθυλεστέρα, με μοριακή αναλογία αιθανόλης (99.9%)/γαλακτικού οξέος (88%) 3/1, χωρίς προσθήκη καταλύτη (Δοκιμή 4).

Αιθανόλη 99.9% (mL)	Γαλακτικό Οξύ 80% (mL)	Amberlyst 15 (g)
9.73	4.70	-

- Προστέθηκαν στα 30min 0.5mL αιθανόλης στα 90min 0.5mL, και στις 150min 0.4mL.

Έπειτα στη Δοκιμή 5 έγινε προσθήκη της ρητίνης και ελέγχθηκε αν είναι δυνατή η παραγωγή γαλακτικού αιθυλεστέρα με την προσθήκη των αντιδραστηρίων σε μοριακή αναλογία  $n_{\text{EtOH}}/n_{\text{LA}} = 1/1$  και φαίνονται στον ακόλουθο πίνακα (Πίνακας 18).

- Μετά από 90min προστέθηκαν στη σφαιρική φιάλη 0.4mL αιθανόλης, για να αντισταθμιστούν οι απώλειες.

Πίνακας 18: Ποσότητες αντιδραστηρίων για την αντίδραση παραγωγής γαλακτικού αιθυλεστέρα, με μοριακή αναλογία αιθανόλης (99.9%)/γαλακτικού οξέος (80%) 1/1 και καταλύτη με κλάσμα βάρους  $w_{\text{cat}}=0.1$  (Δοκιμή 5).

Αιθανόλη 99.9% (mL)	Γαλακτικό Οξύ 80% (mL)	Amberlyst 15 (g)
2.20	3.49	0.61

### 9.3.2 ΠΑΡΑΓΩΓΗ ΓΑΛΑΚΤΙΚΟΥ ΑΙΘΥΛΕΣΤΕΡΑ ΜΕ ΒΙΟΑΙΘΑΝΟΛΗ ΚΑΙ ΓΑΛΑΚΤΙΚΟ ΟΞΥ

Στη Δοκιμή 6 δοκιμάστηκε η παραγωγή του εστέρα με χρήση βιοαιθανόλης και εμπορικού γαλακτικού οξέος. Οι προστιθέμενες ποσότητες αντιστοιχούν σε μοριακή αναλογία  $n_{\text{EtOH}}/n_{\text{LA}}=3/1$  και φαίνονται στον επόμενο πίνακα (Πίνακας 19). Το γαλακτικό οξύ που προστέθηκε ήταν καθαρότητας 88% w/w ενώ η βιοαιθανόλη 89%.

Πίνακας 19: Ποσότητες αντιδραστηρίων για την αντίδραση παραγωγής γαλακτικού αιθυλεστέρα, με μοριακή αναλογία βιοαιθανόλης (89%)/γαλακτικού οξέος (88%) 3/1 και καταλύτη με κλάσμα βάρους  $w_{\text{cat}}=0.1$  (Δοκιμή 6).

Αιθανόλη 89% (mL)	Γαλακτικό Οξύ 88% (mL)	Amberlyst 15 (g)
7.66	3.29	1.0

- Προστέθηκαν στα 15min 0.5mL αιθανόλης στα 45min 0.5mL, στα 75min 0.7mL αιθανόλης, στα 105min 0.4mL και στα 135min 0.4mL.

Στη Δοκιμή 7 προστέθηκαν τα ίδια αντιδραστήρια με την Δοκιμή 6 και στις ίδιες ποσότητες (Πίνακας 19).

- Για να αντισταθμιστούν οι απώλειες, προστέθηκαν στα 60min 0.5mL, στα 120min 0.5mL, στα 180min 0.7mL και στα 240min 0.5mL βιοαιθανόλης.

Στην επόμενη δοκιμή, Δοκιμή 8, προστέθηκε βιοαιθανόλη υψηλότερης καθαρότητας, 93% και ίδιας καθαρότητας γαλακτικό οξύ, 88%. Οι ποσότητες που προστέθηκαν ήταν οι παρακάτω.

Πίνακας 20: Ποσότητες αντιδραστηρίων για την αντίδραση παραγωγής γαλακτικού αιθυλεστέρα, με μοριακή αναλογία βιοαιθανόλης (93%)/γαλακτικού οξέος (88%) 3/1 και καταλύτη με κλάσμα βάρους  $w_{\text{cat}}=0.1$  (Δοκιμή 7).

Αιθανόλη 93% (mL)	Γαλακτικό Οξύ 88% (mL)	Amberlyst 15 (g)
7.33	3.27	1.0

- Για να αντισταθμιστούν οι απώλειες, προστέθηκαν στα 60min 0.5mL, στα 120min 0.5mL, στα 180min 0.7mL και στα 240min 0.5mL βιοαιθανόλης

Στη Δοκιμή 9 προστέθηκαν τα ίδια αντιδραστήρια με την Δοκιμή 8 και στις ίδιες ποσότητες (Πίνακας 20).

- Για να αντισταθμιστούν οι απώλειες, προστέθηκαν στα 15min 0.7mL, στα 45min 0.7mL, στα 75min 0.7mL, στα 105min 0.7mL, στα 135min 0.7mL και στα 165min 0.7mL αιθανόλης.

## 10 ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΑ ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

### 10.1 ΧΑΡΑΚΤΗΡΙΣΜΟΣ ΠΡΩΤΗΣ ΥΛΗΣ

Στην παρούσα διπλωματική ως πρώτη ύλη χρησιμοποιήθηκε απόβλητο βιομηχανίας παραγωγής βρεφικών τροφών, το οποίο προέκυψε από τους διάφορους καθαρισμούς που πραγματοποιήθηκαν στην γραμμή παραγωγής της βιομηχανίας, με αναγραφόμενες τις παρακάτω περιεκτικότητες του ακόλουθου πίνακα (Πίνακας 21).

Πίνακας 21: Αναγραφόμενες περιεκτικότητες αποβλήτου βιομηχανίας παραγωγής βρεφικών τροφών.

Χαρακτηρισμός	Τιμή (%)
Υδατάνθρακες (Carbohydrates)	66.67 ± 10.02
Σάκχαρα (Sugars)	30.33 ± 11.02
Εδώδιμες Ίνες (Dietary fibers)	5.13 ± 3.09
Έλαια (Oils)	9.03 ± 3.41
Πρωτεΐνες (Proteins)	15.00 ± 2.65
Άλλα	1.16 ± 0.13

Εφαρμόζοντας και τις πειραματικές μεθόδους ανάλυσης προκύπτουν τα αποτελέσματα του παρακάτω πίνακα (Πίνακας 22) για τη σύσταση του αποβλήτου.

Πίνακας 22: Χαρακτηρισμός αποβλήτου βιομηχανίας παραγωγής βρεφικών τροφών.

Χαρακτηρισμός	Τιμή (%)
Ολικά Στερεά (TS)	96.74 ± 0.01
Πτητικά Στερεά (VS)	97.68 ± 0.02
Υγρασία (Moisture)	3.26 ± 0.01
Υδατοδιαλυτά (WS)	44.44 ± 2.46
Άμυλο (Starch)	31.00 ± 1.34
Λακτόζη (Lactose)	31.00 ± 3.20
Ελεύθερη γλυκόζη (Free Sugars)	7.54 ± 0.84
Γαλακτικό Οξύ	2.00 ± 0.09
Μη διαλυτό υπόλειμμα	7.49 ± 0.39

Οι εργαστηριακές μετρήσεις του αποβλήτου δεν αποκλίνουν πολύ από τις μετρήσεις που αναγράφονται στα προϊόντα βιομηχανίας παραγωγής διάφορων βρεφικών τροφών.



## 10.2 ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ ΠΕΙΡΑΜΑΤΩΝ ΠΑΡΑΓΩΓΗΣ ΑΙΘΑΝΟΛΗΣ

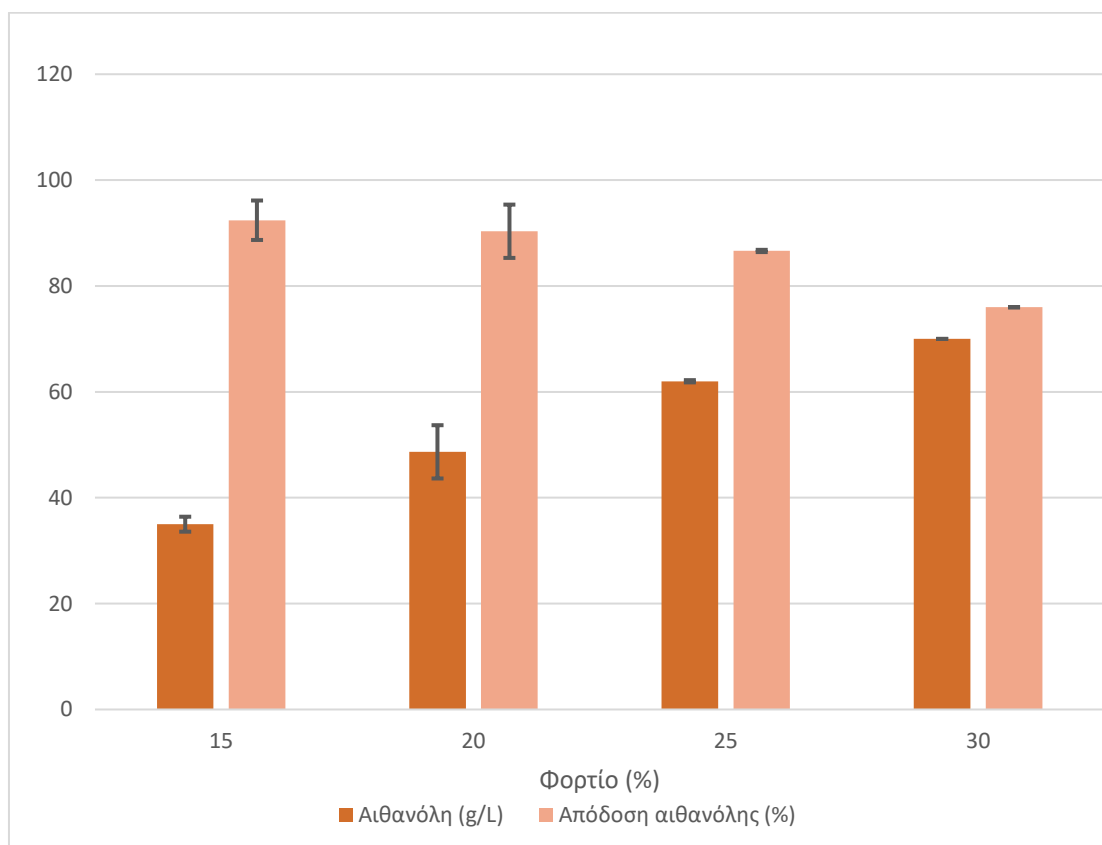
### 10.2.1 ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ ΜΕ ΧΡΗΣΗ ΑΜΥΛΑΣΗΣ

#### 10.2.1.1 ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΑΚΗΣ ΚΛΙΜΑΚΑΣ

Συνοψίζονται για την 1<sup>η</sup> Δοκιμή τα αποτελέσματα (μετά από 24 ώρες) των συγκεντρώσεων της παραγόμενης αιθανόλης και της απόδοσης σε αιθανόλης (Πίνακας 23):

Πίνακας 23: Αποτελέσματα πειραμάτων παραγωγής αιθανόλης σε SSF μετά από 24 ώρες με αυξανόμενο φορτίο (1<sup>η</sup> δοκιμή).

Πείραμα	Φορτίο στερεού (% w/w)	Αμύλαση (μL/g αμύλου)	Μαγιά (% w/w του ξηρού βάρους)	Αιθανόλη (g/L)	Απόδοση αιθανόλης (%)
1	15	40	2	35.00 ± 1.41	92.42 ± 3.73
2	20	40	2	48.67 ± 5.03	90.33 ± 9.12
3	25	40	2	62.00 ± 0.21	86.62 ± 3.93
4	30	40	2	70.00 ± 0.00	75.98 ± 0.08



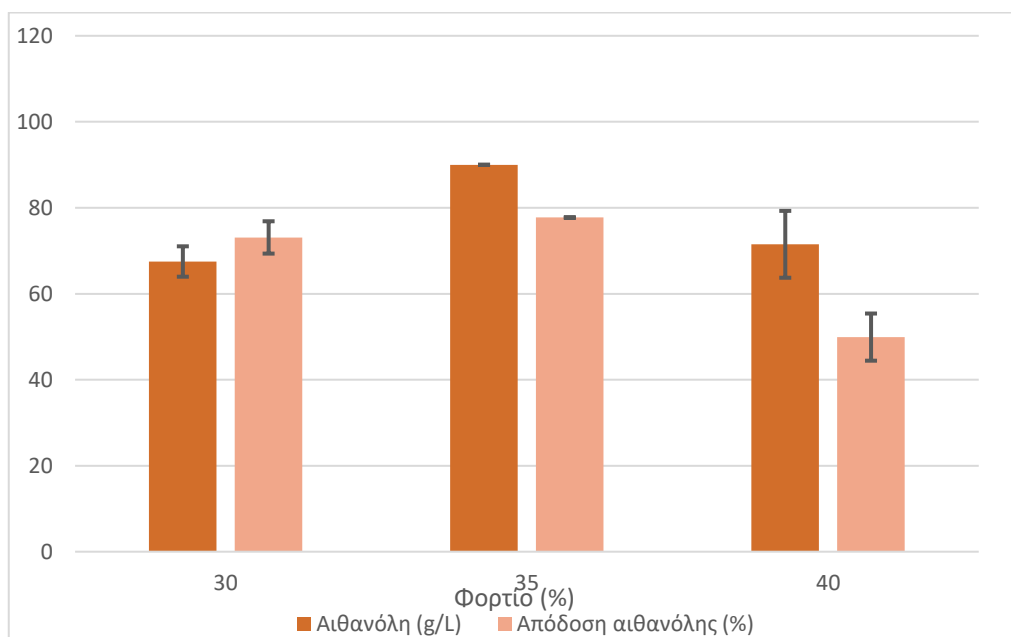
Σχήμα 25: Γράφημα παραγόμενης αιθανόλης (g/L) και απόδοσης αιθανόλης(%) μετά από 24h για 15, 20, 25, 30% w/w φορτίο στερεού με τις συνθήκες της 1<sup>ης</sup> Δοκιμής (Πίνακας 8).

Με την αύξηση του φορτίου γίνεται αντιληπτό ότι αυξάνεται η συγκέντρωση αιθανόλης με την μέγιστη, 70.00 g/L, να παρατηρείται για φορτίο 30% η οποία ταυτόχρονα παρουσιάζει μια ικανοποιητική τιμή για την απόδοση αιθανόλης.

Από τα αποτελέσματα της 1<sup>ης</sup> Δοκιμής (Πίνακας 21) προέκυψε ότι για φορτίο 30%, η απόδοση είναι ικανοποιητική αλλά χαμηλότερη από αυτές που προκύπτουν για τα χαμηλότερα φορτία. Έτσι θεωρήθηκε ότι δεν καταναλώνεται όλη η γλυκόζη στις 24h, και άρα στη 2<sup>η</sup> Δοκιμή έγινε εξέταση των πειραμάτων με μεγαλύτερα φορτία 30%, 35% και 40% και για 48 ώρες. Τα αποτελέσματα που προέκυψαν παρουσιάζονται στον επόμενο πίνακα (Πίνακας 24), από τα οποία φαίνεται ότι για φορτίο 30% δεν υπάρχει ιδιαίτερη απόκλιση τόσο στην παραγόμενη συγκέντρωση αιθανόλης, όσο και στην απόδοσή της στις 24 και 48 ώρες και ότι βέλτιστη συγκέντρωση και απόδοση αιθανόλης παρουσιάζουν τα πειράματα με 35% φορτίο. Άρα τα πειράματα με φορτία άνω του 35% που ακολουθούν μελετώνται για 48 ώρες.

Πίνακας 24: Αποτελέσματα πειραμάτων παραγωγής αιθανόλης σε SSF μετά από 48 ώρες με 30, 35 και 40% w/w φορτίο στερεού (2<sup>η</sup> δοκιμή).

Πείραμα	Φορτίο στερεού (% w/w)	Αμύλαση (μL/g αμύλου)	Μαγιά (% w/w του ξηρού βάρους)	Αιθανόλη (g/L)	Απόδοση αιθανόλης %
1	30	40	2	67.60 ± 3.54	73.10 ± 3.76
2	35	40	2	90.00 ± 0.00	77.73 ± 0.03
3	40	40	2	71.05 ± 7.78	49.92 ± 5.49

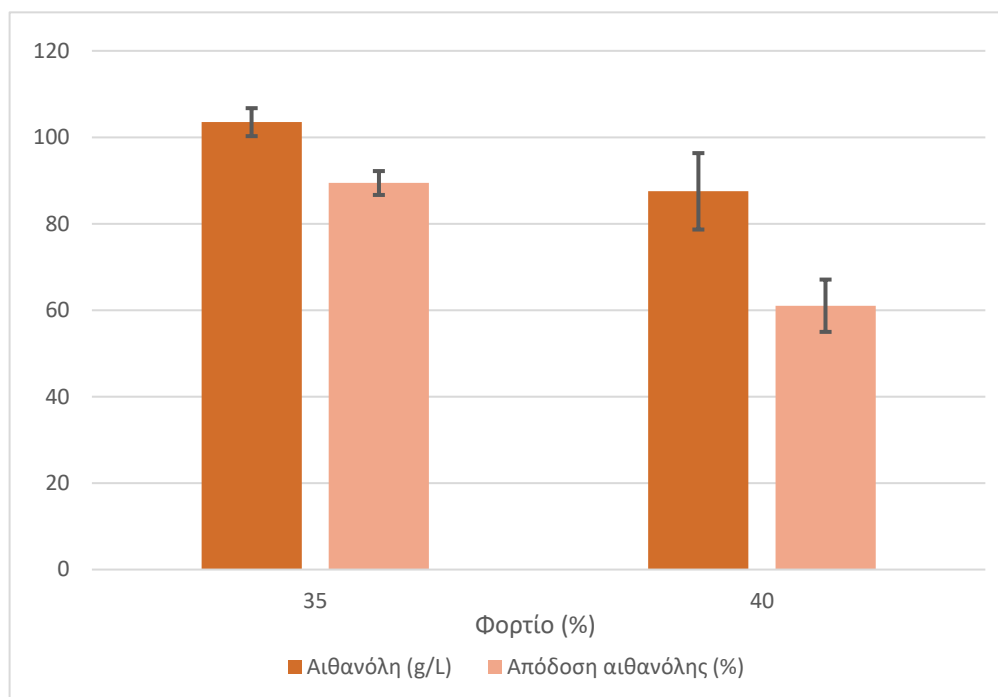


Σχήμα 26: Γράφημα παραγόμενης αιθανόλης (g/L) και απόδοσης αιθανόλης (%) μετά από 48h για 30, 35, 40% w/w φορτίο στερεού με τις συνθήκες της 2<sup>ης</sup> Δοκιμής (Πίνακας 9).

Στην 3<sup>η</sup> Δοκιμή που διενεργήθηκαν τα πειράματα με τα δύο μεγαλύτερα φορτία απότις 2<sup>ης</sup> Δοκιμής, προκειμένου να εξακριβωθεί ποιο από τα δύο είναι το βέλτιστο, αλλά με μεγαλύτερες ποσότητες ενζύμου και μαγιάς. Τα αποτελέσματα που προέκυψαν με τις συνθήκες παρουσιάζονται στον ακόλουθο πίνακα (Πίνακας 25).

Πίνακας 25: Αποτελέσματα πειραμάτων παραγωγής αιθανόλης σε SSF μετά από 48 ώρες με αύξηση ποσότητας ενζύμου και μαγιάς με 35 και 40% w/w φορτίο στερεού (3<sup>ης</sup> δοκιμή).

Πείραμα	Φορτίο στερεού (% w/w)	Αμυλάση (μL/g αμύλου)	Μαγιά (% w/w του ξηρού βάρους)	Θερμοκρασία (°C)	Χρόνος SSF (ώρες)
1	35	60	3	103.50 ± 3.24	89.42 ± 2.76
2	40	60	3	87.50 ± 8.84	61.03 ± 6.05



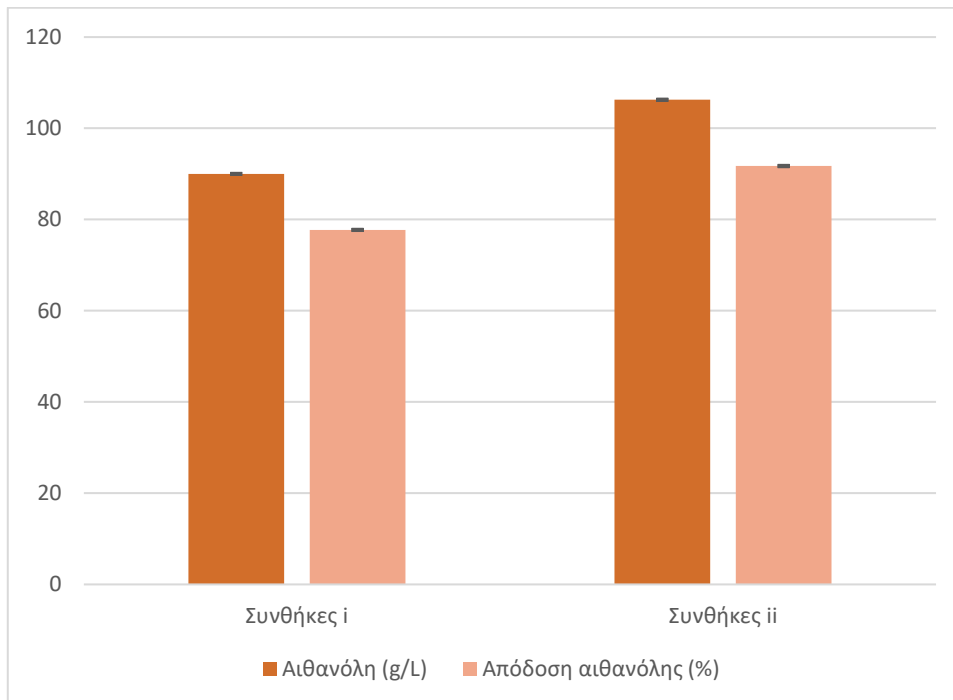
Σχήμα 27: Γράφημα παραγόμενης αιθανόλης (g/L) και απόδοσης αιθανόλης(%) μετά από 48h για 35, 40 % φορτία με τις συνθήκες της 3<sup>ης</sup> Δοκιμή (Πίνακας 10).

Επίσης γίνεται αντιληπτό ότι η αύξηση των ενζύμων και της μαγιάς φέρνουν θετικά αποτελέσματα τόσο στην συγκέντρωση της αιθανόλης όσο και στην απόδοση. Τα αποτελέσματα πλέον ενισχύουν ότι το 35% ότι είναι το βέλτιστο τόσο για την παραγωγή αιθανόλης όσο και για την απόδοση με μέγιστη παραγωγή τα 103.50 g/L.

Παρακάτω παρουσιάζονται τα γραφήματα (για 35, 40% w/w φορτίο στερεού) της παραγόμενης ποσότητας αιθανόλης και απόδοση αιθανόλης (%) υπό τις συνθήκες:

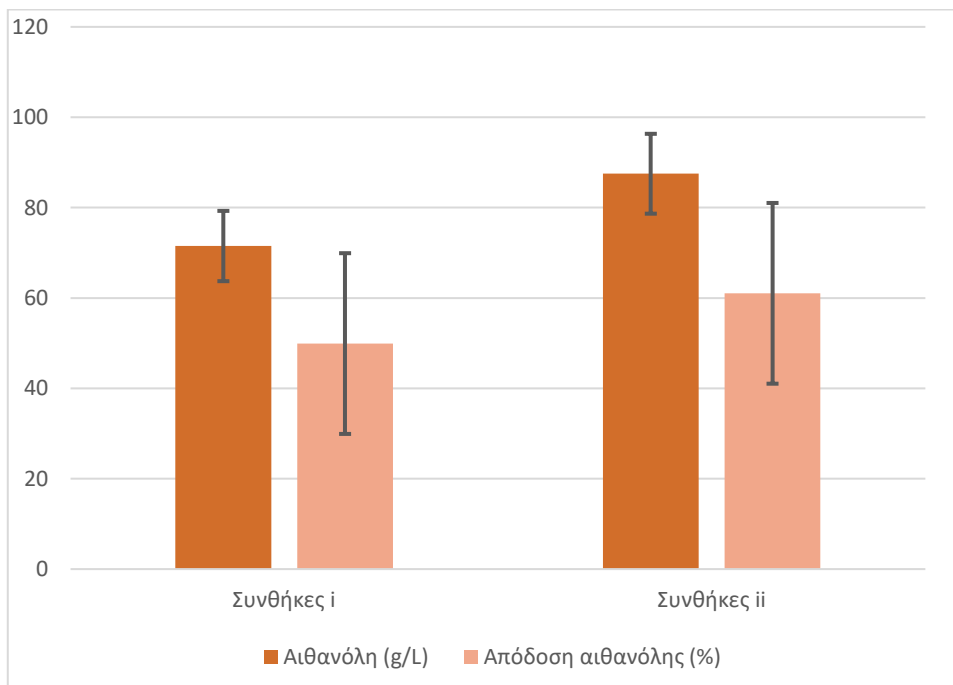
- i. μαγιά 2% w/w του ξηρού βάρους, 40 μL/g αμύλου
- ii. μαγιά 3% w/w του ξηρού βάρους, 60 μL/g αμύλου

Για 35% w/w φορτίο στερεού:



Σχήμα 28: Γράφημα παραγόμενης αιθανόλης (g/L) και απόδοσης αιθανόλης(%) μετά από 48h για 35% w/w φορτίο στερεού για τις συνθήκες i, ii.

Για 40% w/w φορτίο στερεού:



Σχήμα 29: Γράφημα παραγόμενης αιθανόλης (g/L) και απόδοσης αιθανόλης(%) μετά από 48h για 40% w/w φορτίο στερεού για τις συνθήκες i, ii.

Από τα παραπάνω σχήματα γίνεται φανερό ότι οι συνθήκες ii, δηλαδή αυτές με μεγαλύτερα ποσοστά προστιθέμενης μαγιάς και αμυλάσης, λειτουργούν καλύτερα από ότι

οι συνθήκες  $i$ , αφού προκύπτουν μεγαλύτερες συγκεντρώσεις αιθανόλης και υψηλότερες τιμές απόδοσης αιθανόλης.

Για τα πειράματα με φορτίο στερεού 20, 30 και 35% w/w υπολογίστηκε το ποσοστό αποδόμησης στερεού και αμύλου, τα αποτελέσματα των οποίων φαίνονται στον επόμενο πίνακα (Πίνακας 26).

Πίνακας 26: Αποτελέσματα αποδομήσεων στερεού και αμύλου για φορτίο στερεού: 20, 30 και 35% w/w.

Φορτίο στερεού (% w/w)	Αποδόμηση στερεού %	Αποδόμηση αμύλου %
20	75.188 ± 0.386	96.741 ± 0.608
30	78.025 ± 0.244	99.027 ± 0.034
35	74.762 ± 0.214	96.741 ± 0.601

Από τα αποτελέσματα του παραπάνω πίνακα (Πίνακας 26), γίνεται φανερό ότι επιτυγχάνεται πολύ υψηλή αποδόμηση στερεού, ίση περίπου με 75-78% και ακόμα υψηλότερη αποδόμηση αμύλου η οποία κυμαίνεται στο 97-99% .

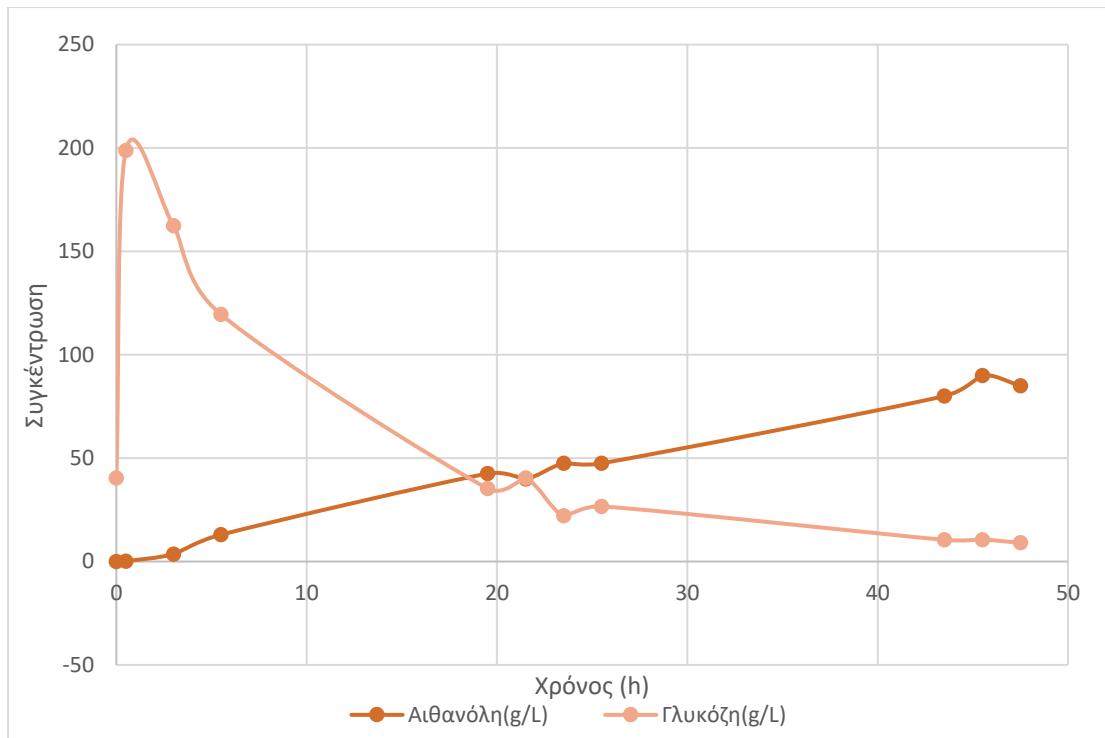
#### 10.2.1.2 ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ ΑΝΑΚΛΙΜΑΚΩΣΗΣ ΣΕ ΑΝΤΙΔΡΑΣΤΗΡΑ 4L

Τα αποτελέσματα από τις μετρήσεις των συγκεντρώσεων γλυκόζης και αιθανόλης ανά τακτά χρονικά διαστήματα παρουσιάζονται στον ακόλουθο πίνακα (Πίνακας 27).

Πίνακας 27: Συγκεντρώσεις γλυκόζης και αιθανόλης σε σχέση με τον χρόνο του πειράματος στον 4L αντιδραστήρα.

Χρόνος (h)	Γλυκόζη (g/L)	Αιθανόλη (g/L)
0.5	198.81	0.23
3	162.45	3.60
5.5	119.45	13.00
19.5	35.34	42.50
21.5	40.34	40.00
23.5	22.14	47.50
25.5	26.64	47.50
43.5	10.51	80.00
45.5	10.57	90.00
47.5	9.07	85.00

Με βάση τις τιμές αυτές προκύπτει το διάγραμμα συγκέντρωσης γλυκόζης και αιθανόλης σε συνάρτηση με το χρόνο (Σχήμα 30).



Σχήμα 30: Διάγραμμα μεταβολής συγκεντρώσεων γλυκόζης και αιθανόλης συναρτήσει του χρόνου.

Τα αποτελέσματα έδειξαν ότι με το πέρασμα του χρόνου η συγκέντρωση αιθανόλης αυξάνεται και η συγκέντρωση γλυκόζης μειώνεται, όπως αναμενόταν. Η μέγιστη τιμή γλυκόζης παρατηρείται στις 45.5h, ίση με 90g/L, τιμή που βρίσκεται πολύ κοντά στην συγκέντρωση αιθανόλης που επιτεύχθηκε στα πειράματα SSF, η οποία ήταν 103.50.

Στο τέλος των 48h λήφθηκαν δείγματα για την μελέτη της αποδόμησης του στερεού και της αποδόμησης του αμύλου. Έτσι, προέκυψε ότι η αποδόμηση του στερεού είναι ίση με  $81.71 \pm 0.72$  % και η αποδόμηση αμύλου ίση με  $99.06 \pm 0.06$  %, τιμές πολύ υψηλές που υποδηλώνουν την επιτυχή διάσπαση σε πολύ μεγάλο βαθμό του στερεού αλλά ιδίως του αμύλου.

#### 10.2.2 ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ ΜΕ ΣΥΝΕΡΓΑΤΙΚΗ ΔΡΑΣΗ ΑΜΥΛΑΣΗΣ ΚΑΙ ΛΑΚΤΑΣΗΣ

Όσον αφορά τα πειράματα με την προσθήκη και του ενζύμου διάσπασης λακτόζης (Lactozyme pure), στην 1<sup>η</sup> Δοκιμή έγινε έλεγχος της λειτουργίας του με υδρόλυση 4 ωρών, και τα αποτελέσματα παρουσιάζονται παρακάτω στον παρακάτω πίνακα (Πίνακας 28).

Πίνακας 28: Αποτελέσματα 1<sup>ης</sup> Δοκιμής με λακτάση.

Πείραμα	Φορτίο στερεού (% w/w)	Λακτάση (mg/g λακτόζης)	Αμυλάση (μL/g αμύλου)	Απόδοση Σακχαροποίησης (%)
1	20	2	40	$70.48 \pm 3.04$
2	20	8	40	$76.48 \pm 2.25$
3	20	0	40	$67.71 \pm 4.21$

Το ένζυμο επιτελεί τον σκοπό προσθήκης του, αφού όπως φαίνεται από την απόδοση σακχαροποίησης επιτυγχάνεται μετατροπή σε γλυκόζη σε ποσοστά άνω του 70%. Η θεωρητική γλυκόζη προκύπτει από την διάσπαση του αμύλου (31%), της λακτόζης (31%) και από την ελεύθερη γλυκόζη (7.5%), όπως παρουσιάζεται αναλυτικά στο κεφάλαιο 8.3, με βάση τον τύπο:

$$\text{Θεωρητική γλυκόζη (g)} = \frac{\text{Θεωρητικό άμυλο (g)}}{0.9} + \text{θεωρητική λακτόζη (g)} \cdot 0.5263$$

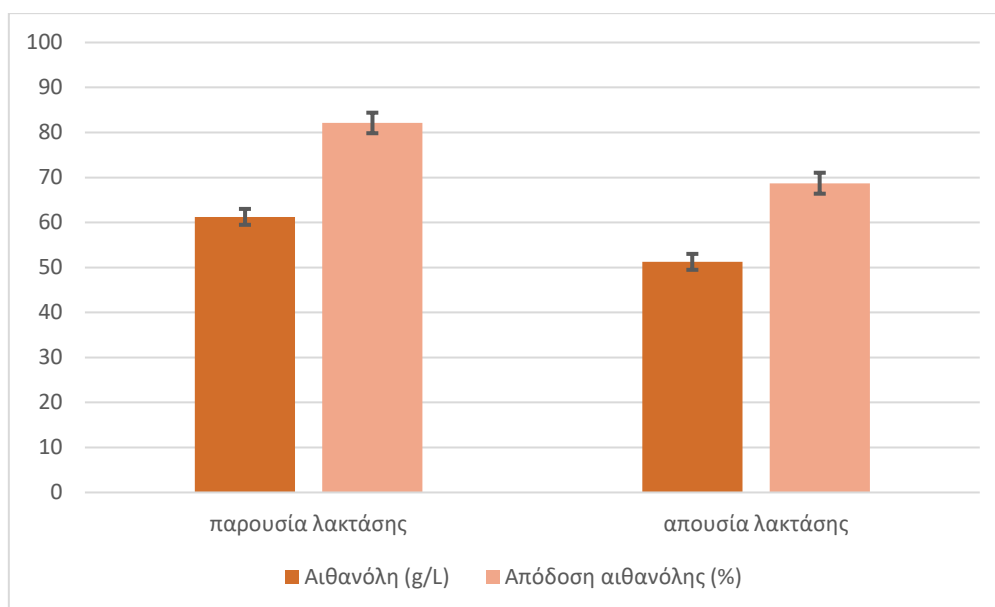
$$+ \% \text{ελεύθερης γλυκόζης} \cdot \text{αρχ. στερεό (g)}$$

Για τα επόμενα πειράματα επιλέχθηκε η μέγιστη δοσολογία λακτάσης, 8 mg/g λακτόζης, επειδή είχε τα καλύτερα αποτελέσματα. Λαμβανόταν δείγμα στις 48 ώρες, που βρέθηκε από τα πειράματα μόνο με αμυλάση ότι παρατηρείται μέγιστη παραγωγή αιθανόλης με ταυτόχρονα καλές τιμές απόδοσης. Τα αποτελέσματα παρουσιάζονται στον παρακάτω πίνακα (Πίνακας 29).

Πίνακας 29: Αποτελέσματα πειραμάτων παραγωγής αιθανόλης σε SSF με λακτάση και αμυλάση με 20% w/w φορτίο στερεού (2<sup>η</sup> Δοκιμή).

Πείραμα	Φορτίο στερεού (% w/w)	Λακτάση (mg/g λακτόζης)	Αμυλάση (μL/g αμύλου)	Μαγιά (% w/w του ξηρού βάρους)	Αιθανόλη (g/L)	Απόδοση αιθανόλης (%)
1	20	8	40	2	61.25 ± 1.77	82.12 ± 2.28
2	20	0	40	2	51.25 ± 1.77	68.72 ± 2.33

Παρακάτω φαίνεται το γράφημα συγκέντρωσης της αιθανόλης και απόδοσης της, για τα πειράματα 20% φορτίου, με παρουσία και απουσία της λακτάσης.



Σχήμα 31: Γράφημα παραγόμενης αιθανόλης (g/L) και απόδοσης αιθανόλης(%) μετά από 48h με 20% w/w φορτίο στερεού, με παρουσία και απουσία λακτάσης.

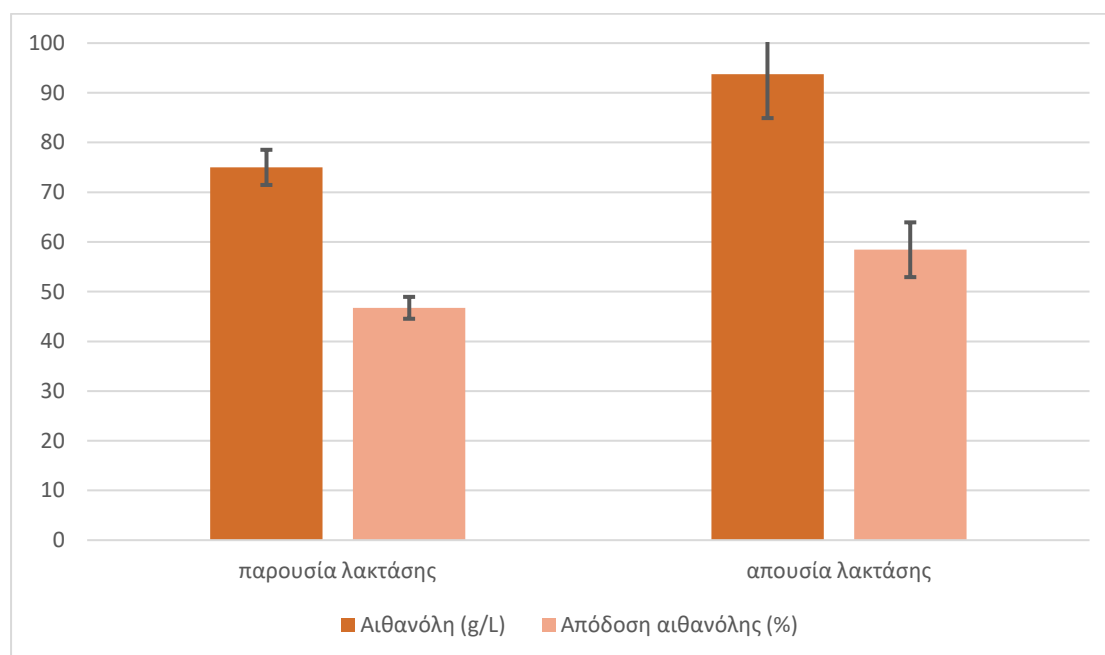
Από τα αποτελέσματα προκύπτει ότι η προσθήκη του ενζύμου δεν επηρέασε ιδιαίτερα την παραγωγή αιθανόλης, ενώ η απόδοση αιθανόλης εμφανίζει καλύτερες τιμές για τα πειράματα, στα οποία προστέθηκε λακτάση με απόδοση 82.12% αντί για 68.72% χωρίς προσθήκη λακτάσης.

Στην επόμενη δοκιμή που ελέγχθηκαν οι βέλτιστες συνθήκες που βρέθηκαν για τα προηγούμενα πειράματα, στα οποία γινόταν προσθήκη μόνο αμυλάσης, προέκυψαν τα αποτελέσματα που φαίνονται στον επόμενο πίνακα (Πίνακας 30).

Πίνακας 30: Αποτελέσματα πειραμάτων παραγωγής αιθανόλης σε SSF με λακτάση και αμυλάση με 35% w/w φορτίο στερεού (3<sup>η</sup> Δοκιμή).

Πείραμα	Φορτίο στερεού (% w/w)	Λακτάση (mg/g λακτόζης)	Αμυλάση (μL/g αμύλου)	Μαγιά (% w/w του ξηρού βάρους)	Αιθανόλη (g/L)	Απόδοση αιθανόλης (%)	Γλυκόζη (g/L)
1	35	8	60	3	75.00 ± 3.54	46.74 ± 2.20	18.72 ± 4.31
2	35	0	60	3	93.75 ± 8.84	58.43 ± 5.50	6.61 ± 1.72

Παρακάτω φαίνεται το γράφημα συγκέντρωσης της αιθανόλης και απόδοσης της, για τα πειράματα με 35% w/w φορτίο στερεού, με παρουσία και απουσία της λακτάσης.



Σχήμα 32: Γράφημα παραγόμενης αιθανόλης (g/L) και απόδοσης αιθανόλης(%) μετά από 48h με 35% w/w φορτίο στερεού, με παρουσία και απουσία λακτάσης.

Από τα αποτελέσματα γίνεται αντιληπτό ότι η παρουσία λακτάσης δεν αυξάνει τη συγκέντρωση της παραγόμενης αιθανόλης. Μάλιστα στα πειράματα απουσία λακτάσης η αιθανόλη παρουσιάζει μεγαλύτερη συγκέντρωση με ταυτόχρονα πολύ υψηλότερη απόδοση.

Στα παραπάνω πειράματα έγινε μέτρηση μετά το πέρας των 48h της περίσσειας γλυκόζης, τα αποτελέσματα της οποίας φαίνονται στον παραπάνω πίνακα (Πίνακας 30). Από τα αποτελέσματα γίνεται φανερό ότι υπάρχει ακόμη υψηλή συγκέντρωση γλυκόζης, υψηλότερη προφανώς στο πείραμα που χρησιμοποιήθηκαν και τα δύο ένζυμα, που δεν έχει καταναλωθεί. Η υψηλή συγκέντρωση γλυκόζης πιθανώς παρεμποδίζει τον μικροοργανισμό να πραγματοποιήσει την ζύμωση, εξού και η αρκετά χαμηλή τιμή απόδοσης αιθανόλης στο πείραμα με την προσθήκη λακτάσης. Από την άλλη πλευρά, πιθανότητα απαιτείται μεγαλύτερος χρόνος ώστε να καταναλωθεί κι η υπόλοιπη γλυκόζη. Με αυτό τον τρόπο, θα μπορούσε να αυξηθεί η απόδοση αιθανόλης.

Συγκρίνοντας τα αποτελέσματα της 2<sup>ης</sup> και 3<sup>ης</sup> Δοκιμής, συμπεραίνουμε ότι τα πειράματα με το χαμηλότερο φορτίο 20% και με συγκέντρωση λακτάσης ίση με 8mg/g λακτόζης φέρουν καλύτερα αποτελέσματα συνολικά, με μέγιστη παραγωγή τα 58.75g/L.



### 10.3 ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ ΠΑΡΑΓΩΓΗΣ ΓΑΛΑΚΤΙΚΟΥ ΟΞΕΟΣ

Οι συγκεντρώσεις των συστατικών, μετά την ζύμωση προς παραγωγή γαλακτικού οξέος σε καθένα από τα δείγματα μετρήθηκαν μέσω της μεθόδου υγρής χρωματογραφίας (HPLC).

#### 10.3.1 ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ ΕΠΙΔΡΑΣΗΣ ΕΙΔΟΥΣ ΜΙΚΡΟΟΡΓΑΝΙΣΜΩΝ

Αρχικά με τη χρήση *Sacchromyces Cerevisiae* προέκυψε ότι δεν ήταν δυνατή η παραγωγή του γαλακτικού οξέος ούτε μετά το πέρας της 1<sup>ης</sup> μέρας ούτε της 2<sup>ης</sup>, κατά τις οποίες λήφθηκαν δείγματα, καθώς παραγόταν μόνο η αιθανόλη.

Τα αποτελέσματα των μετρήσεων των δειγμάτων της δοκιμής 1 παρουσιάζονται στους παρακάτω πίνακες (Πίνακας 31-Πίνακας 42):

Πίνακας 31: Αποτελέσματα παραγωγής γαλακτικού οξέος με εμπορικό σύμπλεγμα πηκτικών ενζύμων και αμυλάση (Δοκιμή 1).

Χρόνος (h)	Γλυκόζη (g/L)	Γαλακτικό Οξύ (g/L)
24	14.27 ± 0.94	0.47 ± 0.09
48	5.30 ± 0.27	1.55 ± 0.11
72	5.18 ± 0.51	1.53 ± 0.13

Πίνακας 32: Αποτελέσματα παραγωγής γαλακτικού οξέος με εμπορικό σύμπλεγμα πηκτικών ενζύμων και λακτάση (Δοκιμή 1).

Χρόνος (h)	Γλυκόζη (g/L)	Γαλακτικό Οξύ (g/L)
24	15.70 ± 1.01	1.03 ± 0.24
48	10.32 ± 0.87	0.08 ± 0.01
72	10.29 ± 0.71	0.07 ± 0.00

Πίνακας 33: Αποτελέσματα παραγωγής γαλακτικού οξέος με εμπορικό σύμπλεγμα πηκτικών ενζύμων, αμυλάση και λακτάση (Δοκιμή 1).

Χρόνος (h)	Γλυκόζη (g/L)	Γαλακτικό Οξύ (g/L)
24	39.25 ± 2.03	1.10 ± 0.12
48	25.10 ± 1.31	0.15 ± 0.04
72	24.89 ± 1.60	0.13 ± 0.07

Πίνακας 34: Αποτελέσματα παραγωγής γαλακτικού οξέος με *Lactobacillus* & *Streptococcus* και αμυλάση (Δοκιμή 1).

Χρόνος (h)	Λακτόζη (g/L)	Γλυκόζη (g/L)	Γαλακτόζη (g/L)	Γαλακτικό Οξύ (g/L)	Οξικό Οξύ (g/L)	Αιθανόλη (g/L)
24	29.20 ± 1.20	39.47 ± 1.54	9.19 ± 0.67	3.01 ± 0.68	0.00 ± 0.00	0.00 ± 0.00
48	22.78 ± 1.31	27.64 ± 1.36	9.45 ± 0.71	5.14 ± 0.73	0.78 ± 0.01	3.71 ± 0.10
72	20.14 ± 0.99	25.87 ± 1.24	9.34 ± 0.82	5.72 ± 0.38	0.82 ± 0.01	3.98 ± 0.17

Πίνακας 35: Αποτελέσματα παραγωγής γαλακτικού οξέος με *Lactobacillus* & *Streptococcus* και λακτάση (Δοκιμή 1).

Χρόνος (h)	Λακτόζη (g/L)	Γλυκόζη (g/L)	Γαλακτόζη (g/L)	Γαλακτικό Οξύ (g/L)	Οξικό Οξύ (g/L)	Αιθανόλη (g/L)
24	8.75 ± 0.95	33.85 ± 1.26	16.64 ± 1.02	3.96 ± 0.73	0.14 ± 0.01	3.19 ± 0.14
48	10.21 ± 1.05	25.54 ± 1.12	17.95 ± 1.55	8.29 ± 0.59	0.61 ± 0.01	11.93 ± 0.21
72	10.94 ± 1.06	25.96 ± 1.56	17.76 ± 1.44	8.41 ± 0.78	0.82 ± 0.02	11.96 ± 0.31

Πίνακας 36: Αποτελέσματα παραγωγής γαλακτικού οξέος με *Lactobacillus* & *Streptococcus*, αμυλάση και λακτάση (Δοκιμή 1).

Χρόνος (h)	Λακτόζη (g/L)	Γλυκόζη (g/L)	Γαλακτόζη (g/L)	Γαλακτικό Οξύ (g/L)	Οξικό Οξύ (g/L)	Αιθανόλη (g/L)
24	9.26 ± 0.76	33.96 ± 1.61	17.07 ± 1.93	4.09 ± 0.83	0.14 ± 0.01	4.84 ± 0.47
48	7.81 ± 0.89	19.36 ± 1.62	17.18 ± 1.12	7.96 ± 0.64	1.02 ± 0.02	12.15 ± 0.28
72	8.31 ± 0.56	19.31 ± 1.81	17.16 ± 0.99	8.09 ± 0.29	1.05 ± 0.04	12.53 ± 0.89

Πίνακας 37: Αποτελέσματα παραγωγής γαλακτικού οξέος με μείγμα *Lactobacillus* και αμυλάση (Δοκιμή 1).

Χρόνος (h)	Λακτόζη (g/L)	Γλυκόζη (g/L)	Γαλακτόζη (g/L)	Γαλακτικό Οξύ (g/L)	Οξικό Οξύ (g/L)	Αιθανόλη (g/L)
24	22.71 ± 1.41	36.57 ± 1.40	8.33 ± 0.80	6.62 ± 1.10	0.32 ± 0.07	1.62 ± 0.09
48	27.81 ± 1.22	39.32 ± 1.70	11.77 ± 0.94	14.29 ± 1.40	0.57 ± 0.04	2.82 ± 0.12
72	23.99 ± 1.30	25.37 ± 1.90	10.12 ± 1.03	12.96 ± 0.90	0.59 ± 0.06	4.25 ± 0.25

Πίνακας 38: Αποτελέσματα παραγωγής γαλακτικού οξέος με μείγμα *Lactobacillus* και λακτάση (Δοκιμή 1).

Χρόνος (h)	Λακτόζη (g/L)	Γλυκόζη (g/L)	Γαλακτόζη (g/L)	Γαλακτικό Οξύ (g/L)	Οξικό Οξύ (g/L)	Αιθανόλη (g/L)
24	7.87 ± 1.33	30.15 ± 1.44	18.42 ± 0.90	5.83 ± 0.90	0.19 ± 0.04	0.00 ± 0.00
48	9.80 ± 1.24	23.77 ± 1.36	16.78 ± 0.90	13.14 ± 1.06	0.41 ± 0.05	5.94 ± 0.44
72	12.23 ± 1.54	24.13 ± 1.20	15.90 ± 1.20	16.4 ± 1.23	0.44 ± 0.01	5.93 ± 0.51

Πίνακας 39: Αποτελέσματα παραγωγής γαλακτικού οξέος με μείγμα *Lactobacillus*, αμυλάση και λακτάση (Δοκιμή 1).

Χρόνος (h)	Λακτόζη (g/L)	Γλυκόζη (g/L)	Γαλακτόζη (g/L)	Γαλακτικό Οξύ (g/L)	Οξικό Οξύ (g/L)	Αιθανόλη (g/L)
24	2.64 ± 0.70	42.58 ± 2.04	21.10 ± 1.90	7.26 ± 0.88	0.34 ± 0.02	0.00 ± 0.00
48	3.58 ± 0.80	48.04 ± 1.97	26.25 ± 0.88	14.17 ± 1.21	0.55 ± 0.03	3.59 ± 0.45
72	2.67 ± 0.67	26.94 ± 1.29	21.52 ± 1.12	14.17 ± 1.14	0.53 ± 0.03	11.11 ± 0.51

Πίνακας 40: Αποτελέσματα παραγωγής γαλακτικού οξέος με μεικτή καλλιέργεια και αμυλάση (Δοκιμή 1).

Χρόνος (h)	Λακτόζη (g/L)	Γλυκόζη (g/L)	Γαλακτόζη (g/L)	Γαλακτικό Οξύ (g/L)	Οξικό Οξύ (g/L)	Αιθανόλη (g/L)
24	25.32 ± 1.05	49.68 ± 2.20	11.13 ± 0.90	6.39 ± 0.98	0.22 ± 0.01	0.74 ± 0.05
48	28.05 ± 1.16	47.31 ± 1.80	12.16 ± 0.80	13.02 ± 1.20	0.44 ± 0.02	1.85 ± 0.34
72	25.34 ± 1.23	26.35 ± 1.90	9.46 ± 0.70	16.56 ± 1.12	0.55 ± 0.02	10.59 ± 0.80

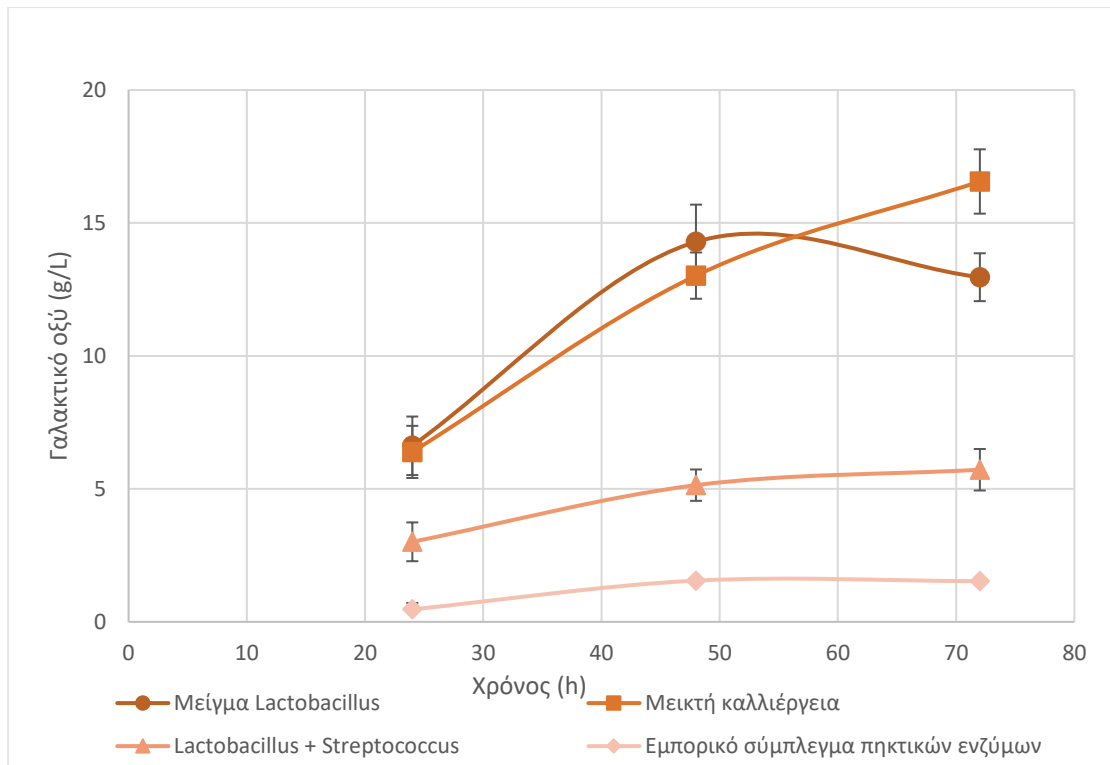
Πίνακας 41: Αποτελέσματα παραγωγής γαλακτικού οξέος με μεικτή καλλιέργεια και λακτάση (Δοκιμή 1).

Χρόνος (h)	Λακτόζη (g/L)	Γλυκόζη (g/L)	Γαλακτόζη (g/L)	Γαλακτικό Οξύ (g/L)	Οξικό Οξύ (g/L)	Αιθανόλη (g/L)
24	11.34 ± 1.21	39.32 ± 1.80	22.55 ± 1.60	5.31 ± 0.98	0.32 ± 0.01	0.34 ± 0.01
48	11.44 ± 1.33	43.80 ± 1.70	22.54 ± 1.34	11.83 ± 0.87	0.63 ± 0.04	0.75 ± 0.04
72	11.46 ± 1.25	46.46 ± 1.90	24.58 ± 1.27	18.87 ± 1.21	0.92 ± 0.05	5.33 ± 0.27

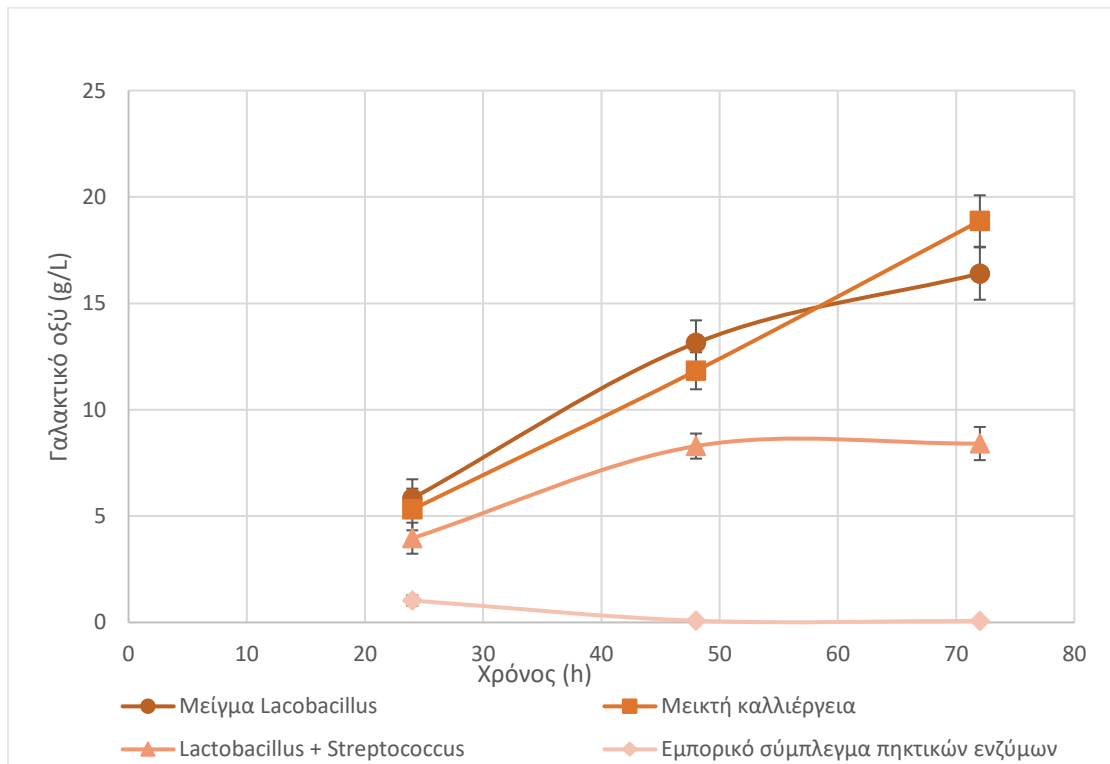
Πίνακας 42: Αποτελέσματα παραγωγής γαλακτικού οξέος με μεικτή καλλιέργεια, αμυλάση και λακτάση (Δοκιμή 1).

Χρόνος (h)	Λακτόζη (g/L)	Γλυκόζη (g/L)	Γαλακτόζη (g/L)	Γαλακτικό Οξύ (g/L)	Οξικό Οξύ (g/L)	Αιθανόλη (g/L)
24	4.84 ± 0.87	61.32 ± 2.34	26.89 ± 1.21	6.22 ± 0.93	0.24 ± 0.02	0.00 ± 0.00
48	5.24 ± 1.33	53.61 ± 2.21	25.18 ± 1.12	13.62 ± 0.84	0.53 ± 0.01	3.84 ± 0.12
72	4.72 ± 1.11	25.90 ± 2.53	21.12 ± 1.32	19.19 ± 1.03	0.62 ± 0.01	0.38 ± 0.04

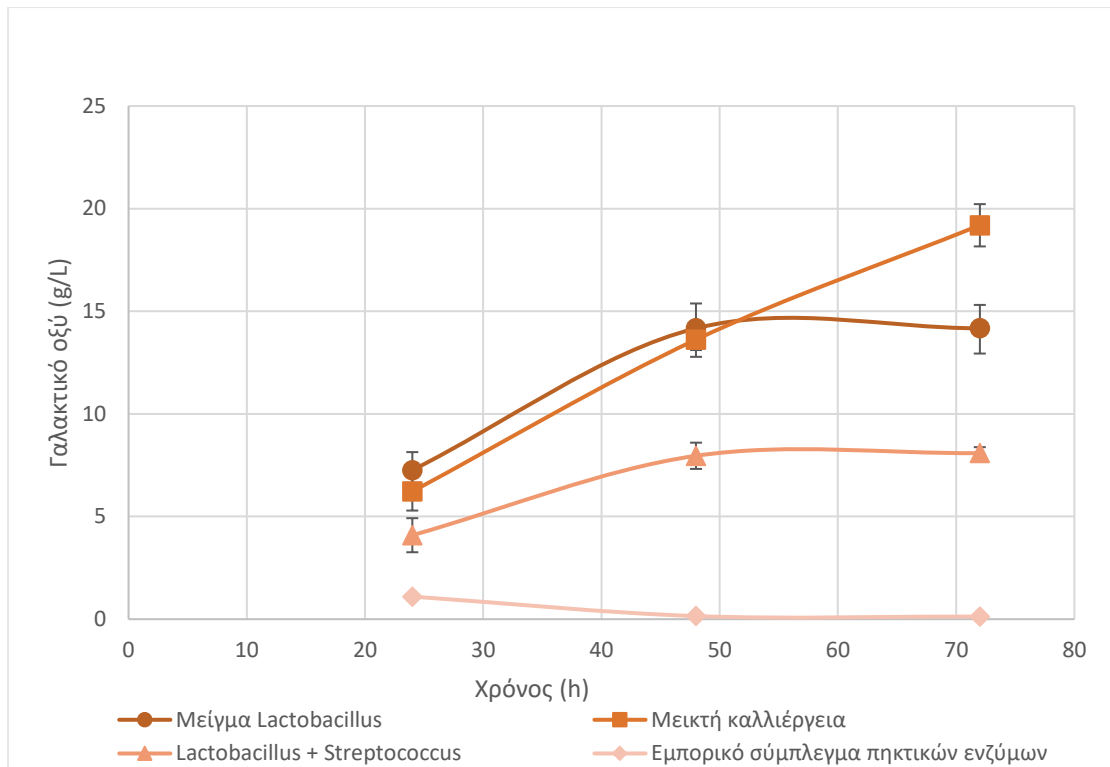
Με βάση τους παραπάνω πίνακες (Πίνακας 31-Πίνακας 42) προκύπτουν τα επόμενα διαγράμματα (Σχήμα 33-Σχήμα 39).



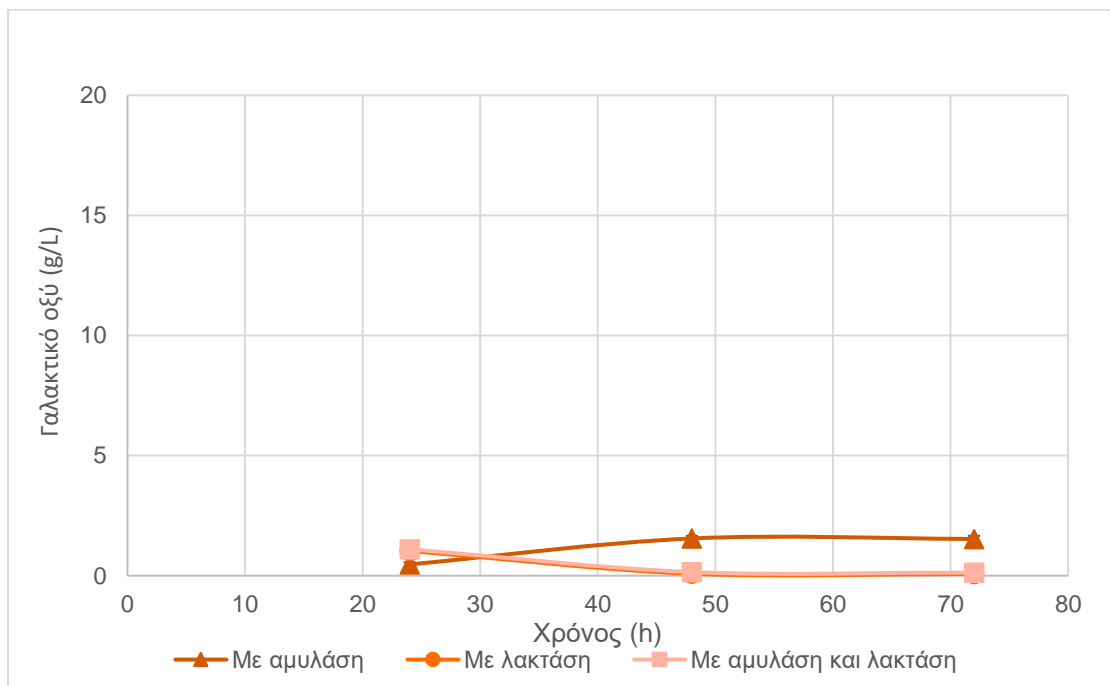
Σχήμα 33: Επίδραση του είδους των μικροοργανισμών στη συγκέντρωση γαλακτικού οξέος συναρτήσει του χρόνου για την παραγωγή γαλακτικού οξέος με προσθήκη αμυλάσης (Δοκιμή 1).



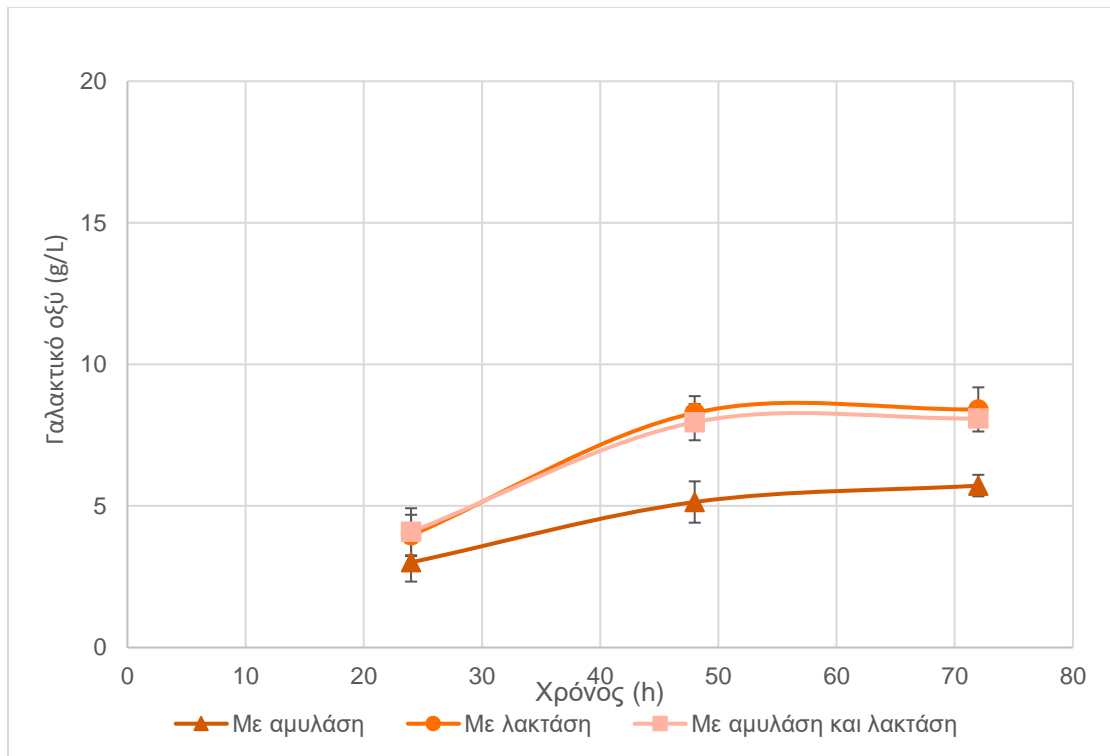
Σχήμα 34: Επίδραση του είδους των μικροοργανισμών στη συγκέντρωση γαλακτικού οξέος συναρτήσει του χρόνου για την παραγωγή γαλακτικού οξέος με προσθήκη λακτάσης (Δοκιμή 1).



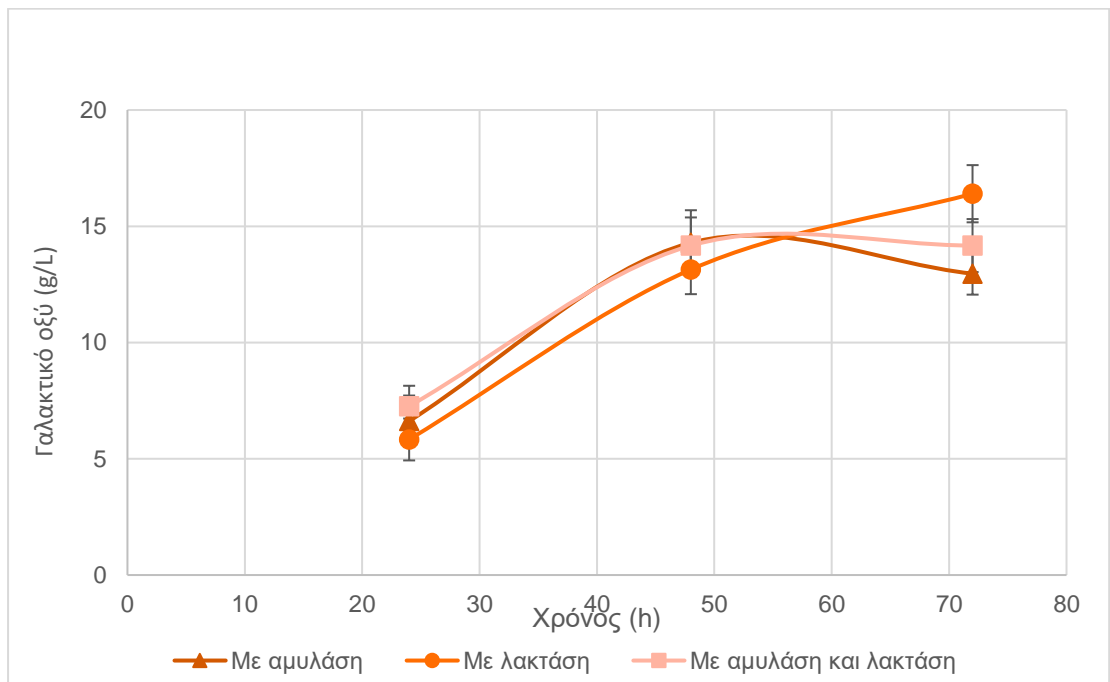
Σχήμα 35: Επίδραση του είδους των μικροοργανισμών στη συγκέντρωση γαλακτικού οξέος συναρτήσει του χρόνου για την παραγωγή γαλακτικού οξέος με προσθήκη αμυλάσης και λακτάσης (Δοκιμή 1).



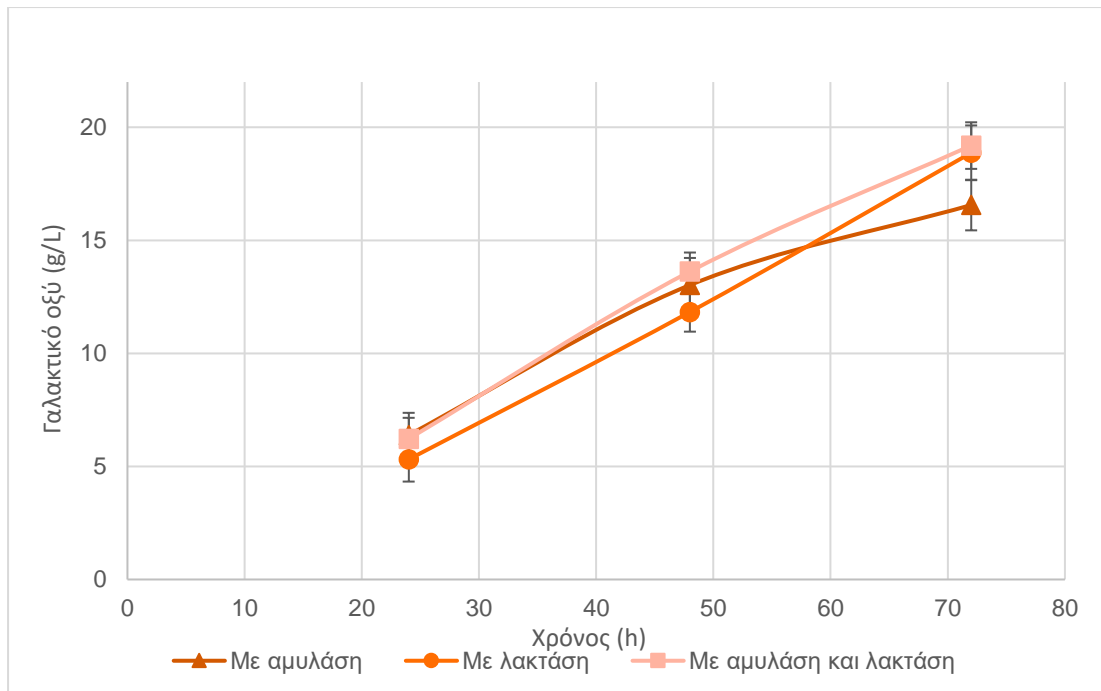
Σχήμα 36: Επίδραση ενζύμων στην συγκέντρωση γαλακτικού οξέος με εμπορικό σύμπλεγμα πηκτικών ενζύμων (Δοκιμή 1).



Σχήμα 37: Επίδραση ενζύμων στη συγκέντρωση γαλακτικού οξέος για τα πειράματα με *Lactobacillus* & *Streptococcus* (Δοκιμή 1).



Σχήμα 38: Επίδραση ενζύμων στη συγκέντρωση γαλακτικού οξέος με μείγμα *Lactobacillus* (Δοκιμή 1).



Σχήμα 39: Επίδραση ενζύμων στη συγκέντρωση γαλακτικού οξέος για τα πειράματα με μεικτή καλλιέργεια (Δοκιμή 1).

Από τα παραπάνω αποτελέσματα προέκυψε ότι εκτός από γαλακτικό οξύ, παράγεται και αιθανόλη σε αρκετά μικρότερη συγκέντρωση αλλά και πολύ μικρές ποσότητες οξικού οξέος. Στα πειράματα που έχει προστεθεί και η λακτάση παρατηρούνται προφανώς μικρότερες συγκεντρώσεις λακτόζης. Με το πέρασμα του χρόνου, οι συγκεντρώσεις λακτόζης, γλυκόζης και γαλακτόζης μειώνονται, καθώς αυτά καταναλώνονται για την παραγωγή αιθανόλης γαλακτικού οξέος και οξικού οξέος.

Τα πειράματα που πραγματοποιήθηκαν με προσθήκη *Lactobacillus* & *Streptococcus* και το εμπορικό σύμπλεγμα ηηκτικών ενζύμων δεν έδωσαν τα επιθυμητά αποτελέσματα όσον αφορά την παραγωγή του γαλακτικού οξέος για αυτό και δεν συνεχίστηκαν στην επόμενη δοκιμή. Επίσης, τα αποτελέσματα γαλακτικού οξέος με χρήση μόνο αμυλάσης, μόνο λακτάσης και συνδυασμού των δύο ενζύμων ήταν παρεμφερή και έτσι δεν μπορεί να βγει ξεκάθαρο συμπέρασμα για την επίδραση των ενζύμων.

Από τα αποτελέσματα των πειραμάτων με μείγμα *Lactobacillus* και με μεικτή καλλιέργεια, υπολογίστηκαν οι παραγωγικότητες ως προς το γαλακτικό οξύ και αναγράφονται στους παρακάτω πίνακες (Πίνακας 43-Πίνακας 45).

Πίνακας 43: Παραγωγικότητα γαλακτικού οξέος με μείγμα *Lactobacillus* και μεικτή καλλιέργεια με αμυλάση (Δοκιμή 1).

Αμυλάση	Μείγμα <i>Lactobacillus</i>		Μεικτή καλλιέργεια	
	Χρόνος (h)	Γαλακτικό Οξύ (g/L)	Παραγωγικότητα (g/L/h)	Γαλακτικό Οξύ (g/L)
24	6.62 ± 1.10	0.28 ± 0.05	6.39 ± 0.90	0.27 ± 0.04
48	14.29 ± 1.40	0.32 ± 0.06	13.02 ± 0.80	0.28 ± 0.03
72	12.96 ± 0.90	0.06 ± 0.04	16.56 ± 0.70	0.15 ± 0.03

Πίνακας 44: Παραγωγικότητα γαλακτικού οξέος με μείγμα *Lactobacillus* και μεικτή καλλιέργεια με λακτάση (Δοκιμή 1).

Λακτάση	Μείγμα <i>Lactobacillus</i>		Μεικτή καλλιέργεια	
	Γαλακτικό Οξύ (g/L)	Παραγωγικότητα (g/L/h)	Γαλακτικό Οξύ (g/L)	Παραγωγικότητα (g/L/h)
Χρόνος (h)				
24	5.83 ± 0.90	0.24 ± 0.04	5.31 ± 0.98	0.22 ± 0.04
48	13.14 ± 1.06	0.30 ± 0.04	11.83 ± 0.87	0.27 ± 0.04
72	16.4 ± 1.23	0.14 ± 0.05	18.87 ± 1.21	0.29 ± 0.05

Πίνακας 45: Παραγωγικότητα γαλακτικού οξέος με μείγμα *Lactobacillus* και μεικτή καλλιέργεια με αμυλάση και λακτάση (Δοκιμή 1).

Αμυλάση και Λακτάση	Μείγμα <i>Lactobacillus</i>		Μεικτή καλλιέργεια	
	Γαλακτικό Οξύ (g/L)	Παραγωγικότητα (g/L/h)	Γαλακτικό Οξύ (g/L)	Παραγωγικότητα (g/L/h)
Χρόνος (h)				
24	7.26 ± 0.88	0.30 ± 0.04	6.22 ± 0.93	0.26 ± 0.04
48	14.17 ± 1.21	0.29 ± 0.05	13.62 ± 0.84	0.31 ± 0.04
72	14.17 ± 1.14	0.00 ± 0.00	19.19 ± 1.03	0.23 ± 0.04

Στις 24h μεγαλύτερες συγκεντρώσεις γαλακτικού παρατηρήθηκαν για τα δείγματα με χρήση μείγματος *Lactobacillus* και συγκεκριμένα σε αυτό με την προσθήκη και των δυο ενζύμων, με συγκέντρωση γαλακτικού οξέος ίση 7.26g/L ενώ και τα πειράματα με χρήση της μεικτής καλλιέργειας δεν απείχαν πολύ με συγκέντρωση ίση με 6.22g/L.

Στις 48h τα αποτελέσματα ήταν βέλτιστα πάλι για τα δείγματα με μείγμα *Lactobacillus* με τα πειράματα, στα οποία προστέθηκαν αμυλάση και με συνδυασμό των ενζύμων, αμυλάσης και λακτάσης, να εμφανίζουν παραπλήσιες τιμές 14.29 και 14.17g/L αντίστοιχα. Και στις 48h τα πειράματα με τη μεικτή καλλιέργεια εμφανίζουν πολύ κοντινές τιμές με τα πειράματα με μείγμα *Lactobacillus*, ενώ ταυτόχρονα παρουσιάζουν και μεγαλύτερη τιμή παραγωγικότητας.

Στις 72h παρατηρήθηκε μια μικρή αύξηση στα πειράματα με μείγμα *Lactobacillus* μόνο σε αυτό με τη λακτάση, ενώ τα καλύτερα αποτελέσματα προέκυψαν με τη χρήση της μεικτής καλλιέργειας και συγκεκριμένα το δείγμα, στο οποίο έγινε προσθήκη και των δυο ενζύμων, αμυλάση και λακτάση, η παραγωγή του οξέος προέκυψε ίση με 19.19g/L.

Συνολικά, με τη χρήση μείγματος *Lactobacillus* παρατηρείται μια αρχικά υψηλή παραγωγικότητα (για τις 48h), η οποία έπειτα στις 72h (3d) μειώνεται σε μεγάλο βαθμό (από 0.30 g/L/h στις 48h σε 0.14g/L/h στις 72h) και άρα δεν ωφελεί η συνέχιση των μετρήσεων για περισσότερες ώρες.

Όσον αφορά τα πειράματα με τη μεικτή καλλιέργεια η παραγωγικότητα τις πρώτες 48h είναι στα ίδια περίπου επίπεδα με αυτά που έχουν τα πειράματα με μείγμα *Lactobacillus*, ενώ η υψηλή τιμή της συνεχίζεται και στις 72h, και άρα αξίζει η συνέχιση των πειραμάτων και για περισσότερες ώρες.

Στα παραπάνω διαγράμματα (Σχήμα 36-Σχήμα 39) παρουσιάζεται η επίδραση των ενζύμων στην παραγόμενη συγκέντρωση, από όπου συμπεραίνεται ότι όλα τα ένζυμα και ο συνδυασμός τους έχουν περίπου ίδια επίδραση.

Παρακάτω (Πίνακας 46) παρουσιάζονται συνοπτικά τα αποτελέσματα της Δοκιμής 1 και υπολογίζεται η απόδοση με βάση την θεωρητικά παραγόμενη συγκέντρωση γαλακτικού οξέος, αν πέρα από το αρχικό γαλακτικό οξύ στο στερεό, μετατρέπεται και όλη η γλυκόζη και γαλακτόζη σε γαλακτικό οξύ.



Πίνακας 46: Απόδοση γαλακτικού οξέος και παραγωγικότητα από τη μελέτη της επίδρασης των μικροοργανισμών για την παραγωγή γαλακτικού οξέος (Δοκιμή 1).

	Ένζυμο	Αρχικό Γαλακτικό Οξύ (g/L)	Μέγιστο Γαλακτικό Οξύ (g/L)	Χρόνος (h)	Απόδοση γαλακτικού οξέος (%)	Παραγωγικότητα (g/L/h)
Εμπορικό σύμπλεγμα πηκτικών ενζύμων	Αμυλάση	0.38	1.55	48	3.25	0.05
	Λακτάση	0.38	1.03	24	0.41	0.03
	Αμυλάση και λακτάση	0.38	1.1	48	0.55	0.03
<i>Lactobacillus &amp; Streptococcus</i>	Αμυλάση	0.38	5.72	72	12.29	0.02
	Λακτάση	0.38	8.41	72	18,14	0.01
	Αμυλάση και λακτάση	0.38	8.09	72	17,52	0.01
Μείγμα <i>Lactobacillus</i>	Αμυλάση	0.38	14.29	48	28.47	0.32
	Λακτάση	0.38	16.40	72	34.12	0.14
	Αμυλάση και λακτάση	0.38	14.17	72	30.76	0.29
Μεικτή καλλιέργεια	Αμυλάση	0.38	16.56	72	34.51	0.15
	Λακτάση	0.38	18.87	72	38.06	0.29
	Αμυλάση και λακτάση	0.38	19.19	72	39.32	0.23

#### 10.3.2 ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ ΕΠΙΔΡΑΣΗΣ ΤΟΥ ΧΡΟΝΟΥ ΚΑΙ ΤΗΣ ΠΡΟΣΘΗΚΗΣ ΕΝΖΥΜΩΝ

Στη Δοκιμή 1 τα πειράματα με μεικτή καλλιέργεια, παρουσίασαν αύξηση συγκέντρωσης γαλακτικού οξέος μέχρι τις 72 ώρες, όπου λήφθηκε δείγμα, καθώς και μεγαλύτερη συγκέντρωση σε σύγκριση με τις υπόλοιπες καλλιέργειες που χρησιμοποιήθηκαν για την παραγωγή γαλακτικού οξέος. Επίσης, παρατηρήθηκε ότι η παραγωγικότητα είναι μεγαλύτερη στα πειράματα με τον συνδυασμό των δύο ενζύμων και στα πειράματα μόνο με λακτάση. Επομένως, στη Δοκιμή 2 χρησιμοποιήθηκε μεικτή καλλιέργεια και πραγματοποιήθηκαν πειράματα χωρίς ένζυμο, με χρήση μόνο λακτάσης και με χρήση και των δύο ενζύμων μαζί, για να εξεταστεί εάν συνεχίζεται η περαιτέρω αύξηση της συγκέντρωσης του γαλακτικού οξέος. Τα πειράματα εξετάστηκαν για 216h (9 μέρες) και τα αποτελέσματα φαίνονται στους παρακάτω πίνακες (Πίνακας 47-Πίνακας 49).

Πίνακας 47: Παραγωγή γαλακτικού οξέος με χρήση μεικτής καλλιέργειας για ζύμωση διάρκειας 9 ημερών χωρίς προσθήκη ενζύμων (Δοκιμή 2).

Μεικτή καλλιέργεια Χωρίς ένζυμα						
Χρόνος (h)	Λακτόζη (g/L)	Γλυκόζη (g/L)	Γαλακτόζη (g/L)	Γαλακτικό οξύ (g/L)	Οξικό οξύ (g/L)	Αιθανόλη (g/L)
24	34.44 ± 1.25	7.48 ± 0.89	0.33 ± 0.01	2.50 ± 0.87	0.00 ± 0.00	0.00 ± 0.00
48	42.76 ± 1.64	6.79 ± 1.11	0.67 ± 0.01	9.00 ± 0.50	0.64 ± 0.01	2.23 ± 0.01
72	47.48 ± 1.81	5.11 ± 0.74	1.35 ± 0.01	12.96 ± 0.29	0.69 ± 0.04	2.64 ± 0.03
96	46.82 ± 1.53	0.00 ± 0.00	0.00 ± 0.00	16.84 ± 0.34	0.61 ± 0.04	0.00 ± 0.00
168	32.64 ± 1.12	0.00 ± 0.00	0.00 ± 0.00	21.57 ± 0.76	0.60 ± 0.03	1.54 ± 0.08
192	10.61 ± 0.99	0.97 ± 0.01	0.00 ± 0.00	8.82 ± 0.71	0.22 ± 0.01	0.15 ± 0.01
216	10.61 ± 0.67	0.00 ± 0.00	0.00 ± 0.00	6.51 ± 0.49	0.22 ± 0.01	0.00 ± 0.00

Πίνακας 48: Παραγωγή γαλακτικού οξέος με χρήση μεικτής καλλιέργειας για ζύμωση διάρκειας 9 ημερών με προσθήκη λακτάσης (Δοκιμή 2).

Μεικτή καλλιέργεια Με λακτάση						
Χρόνος (h)	Λακτόζη (g/L)	Γλυκόζη (g/L)	Γαλακτόζη (g/L)	Γαλακτικό οξύ (g/L)	Οξικό οξύ (g/L)	Αιθανόλη (g/L)
24	19.95 ± 1.20	22.43 ± 10.22	17.96 ± 4.32	3.42 ± 0.30	0.46 ± 0.16	0.24 ± 0.34
48	20.86 ± 1.58	9.31 ± 0.52	13.95 ± 1.50	8.55 ± 0.31	0.50 ± 0.13	0.16 ± 0.23
72	21.45 ± 0.23	8.61 ± 0.60	14.19 ± 2.47	11.78 ± 1.65	0.54 ± 0.07	0.64 ± 0.11
96	23.60 ± 1.71	4.76 ± 0.78	13.18 ± 0.84	19.00 ± 3.50	0.61 ± 0.13	1.07 ± 0.34
168	22.68 ± 0.89	0.00 ± 0.00	6.78 ± 1.03	25.50 ± 2.10	0.66 ± 0.08	3.12 ± 0.16
192	24.38 ± 0.72	1.95 ± 2.31	6.34 ± 3.15	32.33 ± 1.20	0.83 ± 0.04	2.58 ± 0.88
216	22.87 ± 3.95	0.00 ± 0.00	5.35 ± 3.93	34.85 ± 0.04	0.78 ± 0.04	2.25 ± 0.47

Πίνακας 49: Παραγωγή γαλακτικού οξέος με χρήση μεικτής καλλιέργειας για ζύμωση διάρκειας 9 ημερών με προσθήκη αμυλάσης και λακτάσης (Δοκιμή 2).

Μεικτή καλλιέργεια Με αμυλάση και λακτάση						
Χρόνος (h)	Λακτόζη (g/L)	Γλυκόζη (g/L)	Γαλακτόζη (g/L)	Γαλακτικό οξύ (g/L)	Οξικό οξύ (g/L)	Αιθανόλη (g/L)
24	3.47 ± 0.21	50.41 ± 5.51	21.35 ± 2.35	4.54 ± 1.32	0.39 ± 0.08	0.48 ± 0.05
48	4.33 ± 0.28	51.63 ± 2.20	23.01 ± 0.05	11.61 ± 0.06	0.58 ± 0.16	1.47 ± 0.84
72	3.49 ± 0.09	32.04 ± 4.05	18.66 ± 1.61	14.35 ± 1.04	0.59 ± 0.20	7.50 ± 5.15
96	2.73 ± 0.52	13.80 ± 1.14	13.37 ± 2.55	21.12 ± 0.21	0.67 ± 0.21	13.41 ± 4.29
168	2.64 ± 0.11	1.02 ± 1.32	8.81 ± 0.57	30.60 ± 0.17	0.87 ± 0.11	18.31 ± 0.80
192	3.16 ± 0.02	2.15 ± 2.73	8.62 ± 0.18	39.33 ± 2.35	1.16 ± 0.13	19.70 ± 1.74
216	2.83 ± 0.23	1.22 ± 1.58	5.39 ± 0.16	42.35 ± 0.12	1.36 ± 0.40	17.86 ± 0.11

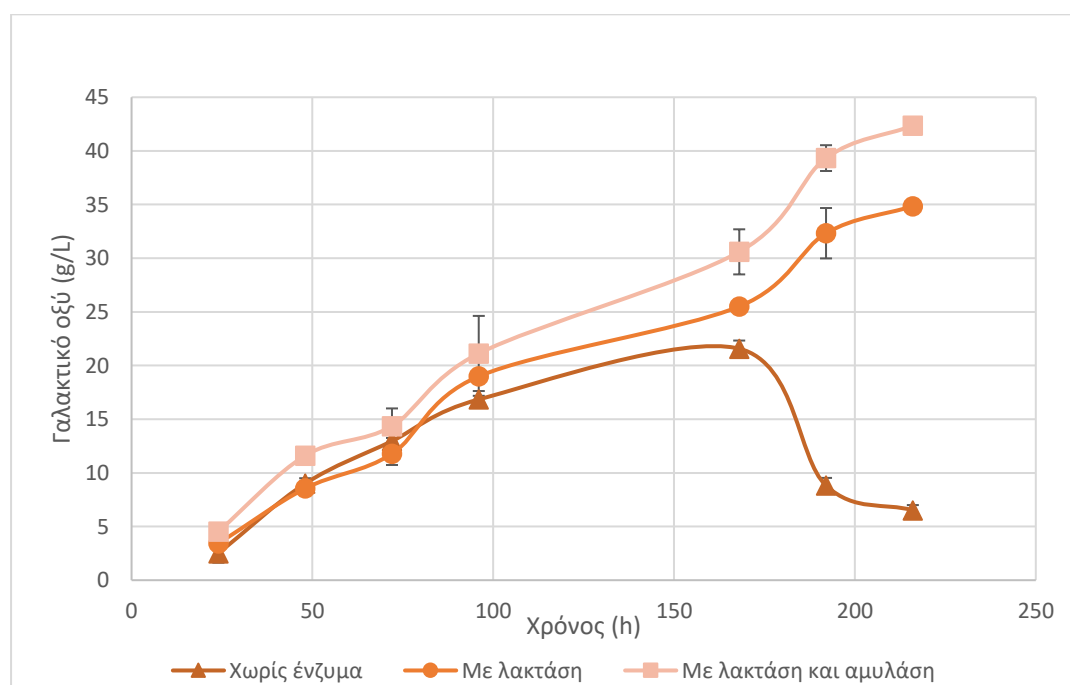
Από τα παραπάνω αποτελέσματα προέκυψε ότι και σε αυτήν τη δοκιμή, εκτός από γαλακτικό οξύ παράγεται αιθανόλη σε μικρότερη συγκέντρωση και πολύ μικρές ποσότητες οξικού οξέος, καθώς επίσης παρατηρήθηκε σε ορισμένα πειράματα και η παραγωγή προπιονικού οξέος σε χαμηλές συγκεντρώσεις. Στα πειράματα που έχει προστεθεί και η λακτάση παρατηρούνται μικρότερες συγκεντρώσεις λακτόζης, πράγμα το οποίο φανερώνει τη διάσπασή της από τη λακτάση. Στα πειράματα που έχουν προστεθεί και τα δύο ένζυμα, η συγκέντρωση της αιθανόλης φτάνει τα 19.70g/L, όταν την ίδια στιγμή το γαλακτικό οξύ έχει σχεδόν διπλάσια συγκέντρωση, ίση με 39.33g/L. Με το τέλος του πειράματος, οι συγκεντρώσεις λακτόζης, γλυκόζης και γαλακτόζης μειώνονται καθώς αυτά καταναλώνονται για την παραγωγή αιθανόλης, γαλακτικού οξέος και οξικού οξέος.

Πίνακας 50: Παραγωγικότητα γαλακτικού οξέος με χρήση μεικτής καλλιέργειας για ζύμωση διάρκειας 9 ημερών (Δοκιμή 2).

ΔΟΚΙΜΗ 2	Παραγωγικότητα (g/L /h)			
	Χρόνος (h)	Χωρίς ενζυμα	Με αμυλάση και λακτάση	Με λακτάση
	24	0.22	0.19	0.14
	48	0.16	0.29	0.21
	72	0.17	0.11	0.13
	96	0.16	0.28	0.30
	168	0.20	0.39	0.27
	192	-0.53	0.36	0.28
	216	-0.10	0.13	0.10

Τα αποτελέσματα έδειξαν ότι η συγκέντρωση του γαλακτικού οξέος αυξάνεται με το πέρασμα του χρόνου για όλα τα δείγματα μέχρι τις 168h (7 μέρες). Μετά τις 168h (7 μέρες) στο πείραμα απουσία ενζύμων μειώθηκε η συγκέντρωση γαλακτικού οξέος, ενώ τα άλλα συνέχισαν την ανοδική πορεία. Βέλτιστα αποτελέσματα είχαν τα πειράματα με την προσθήκη και των 2 ενζύμων και σε δεύτερη φάση τα πειράματα μόνο με λακτάση. Η μεγαλύτερη συγκέντρωση γαλακτικού οξέος ήταν η 42.35g/L στις 216h (9 μέρες) για το πείραμα με την προσθήκη και των 2 ενζύμων.

Στο Σχήμα 40, παρουσιάζεται η πορεία της συγκέντρωσης γαλακτικού οξέος σε συνάρτηση με τον χρόνο, από όπου γίνεται φανερό ότι το πείραμα με συνδυασμό αμυλάσης και λακτάσης παρουσιάζει την καλύτερη πορεία και μέσω αυτού επιτυγχάνεται η μεγαλύτερη συγκέντρωση γαλακτικού οξέος. Τα πειράματα μόνο με λακτάση εμφάνισαν αρκετά καλά αποτελέσματα με μέγιστη συγκέντρωση αυτή των 34.85g/L στις 216h (9 μέρες). Όσον αφορά το πείραμα χωρίς προσθήκη ενζύμων εμφανίζει μέγιστη συγκέντρωση 21.57g/L στις 168h (7 μέρες).



Σχήμα 40: Συγκέντρωση γαλακτικού οξέος συναρτήσεως του χρόνου με χρήση μεικτής καλλιέργειας προς παραγωγή γαλακτικού οξέος για 9 μέρες (Δοκιμή 2).

Και για τα 3 πειράματα (χωρίς ένζυμα, μόνο με αμυλάση, με αμυλάση και λακτάση) η παραγωγικότητα έχει σχεδόν σταθερές, υψηλές τιμές, οι οποίες για τα πειράματα, στα οποία

έχουν προστεθεί ένζυμα συνεχίζονται μέχρι τις 192h (8 μέρες) και στις 216h (9μέρες) παρουσιάζουν χαμηλότερη τιμή. Αντίθετα, για το πείραμα απουσία ενζύμων η παραγωγικότητα και η συγκέντρωση γαλακτικού οξέος μετά τις 168h (7 μέρες) παρουσιάζουν καθοδικές τιμές.

Παρακάτω (Πίνακας 51) παρουσιάζεται συνοπτικός πίνακας των αποτελεσμάτων της Δοκιμής 2 και υπολογίζεται η απόδοση με βάση το θεωρητικό παραγόμενο γαλακτικό οξύ, που προκύπτει από το αρχικό γαλακτικό οξύ που έχει το στερεό (2%) και από την μετατροπή όλης της γλυκόζης και της γαλακτόζης σε γαλακτικό οξύ.

Πίνακας 51: Απόδοσης γαλακτικού οξέος και παραγωγικότητα με χρήση μεικτής καλλιέργειας προς παραγωγή γαλακτικού οξέος για 9 μέρες (Δοκιμή 2).

Ένζυμο	Αρχικό Γαλακτικό Οξύ (g/L)	Μέγιστο Γαλακτικό Οξύ (g/L)	Χρόνος (h)	Απόδοση με βάση το θεωρητικό γαλακτικό οξύ (%)	Παραγωγικότητα (g/L/h)
Με αμυλάση	0.38	21.57	168	38.04	0.13
Με λακτάση	0.38	32.33	192	52.31	0.17
Με αμυλάση και λακτάση	0.38	39.33	192	63.40	0.20

### 10.3.3 ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ ΕΠΑΝΑΛΑΜΒΑΝΟΜΕΝΩΝ ΖΥΜΩΣΕΩΝ

Στην επόμενη δοκιμή έγινε προσπάθεια εφαρμογής επαναλαμβανόμενης ζύμωσης με χρήση ομοιογενούς δείγματος από το πείραμα με τη μεικτή καλλιέργεια της Δοκιμής 2 που είχε μεγαλύτερη συγκέντρωση οξέος ίση με 42.35 g/L. Έλαβαν χώρα πειράματα χωρίς προσθήκη ενζύμων και με προσθήκη και των 2, αμυλάση και λακτάση και τα αποτελέσματα παρουσιάζονται στους επόμενους πίνακες (Πίνακας 52- Πίνακας 53).

Πίνακας 52: 1<sup>η</sup> επαναλαμβανόμενη ζύμωση για παραγωγή γαλακτικού οξέος με προσθήκη ομοιογενούς μείγματος της δοκιμής 2 χωρίς προσθήκη ενζύμων (Δοκιμή 3).

ΕΠΑΝΑΛΑΜΒΑΝΟΜΕΝΗ ΖΥΜΩΣΗ 1						
Χωρίς ένζυμα						
Χρόνος (h)	Λακτόζη (g/L)	Γλυκόζη (g/L)	Γαλακτόζη (g/L)	Γαλακτικό οξύ (g/L)	Οξικό οξύ (g/L)	Αιθανόλη (g/L)
24	24.37 ± 1.24	22.66 ± 2.31	5.40 ± 0.82	8.11 ± 0.75	0.14 ± 0.01	8.43 ± 0.24
48	18.78 ± 2.08	0.98 ± 2.11	1.26 ± 0.32	13.66 ± 0.79	0.17 ± 0.01	14.66 ± 0.19
72	14.74 ± 1.12	0.00 ± 0.00	0.52 ± 0.37	20.78 ± 1.51	0.38 ± 0.01	14.41 ± 0.85
96	14.53 ± 2.12	0.00 ± 0.00	0.65 ± 0.18	28.59 ± 0.30	0.52 ± 0.08	17.98 ± 0.63
168	12.42 ± 1.87	3.84 ± 0.13	1.27 ± 0.35	37.00 ± 0.62	0.54 ± 0.03	17.01 ± 0.07

Πίνακας 53: 1<sup>η</sup> επαναλαμβανόμενη ζύμωση για παραγωγή γαλακτικού οξέος με προσθήκη ομοιογενούς μείγματος της δοκιμής 2, αμυλάσης και λακτάσης (Δοκιμή 3).

ΕΠΑΝΑΛΑΜΒΑΝΟΜΕΝΗ ΖΥΜΩΣΗ 1						
Με αμυλάση και λακτάση						
Χρόνος (h)	Λακτόζη (g/L)	Γλυκόζη (g/L)	Γαλακτόζη (g/L)	Γαλακτικό οξύ (g/L)	Οξικό οξύ (g/L)	Αιθανόλη (g/L)
24	27.73 ± 0.59	26.41 ± 1.07	9.07 ± 0.54	9.43 ± 0.28	0.15 ± 0.02	7.92 ± 0.34
48	22.99 ± 3.71	0.00 ± 0.00	0.85 ± 0.16	17.71 ± 2.71	0.25 ± 0.04	17.29 ± 2.02
72	11.96 ± 0.31	0.15 ± 0.12	0.44 ± 0.25	21.95 ± 2.26	0.54 ± 0.06	14.50 ± 1.38
96	11.04 ± 1.20	0.24 ± 0.06	0.08 ± 0.11	29.61 ± 0.19	0.69 ± 0.01	17.75 ± 0.47
168	8.35 ± 0.14	0.38 ± 0.00	0.12 ± 0.17	39.94 ± 2.97	0.96 ± 0.01	18.64 ± 2.33

Από τα παραπάνω αποτελέσματα (Πίνακας 52-Πίνακας 53) παρατηρείται ότι πέρα από τη μείωση των συγκεντρώσεων λακτόζης, γλυκόζης, γαλακτόζης και την παραγωγή γαλακτικού οξέος, υπάρχει και παραγωγή αιθανόλης με μέγιστη συγκέντρωση 18.64 g/L, όταν την ίδια στιγμή η συγκέντρωση του γαλακτικού οξέος είναι πολύ μεγαλύτερη ίση με 39.94g/L. Ακόμη κατά την διάρκεια μελέτης των πειραμάτων παρήχθησαν και μικρές συγκεντρώσεις οξικού οξέος.

Με βάση την παραγωγή του γαλακτικού οξέος υπολογίζεται η παραγωγικότητα των πειραμάτων όπως φαίνεται στον επόμενο πίνακα (Πίνακας 54).

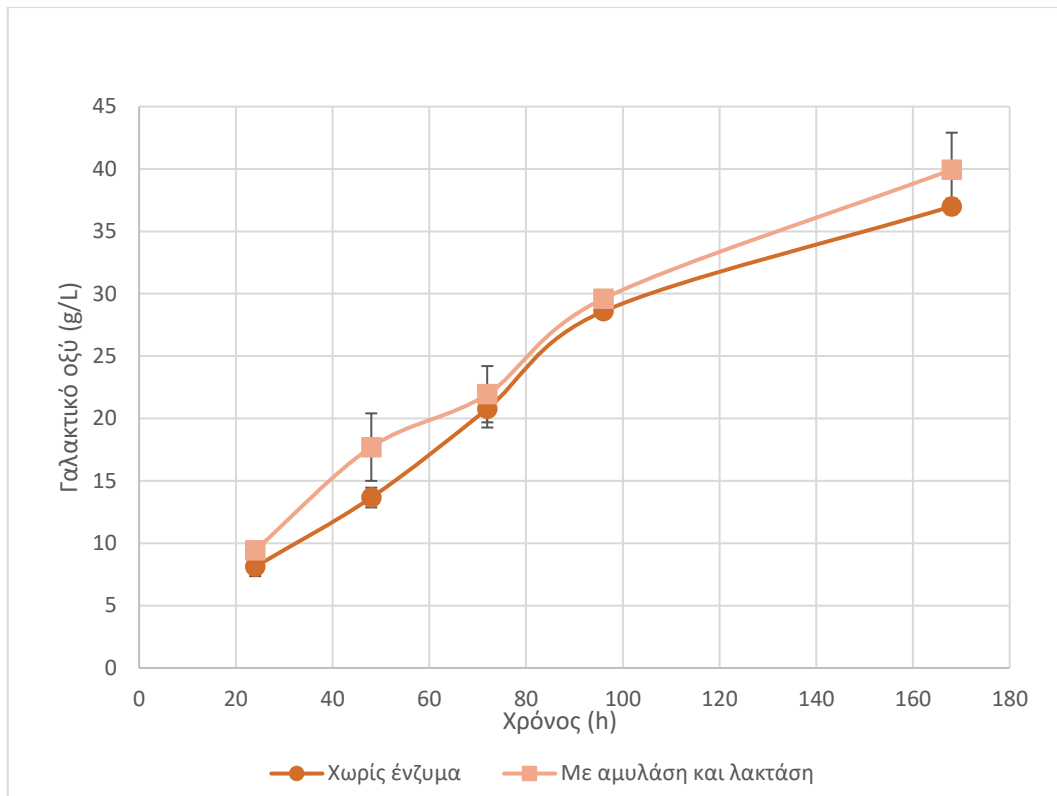
Πίνακας 54: Παραγωγικότητα γαλακτικού οξέος με προσθήκη ομοιογενούς μείγματος της δοκιμής 2 (1<sup>η</sup> Δοκιμή Επαναλαμβανόμενης Ζύμωσης).

ΕΠΑΝΑΛΑΜΒΑΝΟΜΕΝΗ ΖΥΜΩΣΗ 1				
ΔΟΚΙΜΗ 3	Γαλακτικό Οξύ (g/L)		Παραγωγικότητα (g/L /h)	
Χρόνος (h)	Χωρίς ένζυμα	Με αμυλάση και λακτάση	Χωρίς ένζυμα	Με αμυλάση και λακτάση
24	8.11 ± 0.75	9.43 ± 0.28	0.24 ± 0.02	0.30 ± 0.05
48	13.66 ± 0.79	17.71 ± 2.71	0.23 ± 0.03	0.34 ± 0.04
120	20.78 ± 1.51	21.95 ± 2.26	0.30 ± 0.02	0.18 ± 0.03
144	28.59 ± 0.30	29.61 ± 0.19	0.33 ± 0.05	0.32 ± 0.03
168	37.00 ± 0.62	39.94 ± 2.97	0.35 ± 0.04	0.43 ± 0.05

Από τα παραπάνω πειράματα, μεγαλύτερες συγκεντρώσεις εμφάνισαν αυτά με την προσθήκη και των δύο ενζύμων, με μέγιστη την 39.94g/L στις 168h (7d), ενώ και το πείραμα, στο οποίο δεν προστέθηκαν εκ νέου ένζυμα, παρουσίασε πολύ καλά αποτελέσματα με βέλτιστη συγκέντρωση την 37.00g/L στις 168h (7d).

Από τη δοκιμή επαναλαμβανόμενης ζύμωσης συμπεραίνεται ότι με αυτόν τον τρόπο επιτυγχάνεται σε γρηγορότερο χρονικό διάστημα, 168h (7d), παρόμοια συγκέντρωση γαλακτικού οξέος με τη μέγιστη συγκέντρωση της Δοκιμής 2, στις 216h (9d), αφού η παραγωγικότητα με την επαναλαμβανόμενη ζύμωση εμφανίζει υψηλότερες τιμές συγκριτικά με την απλή.

Η πορεία της συγκέντρωσης του γαλακτικού οξέος σε συνάρτηση με τον χρόνο παρουσιάζεται στο Σχήμα 41.



Σχήμα 41: Συγκέντρωση γαλακτικού οξέος συναρτήσει του χρόνου με προσθήκη ομοιογενούς μείγματος της δοκιμής 2 (1<sup>η</sup> Δοκιμή Επαναλαμβανόμενης Ζύμωσης).

Από το Σχήμα 41 γίνεται φανερό ότι η εκ νέου προσθήκη ενζύμων στην επαναλαμβανόμενη ζύμωση έχει μικρή επίδραση στην συγκέντρωση γαλακτικού οξέος, αφού στις 168h (7d) η συγκέντρωση του γαλακτικού οξέος με την παρουσία ενζύμων είναι 39.94g/L και χωρίς αυτά 37.00g/L.

Παρακάτω (Πίνακας 55) παρουσιάζεται συνοπτικός πίνακας των αποτελεσμάτων της Δοκιμής 3 και υπολογίζεται η απόδοση με βάση το θεωρητικό γαλακτικό οξύ, που προκύπτει από το αρχικό γαλακτικό οξύ που έχει το στερεό (2%) και από την μετατροπή όλης της γλυκόζης και της γαλακτόζης σε γαλακτικό οξύ.

Πίνακας 55: Απόδοση γαλακτικού οξέος και παραγωγικότητα με προσθήκη ομοιογενούς μείγματος της δοκιμής 2 (1<sup>η</sup> Δοκιμή Επαναλαμβανόμενης Ζύμωσης).

ΔΟΚΙΜΗ 3	Αρχικό Γαλακτικό Οξύ (g/L)	Μέγιστο Γαλακτικό Οξύ (g/L)	Χρόνος (h)	Απόδοση με βάση το θεωρητικό γαλακτικό οξύ (%)	Παραγωγικότητα (g/L/h)
Χωρίς ένζυμα	2.71	37.00	168	65.33	0.20
Με αμυλάση και λακτάση	2.71	39.94	168	71.00	0.22

Στη Δοκιμή 4 χρησιμοποιήθηκε δείγμα από το βέλτιστο πείραμα της επαναλαμβανόμενης ζύμωσης 1 (39.94g/L γαλακτικού οξέος) (Δοκιμή 3) για εκ νέου ζύμωση. Πραγματοποιήθηκαν

πειράματα, με χρήση δείγματος μόνο από την στερεή φάση του βέλτιστου πειράματος και με χρήση απλά ομοιογενούς δείγματος του πειράματος (υγρού), ώστε να διερευνηθεί εάν ένας από τους δυο τρόπους παρουσιάζει καλύτερα αποτελέσματα. Σε όλα τα πειράματα προστέθηκαν και τα δύο ένζυμα αμυλάση και λακτάση. Τα αποτελέσματα αναγράφονται στον ακόλουθο πίνακα (Πίνακας 56, Πίνακας 57).

Πίνακας 56: 2<sup>η</sup> επαναλαμβανόμενη ζύμωση για παραγωγή γαλακτικού οξέος με προσθήκη στερεού δείγματος της δοκιμής 3, αμυλάσης και λακτάσης (Δοκιμή 4).

ΕΠΑΝΑΛΑΜΒΑΝΟΜΕΝΗ ΖΥΜΩΣΗ 2						
Με προσθήκη στερεού						
Χρόνος (h)	Λακτόζη (g/L)	Γλυκόζη (g/L)	Γαλακτόζη (g/L)	Γαλακτικό οξύ (g/L)	Οξικό οξύ (g/L)	Αιθανόλη (g/L)
24	2.71 ± 0.58	45.44 ± 5.64	0.00 ± 0.00	13.56 ± 4.00	0.00 ± 0.00	0.00 ± 0.00
48	2.92 ± 0.03	26.13 ± 1.37	16.38 ± 0.59	20.17 ± 5.95	9.15 ± 0.58	0.00 ± 0.00
72	1.91 ± 0.74	3.05 ± 1.42	9.74 ± 3.50	26.51 ± 8.97	0.42 ± 0.08	11.18 ± 3.29
144	2.04 ± 0.49	0.00 ± 0.00	5.38 ± 1.79	39.44 ± 9.50	0.76 ± 0.23	17.21 ± 4.86
192	0.47 ± 0.29	0.01 ± 0.01	2.23 ± 0.76	41.04 ± 4.82	0.84 ± 0.21	14.02 ± 0.64

Πίνακας 57: 2<sup>η</sup> επαναλαμβανόμενη ζύμωση για παραγωγή γαλακτικού οξέος με προσθήκη στερεού δείγματος της δοκιμής 3, αμυλάσης και λακτάσης (Δοκιμή 4).

ΕΠΑΝΑΛΑΜΒΑΝΟΜΕΝΗ ΖΥΜΩΣΗ 2						
Με προσθήκη ομοιογενούς δείγματος						
Χρόνος (h)	Λακτόζη (g/L)	Γλυκόζη (g/L)	Γαλακτόζη (g/L)	Γαλακτικό οξύ (g/L)	Οξικό οξύ (g/L)	Αιθανόλη (g/L)
24	6.19 ± 8.75	52.20 ± 0.15	9.13 ± 12.91	13.70 ± 1.01	0.00 ± 0.00	0.00 ± 0.00
48	0.00 ± 0.00	26.31 ± 2.05	13.42 ± 0.08	23.54 ± 0.88	13.07 ± 1.68	0.00 ± 0.00
72	10.94 ± 3.20	3.48 ± 1.48	9.50 ± 0.66	39.83 ± 5.37	0.66 ± 0.08	16.82 ± 0.02
144	6.37 ± 0.05	0.05 ± 0.06	3.15 ± 0.78	38.21 ± 1.56	0.76 ± 0.13	15.09 ± 1.31
192	4.17 ± 0.20	0.00 ± 0.00	2.00 ± 0.30	43.19 ± 3.46	1.33 ± 0.10	7.29 ± 10.31

Από τα αποτελέσματα των παραπάνω πινάκων (Πίνακας 56-Πίνακας 57), συμπεραίνεται ότι με το πέρασμα των ωρών παρατηρείται μείωση των συγκεντρώσεων γλυκόζης, λακτόζης, γαλακτόζης και αυξάνεται η συγκέντρωση του γαλακτικού οξέος. Πέρα από το γαλακτικό οξύ, παράγεται και αιθανόλη σε μικρότερες ποσότητες αλλά και οξικό οξύ, σε ακόμα μικρότερες συγκεντρώσεις.

Με γνώμονα την παραγόμενη συγκέντρωση γαλακτικού οξέος με το πέρασμα του χρόνου, υπολογίζεται η παραγωγικότητα του γαλακτικού οξέος για τα πειράματα αυτά (Πίνακας 58).

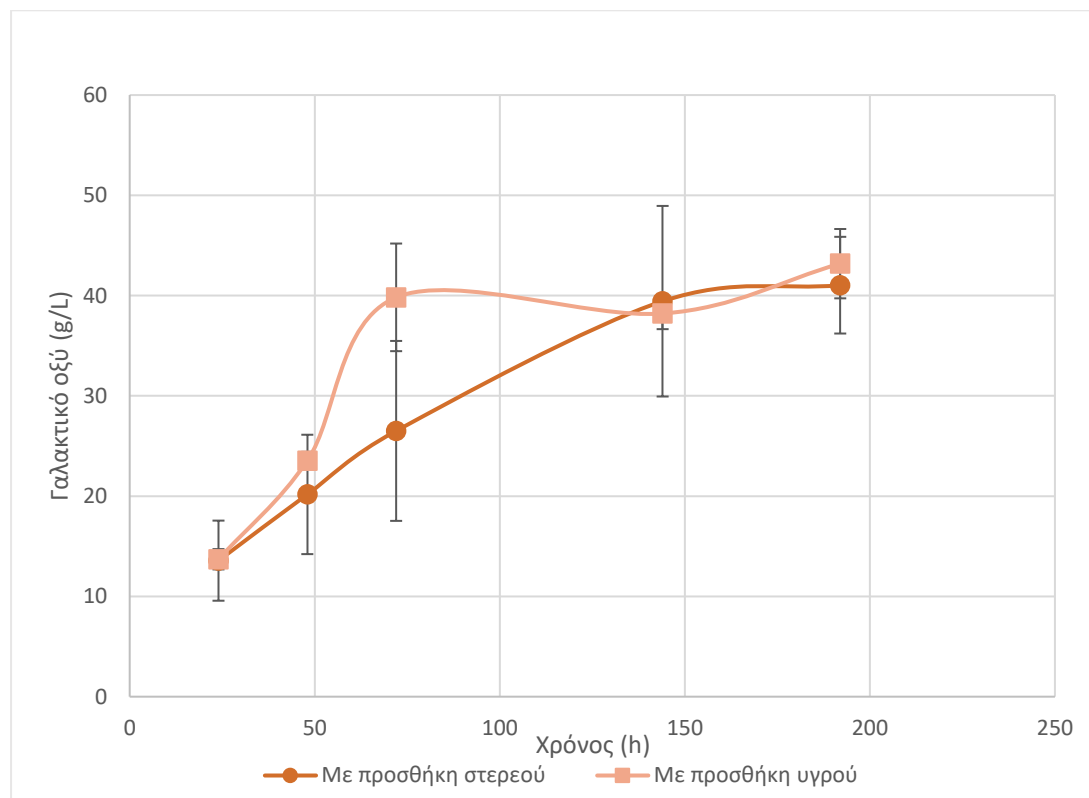
Πίνακας 58: Παραγωγικότητα γαλακτικού οξέος με προσθήκη στερεού και υγρού δείγματος της δοκιμής 3, αμυλάσης και λακτάσης (2<sup>η</sup> Δοκιμή Επαναλαμβανόμενης Ζύμωσης).

ΕΠΑΝΑΛΑΜΒΑΝΟΜΕΝΗ ΖΥΜΩΣΗ 2				
ΔΟΚΙΜΗ 4	Γαλακτικό Οξύ (g/L)		Παραγωγικότητα (g/L/ h)	
Χρόνος (h)	Με στερεό	Με υγρό	Με στερεό	Με υγρό
24	13.56 ± 4.00	13.70 ± 1.01	0.57 ± 0.20	0.85 ± 0.07
48	20.17 ± 5.95	23.54 ± 0.88	0.28 ± 0.15	0.41 ± 0.05
72	26.51 ± 8.97	39.83 ± 5.37	0.26 ± 0.20	0.68 ± 0.02
144	39.44 ± 9.50	38.21 ± 1.56	0.18 ± 0.04	-0.02 ± 0.08
192	41.04 ± 4.82	43.19 ± 3.46	0.03 ± 0.01	0.10 ± 0.01

Τα πειράματα, στα οποία προστέθηκε δείγμα μόνο στερεού παρουσίασαν παρόμοιες τιμές συγκέντρωσης γαλακτικού οξέος με τα πειράματα, στα οποία προστέθηκε υγρό (ομοιογενές δείγμα) του πειράματος της Δοκιμής 3 με το βέλτιστο αποτέλεσμα της Δοκιμής

3 (39.94g/L γαλακτικού οξέος). Η μέγιστη συγκέντρωση, 43.19 g/L, παρατηρήθηκε στις 192h (8d), για τα πειράματα, στα οποία προστέθηκε ομοιογενές δείγμα, με μειωμένη τιμή παραγωγικότητας (0.03 g/L/h), ενώ συνδυαστικά με την παραγωγικότητα η βέλτιστη συγκέντρωση παρατηρείται στις 72h, ίση με 39.83g/L και παραγωγικότητα 0.68 g/L/h. Τα πειράματα με χρήση μόνο στερεού έφτασαν στις 144h (6d) σε συγκέντρωση γαλακτικού οξέος ίση με 39.44g/L και στις 192h (8d) στην μέγιστη συγκέντρωση γαλακτικού με μειωμένη παραγωγικότητα, 41.04g/L, τιμές παραπλήσιες της 39.83g/L που επιτυγχάνεται με χρήση υγρού δείγματος στις 72h (3d).

Παρακάτω παρουσιάζεται το διάγραμμα της συγκέντρωσης του γαλακτικού οξέος σε συνάρτηση με τον χρόνο (Σχήμα 42).



Σχήμα 42: Συγκέντρωση γαλακτικού οξέος συναρτήσει του χρόνου με προσθήκη στερεού και υγρού δείγματος της δοκιμής 3, αμυλάσης και λακτάσης (2<sup>η</sup> Δοκιμή Επαναλαμβανόμενης Ζύμωσης).

Από το παραπάνω διάγραμμα γίνεται φανερό ότι πέρα από τις τιμές των συγκεντρώσεων γαλακτικού οξέος για τις 72h, οι συγκεντρώσεις μεταξύ των πειραμάτων με στερεό και με υγρό εμφανίζουν παραπλήσιες τιμές. Μεγαλύτερη συγκέντρωση παρουσιάζεται στις 192h και για τα πειράματα με στερεό είναι 41.04 g/L και για τα πειράματα με υγρό 43.19 g/L.

Παρακάτω (Πίνακας 59), παρουσιάζεται συνοπτικός πίνακας των αποτελεσμάτων της Δοκιμής 4 και υπολογίζεται η απόδοση με βάση το θεωρητικό γαλακτικό οξύ, που προκύπτει από το αρχικό γαλακτικό οξύ που έχει το στερεό (2%) και από τη μετατροπή όλης της γλυκόζης και της γαλακτόζης σε γαλακτικό οξύ.



Πίνακας 59: Απόδοση γαλακτικού οξέος και παραγωγικότητα με προσθήκη στερεού και υγρού δείγματος της δοκιμής 4, αμυλάσης και λακτάσης (2<sup>η</sup> Δοκιμή Επαναλαμβανόμενης Ζύμωσης).

ΔΟΚΙΜΗ 4	Αρχικό Γαλακτικό Οξύ (g/L)	Μέγιστο Γαλακτικό Οξύ (g/L)	Χρόνος (h)	Απόδοση με βάση το θεωρητικό γαλακτικό οξύ (%)	Παραγωγικότητα (g/L/h)
Με στερεό, λακτάση και αμυλάση	2.60	39.44	144	77.76	0.26
Με υγρό, λακτάση και αμυλάση	2.60	39.83	72	84.47	0.52

Στη Δοκιμή 5 χρησιμοποιήθηκε δείγμα από το βέλτιστο πείραμα της επαναλαμβανόμενης ζύμωσης 1 (39.94g/L γαλακτικού οξέος) (Δοκιμή 3) για εκ νέου ζύμωση. Πραγματοποιήθηκαν πειράματα, με χρήση δείγματος μόνο από την στερεή φάση του βέλτιστου πειράματος και με χρήση απλά ομοιογενούς δείγματος του πειράματος (υγρού). Σε όλα τα πειράματα προστέθηκαν μόνο αμυλάση. Τα αποτελέσματα παρουσιάζονται στους παρακάτω πίνακες (Πίνακας 60- Πίνακας 61).

Πίνακας 60: 3<sup>η</sup> επαναλαμβανόμενη ζύμωση για παραγωγή γαλακτικού οξέος με προσθήκη στερεού δείγματος της δοκιμής 3 και αμυλάσης (Δοκιμή 5).

ΕΠΑΝΑΛΑΜΒΑΝΟΜΕΝΗ ΖΥΜΩΣΗ 3						
Με προσθήκη στερεού						
Χρόνος (h)	Λακτόζη (g/L)	Γλυκόζη (g/L)	Γαλακτόζη (g/L)	Γαλακτικό οξύ (g/L)	Ακετικό οξύ (g/L)	Αιθανόλη (g/L)
24	33.20 ± 2.44	41.30 ± 5.32	10.02 ± 0.68	15.24 ± 1.06	0.00 ± 0.00	3.68 ± 1.68
96	15.32 ± 5.07	0.00 ± 0.00	0.83 ± 0.35	17.37 ± 4.37	0.25 ± 0.03	8.51 ± 1.53
144	18.68 ± 3.63	0.00 ± 0.00	0.16 ± 0.23	29.45 ± 2.76	0.73 ± 0.09	6.33 ± 8.94

Πίνακας 61: 3<sup>η</sup> επαναλαμβανόμενη ζύμωση για παραγωγή γαλακτικού οξέος με προσθήκη υγρού δείγματος της δοκιμής 3 και αμυλάσης (Δοκιμή 5).

ΕΠΑΝΑΛΑΜΒΑΝΟΜΕΝΗ ΖΥΜΩΣΗ 3						
Με προσθήκη υγρού						
Χρόνος (h)	Λακτόζη (g/L)	Γλυκόζη (g/L)	Γαλακτόζη (g/L)	Γαλακτικό οξύ (g/L)	Ακετικό οξύ (g/L)	Αιθανόλη (g/L)
24	37.58 ± 0.52	43.13 ± 0.62	10.02 ± 0.68	16.31 ± 2.01	0.00 ± 0.00	6.28 ± 0.37
96	23.97 ± 0.23	0.00 ± 0.00	1.00 ± 0.08	26.08 ± 1.48	0.42 ± 0.05	15.21 ± 0.73
144	16.55 ± 6.12	0.00 ± 0.00	0.00 ± 0.00	26.20 ± 8.82	0.56 ± 0.14	11.13 ± 3.58

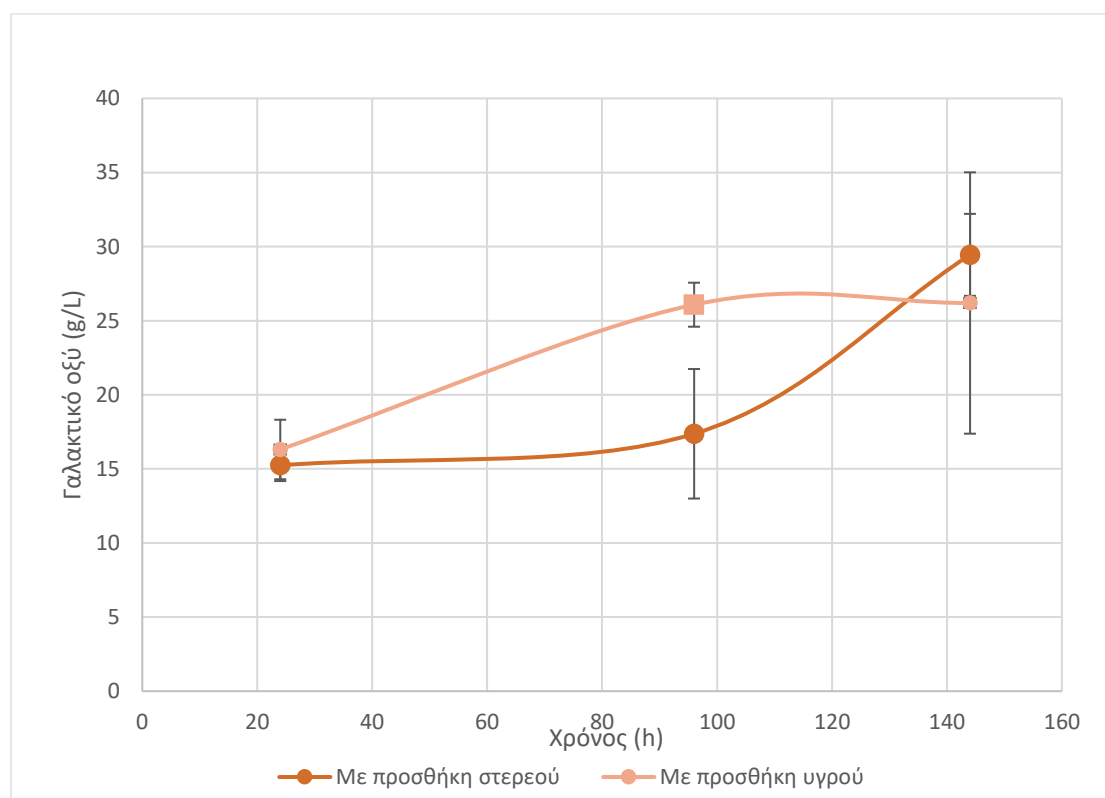
Και σε αυτή τη δοκιμή εκτός από γαλακτικό οξύ παρήχθη και αιθανόλη σε μικρότερες συγκεντρώσεις, όπως και οξικό οξύ, σε ακόμα μικρότερες, με την ταυτόχρονη κατανάλωση της λακτόζης, της γλυκόζης και της γαλακτόζης.

Πίνακας 62: Απόδοσης γαλακτικού οξέος και παραγωγικότητα με προσθήκη στερεού και υγρού δείγματος της δοκιμής 3 και αμυλάσης (3<sup>η</sup> Δοκιμή Επαναλαμβανόμενης Ζύμωσης).

ΕΠΑΝΑΛΑΜΒΑΝΟΜΕΝΗ ΖΥΜΩΣΗ 3				
ΔΟΚΙΜΗ 5	Γαλακτικό Οξύ (g/L)		Παραγωγικότητα (g/L/h)	
Χρόνος (h)	Στερεό	Υγρό	Στερεό	Υγρό
24	15.24 ± 1.06	16.31 ± 2.01	0.64 ± 0.04	0.59 ± 0.03
96	17.37 ± 4.37	26.08 ± 1.48	0.03 ± 0.03	0.14 ± 0.01
144	29.45 ± 2.76	26.20 ± 8.82	0.25 ± 0.03	-0.03 ± 0.01

Τα πειράματα, στα οποία προστέθηκε δείγμα μόνο στερεού του πειράματος της Δοκιμής 3 παρουσίασαν στις 144h, καλύτερη παραγωγικότητα και υψηλότερη τιμή συγκέντρωσης γαλακτικού οξέος, ίση με 29.45g/L, ενώ τα πειράματα στα οποία προστέθηκε υγρό (ομοιογενές δείγμα) του πειράματος της Δοκιμής 3 εμφάνισαν βέλτιστη συγκέντρωση στις 96h (4d) ίση με 26.08g/L τιμή που δεν απέχει της 29.45g/L που επιτυγχάνεται με χρήση μόνο στερεού στις 144h (6d) (υψηλότερη παραγωγικότητα). Έτσι παρατηρείται ότι στα πειράματα που έγινε προσθήκη μόνο στερεού η παραγωγικότητα και άρα και η συγκέντρωση της αιθανόλης καθυστερούν να αυξηθούν και έτσι προτιμώνται τα πειράματα με τη χρήση υγρού (παρόμοια αποτελέσματα σε μικρότερο χρόνο-μεγαλύτερη παραγωγικότητα).

Η πορεία της συγκέντρωσης του γαλακτικού οξέος σε συνάρτηση με τον χρόνο παρουσιάζεται στο Σχήμα 43.



Σχήμα 43: Συγκέντρωσης γαλακτικού οξέος συναρτήσει του χρόνου με προσθήκη στερεού και υγρού δείγματος της δοκιμής 3 και αμυλάσης (3<sup>η</sup> Δοκιμή Επαναλαμβανόμενης Ζύμωσης).

Από το Σχήμα 43 φαίνεται ότι τα πειράματα, στα οποία προστέθηκε υγρό δείγμα του βέλτιστου πειράματος της Δοκιμής 3 παρουσίασαν υψηλότερη συγκέντρωση γαλακτικού οξέος στις 96h (4d) ίση με 26.08 g/L και έπειτα ακολουθεί μείωση της. Τα πειράματα στα οποία προστέθηκε στερεό μόνο, εμφάνισαν στις 96h αρκετά χαμηλότερη συγκέντρωση ίση

με 17.37g/L και στις 144h (6d) την υψηλότερη ίση με 29.45 g/L, τιμή κοντά στη συγκέντρωση που επιτυγχάνεται με την προσθήκη υγρού στις 96h (4d).

Παρακάτω, παρουσιάζεται συνοπτικός πίνακας (Πίνακας 63) των αποτελεσμάτων της Δοκιμής 5 και υπολογίζεται η απόδοση με βάση το θεωρητικό γαλακτικό οξύ, που προκύπτει και από τη μετατροπή όλης της γλυκόζης και της γαλακτόζης σε γαλακτικό οξύ.

Πίνακας 63: Σπόδοσης γαλακτικού οξέος και παραγωγικότητα με προσθήκη στερεού και υγρού δείγματος της δοκιμής 3 και αμυλάσης (3<sup>η</sup> Δοκιμή Επαναλαμβανόμενης Ζύμωσης).

ΔΟΚΙΜΗ 5	Αρχικό Γαλακτικό Οξύ (g/L)	Μέγιστο Γαλακτικό Οξύ (g/L)	Χρόνος (h)	Απόδοση με βάση το θεωρητικό γαλακτικό οξύ (%)	Παραγωγικότητα (g/L/h)
Με στερεό και αμυλάση	2.60	29.45	144	53.87	0.19
Με υγρό και αμυλάση	2.60	16.08	96	57.58	0.24

## 10.4 ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ ΠΑΡΑΓΩΓΗΣ ΓΑΛΑΚΤΙΚΟΥ ΑΙΘΥΛΕΣΤΕΡΑ

### 10.4.1 ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ ΜΕ ΧΗΜΙΚΗ ΑΙΘΑΝΟΛΗ ΚΑΙ ΓΑΛΑΚΤΙΚΟ ΟΞΥ

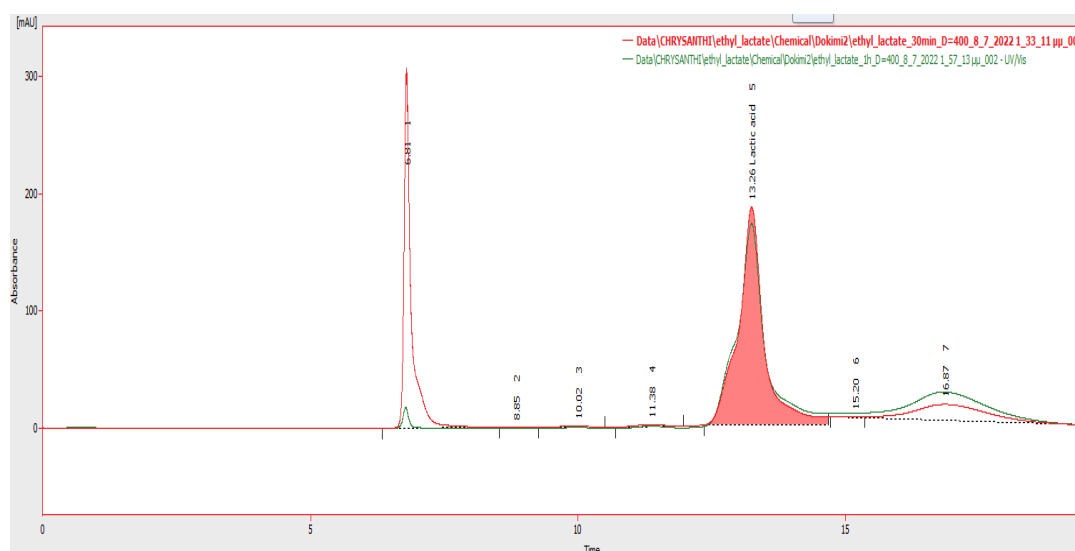
Στην 1<sup>η</sup> Δοκιμή, εξετάστηκε η πραγματοποίηση της αντίδρασης με μοριακή αναλογία αιθανόλης γαλακτικού οξέος 3/1 και τα αποτελέσματα που προέκυψαν ήταν τα παρακάτω (Πίνακας 64).

Πίνακας 64: Συγκέντρωση γαλακτικού οξέος και μετατροπή του κατά την αντίδραση παραγωγής γαλακτικού αιθυλεστέρα, με μοριακή αναλογία αιθανόλης (99.9%)/γαλακτικού οξέος (80%) 3/1 και καταλύτη σε κλάσμα βάρους  $w_{cat}=0.1$  (Δοκιμή 1).

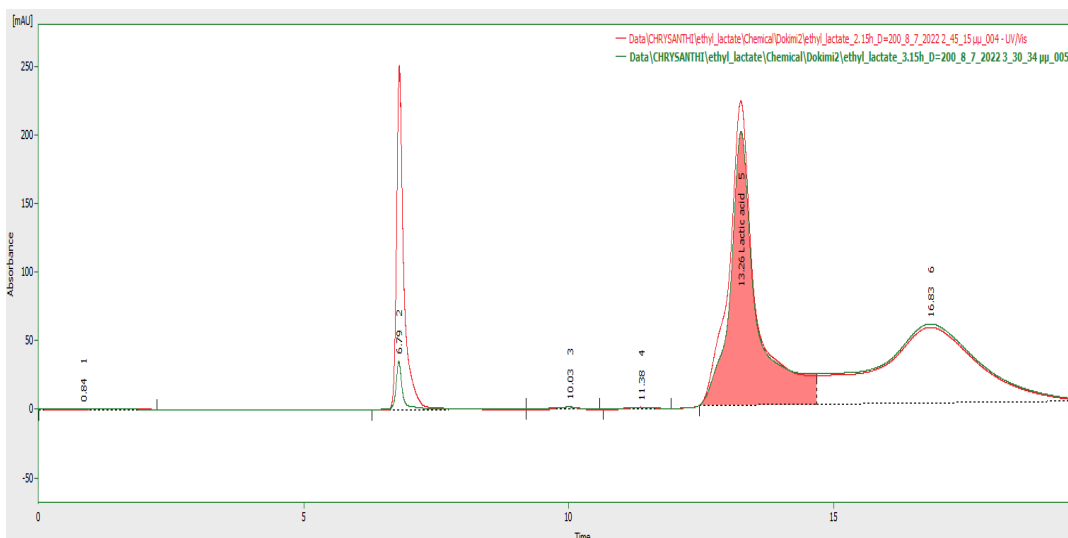
Χρόνος (min)	Γαλακτικό οξύ (g/L)	Μετατροπή γαλακτικού οξέος (%)
0	335.50	0.00
30	325.75	2.90
60	323.33	3.63
135	186.30	44.47
195	198.13	40.94
255	134.71	59.85

Με βάση τον παραπάνω πίνακα (Πίνακας 64) παρατηρείται ότι η μέγιστη μετατροπή γαλακτικού οξέος παρατηρείται στα 255min με μετατροπή ίση με 59.85%.

Παρακάτω, παρουσιάζονται τα χρωματογραφήματα της 1<sup>ης</sup> Δοκιμής στις διάφορες χρονικές στιγμές (Σχήμα 44- Σχήμα 46).

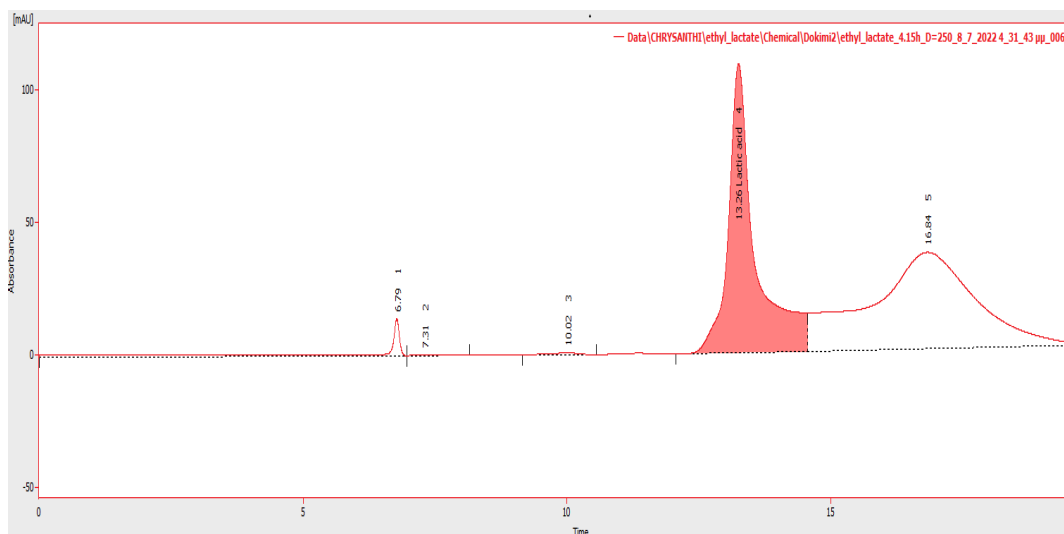


Σχήμα 44: Χρωματογράφημα HPLC για την αντίδραση παραγωγής γαλακτικού αιθυλεστέρα, με μοριακή αναλογία αιθανόλης (99.9%)/γαλακτικού οξέος (80%) 3/1 και καταλύτη με  $w_{cat}=0.1$  (Δοκιμή 1) στα 30 και 60min.



Σχήμα 45: Χρωματογράφημα HPLC για την αντίδραση παραγωγής γαλακτικού αιθυλεστέρα, με μοριακή αναλογία αιθανόλης (99.9%)/γαλακτικού οξέος (80%) 3/1 και καταλύτη με  $w_{cat}=0.1$  (Δοκιμή 1) στα 135 και 195min.

Με βάση τα παραπάνω σχήματα (Σχήμα 44, Σχήμα 45) παρατηρείται ότι με την πάροδο του χρόνου μειώνεται η συγκέντρωση του γαλακτικού οξέος και αυξάνεται η κορυφή που αντιπροσωπεύει τον γαλακτικό αιθυλεστέρα.



Σχήμα 46: Χρωματογράφημα HPLC για την αντίδραση παραγωγής γαλακτικού αιθυλεστέρα, με μοριακή αναλογία αιθανόλης (99.9%)/γαλακτικού οξέος (80%) 3/1 και καταλύτη με  $w_{cat}=0.1$  (Δοκιμή 1) στα 255min.

Η 2<sup>η</sup> Δοκιμή πραγματοποιήθηκε πάλι με μοριακή αναλογία αιθανόλης γαλακτικού οξέος, 3/1. Τα αποτελέσματα φαίνονται στον παρακάτω πίνακα (Πίνακας 65).

Πίνακας 65: Συγκέντρωση γαλακτικού οξέος και μετατροπή του κατά την αντίδραση παραγωγής γαλακτικού αιθυλεστέρα, με μοριακή αναλογία αιθανόλης (99.9%)/γαλακτικού οξέος (80%) 3/1 και καταλύτη σε κλάσμα βάρους  $w_{cat}=0.1$  (Δοκιμή 2).

Χρόνος (min)	Γαλακτικό οξύ (g/L)	Μετατροπή γαλακτικού οξέος (%)
0	335.50	0.00
60	157.00	53.20
120	139.31	58.48
165	161.20	51.95
195	150.13	55.25

Με βάση τον παραπάνω πίνακα (Πίνακας 65) παρατηρείται ότι η μέγιστη μετατροπή γαλακτικού οξέος παρατηρείται στα 120min με ποσοστό μετατροπής ίσο με 58.48%. Συγκριτικά λοιπόν με την 1<sup>η</sup> Δοκιμή, στην οποία έγινε προσθήκη αιθανόλης, η 2<sup>η</sup> Δοκιμή εμφάνισε σε συντομότερο χρονικό διάστημα (120min αντί 255min) την υψηλότερη απόδοση, παρόμοια με τη μέγιστη της 1<sup>ης</sup> Δοκιμής (59.85%).

Στην 3<sup>η</sup> Δοκιμή έγινε επανάληψη της Δοκιμής 1 με διαφορές ότι χρησιμοποιήθηκε γαλακτικό οξύ, υψηλότερης καθαρότητας 88% και ότι στη Δοκιμή 3 έγινε προσθήκη μεγαλύτερης ποσότητας αιθανόλης, σε πιο τακτά χρονικά διαστήματα.

Πίνακας 66: Συγκέντρωση γαλακτικού οξέος και μετατροπή του κατά την αντίδραση παραγωγής γαλακτικού αιθυλεστέρα, με μοριακή αναλογία αιθανόλης (99.9%)/γαλακτικού οξέος (88%) 3/1 και καταλύτη με κλάσμα βάρους  $w_{cat}=0.1$  (Δοκιμή 3).

Χρόνος (min)	Γαλακτικό οξύ (g/L)	Μετατροπή γαλακτικού οξέος (%)
0	346.53	0.00
60	265.21	23.47
120	230.71	33.42
150	213.60	38.36
180	147.44	57.45

Από τα αποτελέσματα του παραπάνω πίνακα (Πίνακας 66) παρατηρείται ότι η μέγιστη μετατροπή γαλακτικού οξέος επιτυγχάνεται στα 180min ίση με 57.45%, τιμή που δεν αποκλίνει πολύ από την μέγιστη μετατροπή που επιτυγχάνεται στην Δοκιμή 1 στα 255min (59.85%). Έτσι η προσθήκη γαλακτικού οξέος υψηλότερης καθαρότητας, άρα μικρότερης περιεκτικότητας σε νερό, βελτίωσε την απόδοση και την παραγωγικότητα.

Στην 4<sup>η</sup> Δοκιμή, που εξετάστηκε η πορεία της αντίδρασης χωρίς τη προσθήκη καταλύτη και με μοριακή αναλογία αιθανόλης γαλακτικού οξέος 3/1, τα αποτελέσματα ήταν τα ακόλουθα (Πίνακας 67).

Πίνακας 67: Συγκέντρωση γαλακτικού οξέος και μετατροπή του κατά την αντίδραση παραγωγής γαλακτικού αιθυλεστέρα, με μοριακή αναλογία αιθανόλης (99.9%)/γαλακτικού οξέος (88%) 3/1, χωρίς προσθήκη καταλύτη (Δοκιμή 4).

Χρόνος (min)	Γαλακτικό οξύ (g/L)	Μετατροπή γαλακτικού οξέος (%)
0	346.53	0.00
60	644.05	-85.86
120	677.30	-95.45
180	582.45	-68.08

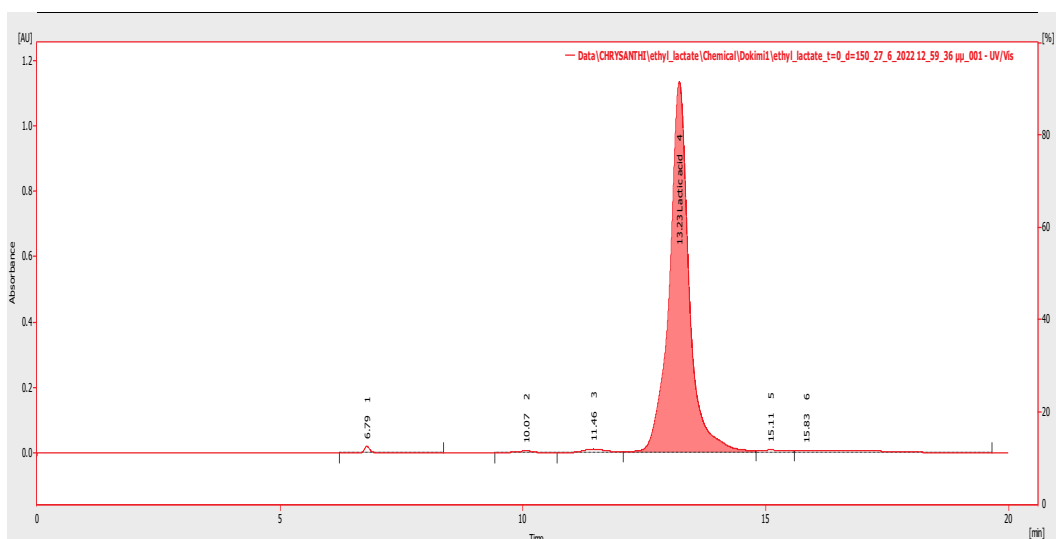
Από τα αποτελέσματα γίνεται φανερό ότι η αντίδραση τείνει προς τα αριστερά, δηλαδή προς την παραγωγή γαλακτικού οξέος και αρχεί να παρατηρηθεί η μετατροπή του για την παραγωγή γαλακτικού αιθυλεστέρα.

Στην 5<sup>η</sup> Δοκιμή, διερευνήθηκε η παραγωγή γαλακτικού αιθυλεστέρα με μοριακή αναλογία αιθανόλης γαλακτικού οξέος 1/1, με τα παρακάτω αποτελέσματα (Πίνακας 68).

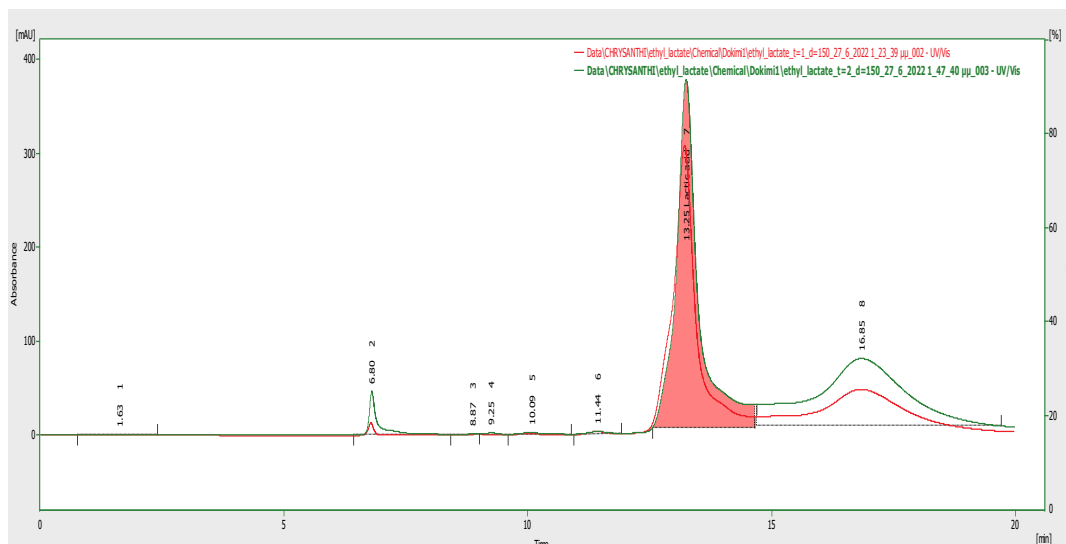
Πίνακας 68: Συγκέντρωση γαλακτικού οξέος και μετατροπή του κατά την αντίδραση παραγωγής γαλακτικού αιθυλεστέρα, με μοριακή αναλογία αιθανόλης (99.9%)/γαλακτικού οξέος (80%) 1/1 και καταλύτη με κλάσμα βάρους  $w_{cat}=0.1$  (Δοκιμή 5).

Χρόνος (min)	Γαλακτικό οξύ (g/L)	Μετατροπή γαλακτικού οξέος (%)
0	593.24	0.00%
60	232.86	60.75%
120	276.55	53.38%
180	300.38	49.37%

Με βάση τον παραπάνω πίνακα (Πίνακας 64) παρατηρείται ότι η μέγιστη μετατροπή γαλακτικού οξέος, σημειώθηκε στα 60min με μετατροπή γαλακτικού οξέος εκείνη την ώρα ίση με 60.75%. Παρόλο που η μέγιστη μετατροπή γαλακτικού οξέος παρατηρείται στα 60min, με βάση τα παρακάτω χρωματογράφημα (Σχήμα 47-Σχήμα 48) παρατηρείται αύξηση της κορυφής του γαλακτικού αιθυλεστέρα, με αυτή να είναι μέγιστη στα 120min. Αυτό πιθανότατα οφείλεται στο ότι με την προσθήκη των αντιδραστηρίων σε μοριακή αναλογία 1/1 ευνοείται ο σχηματισμός ολιγομερών του γαλακτικού οξέος, και έτσι το γαλακτικό οξύ δεν προλαβαίνει να αντιδράσει με τα μόρια αιθανόλης προς παραγωγή γαλακτικού αιθυλεστέρα. Για την αποφυγή ή μείωση εμφάνισης αυτού του φαινομένου του ολιγομερισμού, γινόταν στις προηγούμενες δοκιμές η προσθήκη των αντιδραστηρίων σε μοριακή αναλογία 3/1, ώστε η αιθανόλη να είναι σε περίσσεια και να αντιδράσει με τα μόρια γαλακτικού οξέος, προτού αυτά αντιδράσουν μεταξύ τους.

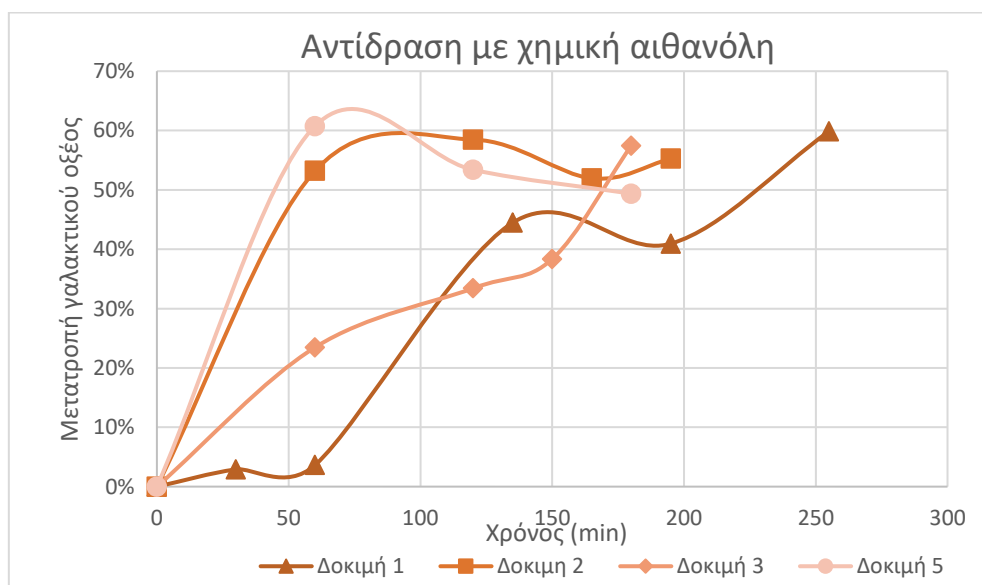


Σχήμα 47: Χρωματογράφημα HPLC για την αντίδραση παραγωγής γαλακτικού αιθυλεστέρα, με μοριακή αναλογία αιθανόλης (99.9%)/γαλακτικού οξέος (88%) 1/1 και καταλύτη με  $w_{cat}=0.1$  (Δοκιμή 5) στα 0min.



Σχήμα 48: Χρωματογράφημα HPLC για την αντίδραση παραγωγής γαλακτικού αιθυλεστέρα, με μοριακή αναλογία αιθανόλης (99.9%)/γαλακτικού οξέος (88%) 1/1 και καταλύτη με  $w_{cat}=0.1$  (Δοκιμή 5) στα 60 και 120min.

Για τις επιτυχείς δοκιμές (Δοκιμή 1, 2, 3, 5) κατασκευάστηκε το διάγραμμα μετατροπής του γαλακτικού οξέος σε συνάρτηση με τον χρόνο, όπως φαίνεται στο Σχήμα 49.



Σχήμα 49: Μετατροπή γαλακτικού οξέος κατά την χημική αντίδραση παραγωγής γαλακτικού αιθυλεστέρα συναρτήσει του χρόνου για τις Δοκιμές 1, 2, 3, 5.

#### 10.4.2 ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ ΜΕ ΒΙΟΑΙΘΑΝΟΛΗ ΚΑΙ ΓΑΛΑΚΤΙΚΟ ΟΞΥ

Στην 6<sup>η</sup> Δοκιμή έγινε διερεύνηση παραγωγής γαλακτικού αιθυλεστέρα με βιοαιθανόλη, καθαρότητας 89% και χημικό γαλακτικό οξύ, καθαρότητας 88%.



Πίνακας 69: Συγκέντρωση γαλακτικού οξέος και μετατροπή του κατά την αντίδραση παραγωγής γαλακτικού αιθυλεστέρα, με μοριακή αναλογία βιοαιθανόλης (89%)/γαλακτικού οξέος (88%) 3/1 και καταλύτη με κλάσμα βάρους  $w_{cat}=0.1$  (Δοκιμή 6).

Χρόνος (min)	Γαλακτικό οξύ (g/L)	Μετατροπή γαλακτικού οξέος (%)
0	363.47	0.00
30	313.00	2.38
90	285.97	10.81
150	283.09	11.71
210	227.27	29.12
270	189.73	54.01

Τα αποτελέσματα έδειξαν ότι στα 270min σημειώνεται η μέγιστη μετατροπή γαλακτικού οξέος, ίση με 54.01%, η οποία είναι προφανώς μικρότερη από τις αποδόσεις των αντιδράσεων με χρήση αποκλειστικά χημικών αντιδραστηρίων, λόγω της μικρότερης περιεκτικότητας τους σε νερό.

Στην 7<sup>η</sup> Δοκιμή έγινε επανάληψη της 6<sup>ης</sup> Δοκιμής με μόνη διαφορά ότι η προσθήκη αιθανόλης γινόταν πιο αραιά (ανά 60min) καθ' όλη τη διάρκεια της αντίδρασης, ενώ στην 6<sup>η</sup> γινόταν ανά τακτά χρονικά διαστήματα (ανά 15-30min).

Πίνακας 70: Συγκέντρωση γαλακτικού οξέος και μετατροπή του κατά την αντίδραση παραγωγής γαλακτικού αιθυλεστέρα, με μοριακή αναλογία βιοαιθανόλης (89%)/γαλακτικού οξέος (88%) 3/1 και καταλύτη με κλάσμα βάρους  $w_{cat}=0.1$  (Δοκιμή 7).

Χρόνος (min)	Γαλακτικό οξύ (g/L)	Μετατροπή γαλακτικού οξέος (%)
0	320.63	0.00
90	556.81	-73.66
150	624.73	-94.84
210	559.25	-74.42

Τα αποτελέσματα (Πίνακας 70) έδειξαν ότι η αντίδραση τείνει προς τα αριστερά, δηλαδή προς την παραγωγή γαλακτικού οξέος, και η παραγωγή του γαλακτικού αιθυλεστέρα δεν πέτυχε, γεγονός που πιθανότατα οφείλεται στην προσθήκη αιθανόλης από το απόσταγμα και έτσι θα μπορούσε η καθαρότητα της να είχε μειωθεί σε μεγάλο βαθμό και να γινόταν προσθήκη και μεγάλων ποσοτήτων νερού πέρα από αιθανόλης που οδηγούσαν την αντίδραση προς τα αριστερά δηλαδή προς την παραγωγή γαλακτικού οξέος.

Στην 8<sup>η</sup> Δοκιμή έγινε πραγματοποίηση της αντίδρασης παραγωγής γαλακτικού αιθυλεστέρα με χρήση βιολογικής αιθανόλης, υψηλότερης καθαρότητας, 93%. Τα αποτελέσματα ήταν τα παρακάτω (Πίνακας 71). Η προσθήκη αιθανόλης γινόταν αραιά, ανά 60min.

Πίνακας 71: Συγκέντρωση γαλακτικού οξέος και μετατροπή του κατά την αντίδραση παραγωγής γαλακτικού αιθυλεστέρα, με μοριακή αναλογία βιοαιθανόλης (93%)/γαλακτικού οξέος (88%) 3/1 και καταλύτη με κλάσμα βάρους  $w_{cat}=0.1$  (Δοκιμή 8).

Χρόνος (min)	Γαλακτικό οξύ (g/L)	Μετατροπή γαλακτικού οξέος (%)
0	328.21	0.00
90	581.51	-77.18
150	620.51	-89.06
210	568.53	-73.22
270	463.13	-41.11

Με βάση τα αποτελέσματα του παραπάνω πίνακα (Πίνακας 71), η αντίδραση τείνει προς την παραγωγή γαλακτικού οξέος και όχι προς γαλακτικού αιθυλεστέρα. Για το γεγονός αυτό οφείλεται η προσθήκη μικρών ποσοτήτων αιθανόλης ανά 60min, όταν ήδη στα πρώτα 60min έχουν αποσπάσει μεγάλες ποσότητες αιθανόλης.

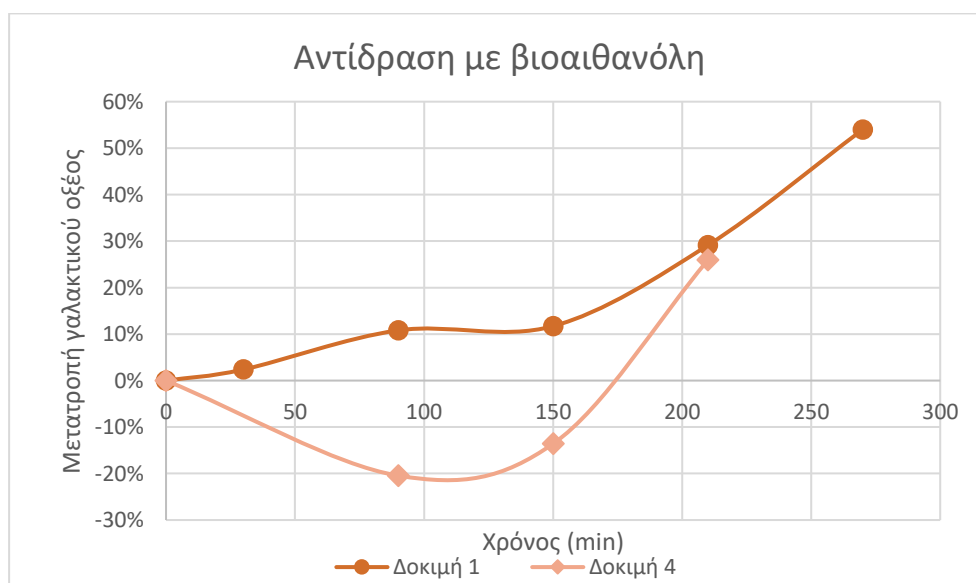
Στην 9<sup>η</sup> Δοκιμή έγινε επανάληψη της 8<sup>ης</sup>, με μόνη διαφορά ότι η προσθήκη αιθανόλης γινόταν σε πιο τακτά χρονικά διαστήματα για τα πρώτα 120min, ενώ στην 8<sup>η</sup> γινόταν προσθήκη ανά 60min και άρα η συνολικά προστιθέμενη αιθανόλη ήταν μικρότερη στην Δοκιμή 8.

Πίνακας 72: Συγκέντρωση γαλακτικού οξέος και μετατροπή του κατά την αντίδραση παραγωγής γαλακτικού αιθυλεστέρα, με μοριακή αναλογία βιοαιθανόλης (93%)/γαλακτικού οξέος (88%) 3/1 και καταλύτη με κλάσμα βάρους  $w_{cat}=0.1$  (Δοκιμή 9).

Χρόνος (min)	Γαλακτικό οξύ (g/L)	Μετατροπή γαλακτικού οξέος (%)
0	328.21	0.00
90	395.33	-20.45
150	372.80	-13.58
210	24309	25.94

Από τα αποτελέσματα προέκυψε ότι η Δοκιμή 9, είχε καλύτερα αποτελέσματα συγκριτικά με την 8, όπου η προσθήκη αιθανόλης από το απόσταγμα γινόταν πιο αραιά και ήταν συνολικά λιγότερη από την αιθανόλη που προστέθηκε στην Δοκιμή 9 που η προσθήκη της έγινε και σε πιο τακτά χρονικά διαστήματα στην αρχή. Η μέγιστη μετατροπή γαλακτικού οξέος που επιτυγχάνεται είναι 25.94% στα 210min, τιμή αρκετά μικρή που πιθανότατα οφείλεται στο ότι η προσθήκη αιθανόλης γινόταν από το απόσταγμα και θα μπορούσε η καθαρότητα της να είχε μειωθεί σε μεγάλο βαθμό. Έτσι, στη σφαιρική φιάλη γινόταν πιθανότατα προσθήκη και μεγάλων ποσοτήτων νερού πέρα από αιθανόλης που οδηγούσαν την αντίδραση προς τα αριστερά δηλαδή προς την παραγωγή γαλακτικού οξέος.

Για τις επιτυχείς δοκιμές παραγωγής γαλακτικού αιθυλεστέρα με βιοαιθανόλη και χημικό γαλακτικό οξύ (Δοκιμή 6, 9) κατασκευάστηκε το διάγραμμα μετατροπής του γαλακτικού οξέος συναρτήσει του χρόνου, όπως φαίνεται στο Σχήμα 50.



Σχήμα 50: Μετατροπή γαλακτικού οξέος κατά την αντίδραση παραγωγής γαλακτικού αιθυλεστέρα από βιοαιθανόλη συναρτήσει του χρόνου για τις Δοκιμές 6, 9.

## 11 ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ

### 11.1 ΠΕΙΡΑΜΑΤΑ ΠΑΡΑΓΩΓΗΣ ΑΙΘΑΝΟΛΗΣ

Όσον αφορά τα πειράματα παραγωγής αιθανόλης μόνο με αμυλάση σε εργαστηριακή κλίμακα, εξετάστηκαν τα φορτία στερεών 15, 20, 25, 30% σε συνθήκες 40μL/g αμύλου αμυλάση και 2% w/w μαγιά (συνθήκες i) στις 24 και 48 ώρες, από όπου διαπιστώθηκε ότι απαιτούνται 48h για τη ζύμωση. Στα πειράματα αυτά οι αποδομήσεις του στερεού και του αμύλου κυμαίνονταν σε υψηλά επίπεδα (76% και 98% αντίστοιχα), τιμές που υποδηλώνουν την επιτυχή μετατροπή του αμύλου σε σάκχαρα. Έπειτα στις ίδιες συνθήκες για 48h εξετάστηκαν υψηλότερα φορτία στερεών (30, 35, 40% w/w) από όπου φάνηκε ότι με την αύξηση του φορτίου μέχρι το 35% αυξάνεται η συγκέντρωση της παραγόμενης αιθανόλης και μειώνεται η απόδοση σε αιθανόλη. Για φορτίο 40% w/w τόσο η συγκέντρωση ( $71.05 \pm 7.78$  g/L) όσο και η απόδοση της αιθανόλης ( $49.92 \pm 5.49$  %) παρουσίασαν χαμηλότερες τιμές από αυτές για 35% w/w,  $90.00 \pm 0.00$  g/L και  $77.73 \pm 0.03$  % αντίστοιχα. Για περαιτέρω βελτίωση των αποτελεσμάτων, εξετάστηκε η αύξηση της δοσολογίας του ενζύμου (60μL/g αμύλου αμυλάση) και της μαγιάς (3% w/w) (συνθήκες ii). Τα βέλτιστα αποτελέσματα προέκυψαν σε φορτίο στερεών 35% όπου μετρήθηκε συγκέντρωση αιθανόλης  $103.50 \pm 3.24$  g/L και απόδοση αιθανόλης  $89.42 \pm 2.76$  %.

Έπειτα, τα βέλτιστα αποτελέσματα ανακλιμακώθηκαν σε αντιδραστήρα 4L, όπου η μέγιστη συγκέντρωση αιθανόλης που επιτεύχθηκε ήταν ίση με 90g/L στις 45.5h τιμή ανάλογη με την εργαστηριακή κλίμακα. Μετά το πέρας των 48h, μετρήθηκαν οι αποδομήσεις του στερεού και του αμύλου ίσες με  $81.71 \pm 0.72$  % και  $99.06 \pm 0.06$  %, τιμές που επιβεβαιώνουν την επιτυχή έκβαση του πειράματος.

Στη συνέχεια, επιχειρήθηκε η πραγματοποίηση πειραμάτων για παραγωγή αιθανόλης με προσθήκη μείγματος ενζύμων λακτάσης και αμυλάσης. Από τα φορτία που εξετάστηκαν, καλύτερα αποτελέσματα παρατηρήθηκαν στις ακόλουθες συνθήκες: 20% w/w με προσθήκη 8mg/g λακτόζης λακτάση, 40μL/g αμυλάσης και 2% w/w μαγιάς. Η μέγιστη συγκέντρωση αιθανόλης που επιτεύχθηκε ήταν  $61.25 \pm 1.77$  g/L με απόδοση αιθανόλης  $82.12 \pm 2.28$  %.

### 11.2 ΠΕΙΡΑΜΑΤΑ ΠΑΡΑΓΩΓΗΣ ΓΑΛΑΚΤΙΚΟΥ ΟΞΕΟΣ

Στη συνέχεια, τα πειράματα επικεντρώθηκαν στην παραγωγή γαλακτικού οξέος, με 20% φορτίο, με χρήση του ζυμομύκητα *Saccharomyces cerevisiae*, και εμπορικού μείγματος μαγιάς και προζυμιού που δεν είχαν το επιθυμητό αποτέλεσμα και δεν παρήγαγαν γαλακτικό οξύ. Για την παραγωγή γαλακτικού οξέος βρέθηκε ότι απαραίτητη είναι η παρουσία των γαλακτικών βακτηρίων (LAB), για αυτό και έγινε χρήση εμπορικού συμπλέγματος πηκτικών ενζύμων, μείγματος *Lactobacillus* & *Streptococcus*, μείγματος διάφορων *Lactobacillus* (υπό μορφή προβιοτικών) και μιας ελεύθερης μεικτής καλλιέργειας γαλακτοβακίλλων και ζυμομυκήτων (νωπό προζύμι που είχε αφεθεί σε θερμοκρασία δωματίου για 30 ημέρες).

Έτσι τα επόμενα πειράματα έγιναν με χρήση εμπορικού συμπλέγματος πηκτικών ενζύμων, μείγματος *Lactobacillus* & *Streptococcus*, μείγματος διάφορων *Lactobacillus* και μιας ελεύθερης μεικτής καλλιέργειας γαλακτοβακίλλων και ζυμομυκήτων με προσθήκη μόνο αμυλάσης, μόνο λακτάσης, μείγματος αμυλάσης και λακτάσης για 72h. Τα πειράματα που εμφάνισαν καλύτερα αποτελέσματα ήταν αυτά με τη χρήση μόνο λακτάσης και με μείγματος αμυλάσης και λακτάσης.

Τα επόμενα πειράματα (χωρίς ένζυμα, μόνο με λακτάση και με συνδυασμό αμυλάσης και λακτάσης) επικεντρώθηκαν στη χρήση της μεικτής καλλιέργειας. Το πείραμα με χρήση και των δύο ενζύμων παρουσίασε στις 216h (9d) την μέγιστη συγκέντρωση γαλακτικού οξέος, ίση με 42.35g/L. Έπειτα προκειμένου να μειωθεί ο χρόνος της βιομετατροπής ο οποίος απαιτείται για την επίτευξη της μέγιστης συγκέντρωσης γαλακτικού οξέος,

πραγματοποιήθηκαν πειράματα επαναλαμβανόμενης ζύμωσης (repeated fermentation). Μετά από 3 κύκλους ζύμωσης με προσθήκη του μείγματος των ενζύμων σε κάθε κύκλο, επιτεύχθηκε συγκέντρωση αιθανόλης (39.83g/L) ανάλογη με την αρχική δοκιμή (42.35g/L) σε σημαντικά λιγότερο χρόνο (σε 72h) υποδηλώνοντας την αύξηση του ρυθμού παραγωγής κατά 2.8 φορές.

### 11.3 ΠΕΙΡΑΜΑΤΑ ΠΑΡΑΓΩΓΗΣ ΓΑΛΑΚΤΙΚΟΥ ΑΙΘΥΛΕΣΤΕΡΑ

Τέλος, πραγματοποιήθηκαν δοκιμές παραγωγής του γαλακτικού αιθυλεστέρα μέσω της αντίδρασης αιθανόλης και γαλακτικού οξέος.

Αποδείχθηκε ότι είναι απαραίτητη η χρήση του καταλύτη Amberlyst 15 σε κλάσμα βάρους  $w_{cat}=0.1$ . Επιπλέον είναι σημαντικό να διατηρείται σταθερή η μοριακή αναλογία αιθανόλης/γαλακτικού οξέος κατά την πορεία της αντίδρασης και να προστίθεται ανά τακτά χρονικά διαστήματα ποσότητα αιθανόλης, καθώς πρέπει να είναι διαρκώς σε περίσσεια για την αποφυγή εμφάνισης του φαινομένου του ολιγομερισμού του γαλακτικού οξέος, που εμποδίζει την παραγωγή του γαλακτικού αιθυλεστέρα. Ως βέλτιστη αρχική μοριακή αναλογία προτείνεται η αναλογία αιθανόλης/γαλακτικού οξέος 3/1.

Η απόδοση μετατροπής του γαλακτικού οξέος κυμάνθηκε από 57.45% έως 59.85% όταν χρησιμοποιήθηκαν εμπορικές χημικές πρώτες ύλες (αιθανόλης (99.99% w/w και γαλακτικό οξύ 80-88%). Η μέγιστη μετατροπή γαλακτικού οξέος που παρατηρήθηκε ήταν ίση με 54.01% στα 270min, υποδεικνύοντας ότι είναι τεχνικά εφικτή η χρήση βιολογικών πρώτων υλών για την παραγωγή γαλακτικού αιθυλεστέρα.

Συμπερασματικά, στα πλαίσια της παρούσας διπλωματικής αποδείχθηκε ότι είναι τεχνικά εφικτή η μετατροπή οργανικών βιομηχανικών αποβλήτων σε προϊόντα προστιθέμενης αξίας όπως βιοαιθανόλη, γαλακτικό οξύ και γαλακτικός αιθυλεστέρας.

## 12 ΜΕΛΛΟΝΤΙΚΕΣ ΠΡΟΤΑΣΕΙΣ

Μιας και η παρούσα διπλωματική αποτέλεσε το πρώτο βήμα για την παραγωγή πράσινων βιοδιαλυτών από βιομηχανικά απόβλητα κρίνεται σκόπιμο με βάση τα ελπιδοφόρα αποτελέσματα ότι η έρευνα θα πρέπει να συνεχιστεί προς αυτή την κατεύθυνση. Με βάση την εμπειρία μου θα πρότεινα την συστηματική αριστοποίηση των πειραματικών συνθηκών παραγωγής των βιοδιαλυτών, εφαρμόζοντας τεχνικές πειραματικού σχεδιασμού, όπως ο παραγοντικός σχεδιασμός. Επιπλέον ενδιαφέρον θα είχε να εξεταστεί η χρήση εναλλακτικών υποστρωμάτων είτε άλλων βιομηχανικών αποβλήτων είτε οργανικών αστικών αποβλήτων, όπως τα υπολείμματα τροφών. Απαραίτητη βέβαια είναι η συνολική βελτιστοποίηση των διεργασιών καθώς και η απομόνωση των προϊόντων λαμβάνοντας υπόψιν τεχνοοικονομικούς παράγοντες

## ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

1. Höök, M., & Tang, X. (2013). Depletion of fossil fuels and anthropogenic climate change—A review. *Energy policy*, 52, 797-809.
2. IEA, 2011. Key World Energy Statistics 2011.  
[www.iea.org](http://www.iea.org)
3. No, B. (2011). National policy on biofuels. *Explor. Renew. Altern. Energy Use India*, (14), 205-214
4. Khalil, E.E. (2012). The Role of Solar and Other Renewable Energy Sources on the Strategic Energy Planning: AFRICA's Status & Views, *ASHRAE Transactions*, 118 (PART 1) pp. 64-72
5. Κορδούλης, Χ. (2013). Μέθοδοι αξιοποίησης βιομάζας για παραγωγή βιοκαυσίμων. Πάτρα, *Ελληνικό Ανοικτό Πανεπιστήμιο*
6. Directive (EU) 2018/2001 of the European Parliament and of the Council of 11 December 2018 on the promotion of the use of energy from renewable sources.  
<https://eur-lex.europa.eu/eli/dir/2018/2001/oj>
7. Biodegradable Waste.  
<https://ec.europa.eu/environment/waste/compost/index.htm>
8. ePure. (2020). Overview of biofuels policies and markets across the EU-27 and the UK. November, 70.
9. Saveyn, H., & Eder, P. (2014). End-of-waste criteria for biodegradable waste subjected to biological treatment (compost & digestate): Technical proposals. *Publications Office of the European Union, Luxembourg*
10. Pereira, C. S. M., Silva, V. M. T. M., & Rodrigues, A. E. (2011). Ethyl lactate as a solvent: Properties, applications and production processes – a review. *Green Chemistry*, 13(10), 2658. doi:10.1039/c1gc15523g. (n.d.).
11. Anastas, P., & Eghbali, N. (2010). Green chemistry: principles and practice. *Chemical Society Reviews*, 39(1), 301-312.
12. [1η διάλεξη \(Εισαγωγή - ΕΚΑ\) Μ. Μπουρουσιάν.pdf](#)
13. [Τα βιομηχανικά απόβλητα και η αξιοποίησή τους – Μετάδοση Ισχύος \(metadosi-schios.gr\)](#)
14. Επίσημη Εφημερίδα της Ευρωπαϊκής Ένωσης 2018/C 124/01  
[C 2018124EL.01000101.xml \(europa.eu\)](http://eur-lex.europa.eu/legal-content/EN/TXT/?uri=CELEX:2018124EL.01000101.xml)
15. <https://el.green-ecolog.com/15337835-industrial-waste-what-are-they-examples-types-classification-and-management>
16. [Ενέργεια — Ευρωπαϊκός Οργανισμός Περιβάλλοντος \(europa.eu\)](#)
17. Priya, Deora, P. S., Verma, Y., Muhal, R. A., Goswami, C., & Singh, T. (2022). Biofuels: An alternative to conventional fuel and energy source. *Materials Today: Proceedings*, 48(xxxx), 1178–1184.
18. [Ορυκτά καύσιμα: τι είναι, παραδείγματα και πλεονεκτήματα και μειονεκτήματα | Πράσινες ανανεώσιμες πηγές \(renovablesverdes.com\)](#)
19. [Περιβαλλοντικές συνέπειες της χρήσης των ορυκτών καυσίμων – Διδάσκοντας Σήμερα \(sch.gr\)](#)
20. Luque, R., Herrero-Davila, L., Campelo, J. M., Clark, J. H., Hidalgo, J. M., Luna, D., Marinas, J. M., & Romero, A. A. (2008). Biofuels: A technological perspective. *Energy and Environmental Science*, 1(5), 542–564.+
21. [Βιοκαύσιμα | Agroenergy.gr](#)  
<http://www.agroenergy.gr/categories/%CE%B2%CE%B9%CE%BF%CE%BA%CE%B1%CF%8D%CF%83%CE%B9%CE%BC%CE%B1>
22. Demirbas, F., H., Balat, M., Balat, H. (2011). Biowastes-to-biofuels, *Energy Conversion and Management*, 52, 1815-1828

23. Awogbemi, O., Von Kallon, D. V., Onuh, E. I., & Aigbodion, V. S. (2021). An overview of the classification, production and utilization of biofuels for internal combustion engine applications. *Energies*, 14(18), 1–42.
24. IPCC (2007a), Climate change 2007: the physical science basis, Contribution of working group 1 to the fourth assessment report of the Intergovernmental Panel on Climate Change, ed. S. Solomon, D. Qin, M. Manning, Z. Chen, M. Marquis, K. B. Averyt, M. Tignor and H. L. Miller, Cambridge University Press, Cambridge, United Kingdom and New York, NY, USA.
25. Mandley, S., Daioglou, V., Junginger, H., van Vuuren, D., Wicke (2020). B. EU bioenergy development to 2050. *Renew. Sustain. Energy Rev.*, 127, 109858.
26. Senatore, A., Dalena, F., Sola, A., Marino, A., Valletta, V., Basile, A. (2019) First-generation feedstock for bioenergy production. In *Second and Third Generation of Feedstocks*; Basile, A., Dalena, F., Eds.; Elsevier: London, UK, pp. 35–57.
27. Aditya, H. B., Mahlia, T. M. I., Chong, W. T., Nur, H., & Sebayang, A. H. (2016). Second generation bioethanol production: A critical review. In *Renewable and Sustainable Energy Reviews* (Vol. 66, pp. 631–653).
28. Carriquiry M.A., X. Du, Timilsina G.R. (2011) Second generation biofuels: Economics and policies, *Energy policy* 39 (7) 4222–4234.
29. Niphadkar, S., Bagade, P., & Ahmed, S. (2018). Bioethanol production: insight into past, present and future perspectives. *Biofuels*, 9(2), 229-238.
30. Beville, K. (2008). Building the 'Minnesota Model'. *Ethanol Producer Magazine*, 114-120
31. Abebe, M., Drozda, M., Fleming, C., Jameson, L., Price, A. E., Veik, K., ... & Hahn, M. (2008). Ethanol: Salvation or Damnation?
32. Berg, C. (1998). Towards a world ethanol market?. *FO Licht's international molasses and alcohol report (Germany)*.
33. Demirbas, A. (2005). Bioethanol from cellulosic materials: a renewable motor fuel from biomass. *Energy sources*, 27(4), 327-337.
34. Demirbas, A. (2008). Recent progress in biorenewable feedstocks. *Energy Edu Sci Technol*, 22(1), 69-95
35. Balat, M. (2009). Bioethanol as a vehicular fuel: a critical review. *Energy Sources, Part A*, 31(14), 1242-1255.
36. Sebayang, A. H., Masjuki, H. H., Ong, H. C., Dharma, S., Silitonga, A. S., Mahlia, T. M. I., & Aditya, H. B. (2016). A perspective on bioethanol production from biomass as alternative fuel for spark ignition engine. *Rsc Advances*, 6(18), 14964-14992.
37. Hoogwijk, M., Faaij, A., Van Den Broek, R., Berndes, G., Gielen, D., & Turkenburg, W. (2003). Exploration of the ranges of the global potential of biomass for energy. *Biomass and bioenergy*, 25(2), 119-133
38. <http://el.wikipedia.org/wiki/Αιθανόλη>
39. Alzeer, J., & Abou Hadeed, K. (2016). Ethanol and its Halal status in food industries. *Trends in Food Science & Technology*, 58, 14-20
40. [Προϊόντα καθημερινής χρήσης που περιέχουν αλκοόλ \(iatronet.gr\)](http://iatronet.gr)
41. [Προσδιορισμός Αιθυλικής Αλκοόλης στα Τρόφιμα \(eurolab.net\)](http://eurolab.net)
42. Baras, J. K., Gaćeša, S. B., & Pejin, D. J. (2002). Ethanol is a strategic raw material. *Hemijaska industrija*, 56(3), 89-104
43. [Οργανική Χημεία Θεωρία Μαθήματα Ακαδημαϊκού Έτους 2017 - 2018 \(upatras.gr\)](http://upatras.gr)
44. Mehta, A. J. (2016). Alcoholism and critical illness: A review. *World journal of critical care medicine*, 5(1), 27.
45. Seitz, H. K., & Mueller, S. (2015). Alcohol and cancer: an overview with special emphasis on the role of acetaldehyde and cytochrome P450 2E1. *Biological basis of alcohol-induced cancer*, 59-70.
46. Balat, M. (2011). Production of bioethanol from lignocellulosic materials via the



65. Kotzamanidis, C. H., Roukas, T., & Skaracis, G. (2002). Optimization of lactic acid production from beet molasses by *Lactobacillus delbrueckii* NCIMB 8130. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 18(5), 441-448.
66. Alvarez, M. M., Aguirre-Ezkauriatza, E. J., Ramírez-Medrano, A., & Rodríguez-Sánchez, Á. (2010). Kinetic analysis and mathematical modeling of growth and lactic acid production of *Lactobacillus casei* var. *rhamnosus* in milk whey. *Journal of Dairy Science*, 93(12), 5552-5560
67. Massoud, M. I., & Abd El-Razek, A. M. (2011). Suitability of Sorghum bicolor L. stalks and grains for bioproduction of ethanol. *Annals of Agricultural Sciences*, 56(2), 83-87.
68. Abdel-Rahman, M. A., Tashiro, Y., & Sonomoto, K. (2011). Lactic acid production from lignocellulose-derived sugars using lactic acid bacteria: overview and limits. *Journal of biotechnology*, 156(4), 286-301
69. Sikder, J., Chakraborty, S., Pal, P., Drioli, E., & Bhattacharjee, C. (2012). Purification of lactic acid from microfiltrate fermentation broth by cross-flow nanofiltration. *Biochemical Engineering Journal*, 69, 130-137.
70. Dangpradab, B., & Rattanaphanee, P. (2015). Efficiency comparison of different design schemes of reactive distillation process for ethyl lactate production from fermentation-derived magnesium lactate. In *Computer Aided Chemical Engineering* (Vol. 37, pp. 1079-1084). Elsevier
71. Delgado, P., Sanz, M. T., Beltrán, S., & Núñez, L. A. (2010). Ethyl lactate production via esterification of lactic acid with ethanol combined with pervaporation. *Chemical Engineering Journal*, 165(2), 693-700.
72. Stipsitz, P., Mandl, M., & Harasek, M. (2021). Ethyl lactate production by reactive distillation—optimization of reaction kinetics and energy efficiency. *Open Research Europe*, 1(82), 82
73. [K-ETOH DATA.pdf \(megazyme.com\)](#)
74. Rakhmanova, A., Khan, Z. A., & Shah, K. (2018). A mini review fermentation and preservation: role of lactic acid bacteria. *MOJ Food Process Technol*, 6(5), 414-417.
75. Bustamante, D., Tortajada, M., Ramón, D., & Rojas, A. (2019). Production of D-lactic acid by the fermentation of orange peel waste hydrolysate by lactic acid bacteria. *Fermentation*, 6(1), 1.