



ΕΘΝΙΚΟ ΜΕΤΣΟΒΙΟ ΠΟΛΥΤΕΧΝΕΙΟ  
ΣΧΟΛΗ ΧΗΜΙΚΩΝ ΜΗΧΑΝΙΚΩΝ  
ΤΟΜΕΑΣ IV: ΣΥΝΘΕΣΗ ΚΑΙ ΑΝΑΠΤΥΞΗ  
ΒΙΟΜΗΧΑΝΙΚΩΝ ΔΙΑΔΙΚΑΣΙΩΝ  
ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΟ ΟΡΓΑΝΙΚΗΣ ΧΗΜΙΚΗΣ  
ΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑΣ

---

Ενζυμική Υδρόλυση Αποβλήτων  
Τροφίμων και Παραγωγή Βιοαερίου μέσω  
Αναερόβιας Χώνευσης σε Εργαστηριακής  
και Πιλοτικής Κλίμακας Εγκαταστάσεις

Διπλωματική Εργασία

Ονοματεπώνυμο

Βιδιάνος Γιαννίτσης

Φοιτητή:

---

Αθήνα, 2024

## Περίληψη

Τα υπολείμματα τροφών (ΥΤ) αποτελούν μία από τις σημαντικότερες κατηγορίες οργανικών αποβλήτων. Η μη ορθή διαχείριση τους επιβαρύνει σημαντικά κάθε έναν από τους τρεις πυλώνες της βιωσιμότητας. Ένα από τα αρχικά εμπόδια επιτυχούς αξιοποίησής τους είναι ότι αποτελείται από διάφορα μακρομόρια τα οποία δεν μπορούν να βιοαποδομηθούν άμεσα. Οπότε, για να αξιοποιηθεί κατάλληλα, απαιτείται ένα στάδιο υδρόλυσης. Ιδανικά, αυτό μπορεί να επιτευχθεί ενζυμικά. Όμως, το υψηλό κόστος ενός ενζυμικού σκευάσματος αποτελεί παρεμποδιστικός παράγοντας για την εμπορική εφαρμογή μίας τέτοιας διεργασίας. Μία υποσχόμενη και οικονομικά εφαρμόσιμη λύση είναι η χρήση εμπορικών σκευασμάτων ενζύμων και μικροοργανισμών. Ένα τέτοιο σκεύασμα έχει υψηλή ενζυμική ενεργότητα, οπότε μπορεί να υδρολύσει αποτελεσματικά τα υπολείμματα και χαμηλότερη τιμή σε σχέση με τη χρήση καθαρών ενζύμων. Ακόμη, λόγω της παρουσίας μικροοργανισμών, γίνεται μία ταυτόχρονη ζύμωση των ΥΤ. Σκοπός της παρούσας μελέτης είναι η αναλυτική διερεύνηση της δράσης ενός τέτοιου σκευάσματος για παραγωγή μίας υγρής εκροής πλούσιας σε πτητικά λιπαρά οξέα σε εργαστηριακή και πιλοτική κλίμακα. Η εκροή αυτή μπορεί να χρησιμοποιηθεί για διεργασίες όπως η αναερόβια χώνευση. Στα πειράματα εργαστηριακής κλίμακας, τα οποία διεξάχθηκαν σε αντιδραστήρες διαλείποντος έργου, συνολικού όγκου 1 L, έγινε βελτιστοποίηση της διεργασίας ως προς την θερμοκρασία και την ποσότητα του σκευάσματος που προστίθεται. Μέσω αυτών, βρέθηκε πως η υδρόλυση παράγει την μέγιστη ποσότητα οξεογενών προϊόντων σε θερμοκρασία 40 °C και σε ποσότητα 10 mL σκευάσματος/kg ΥΤ. Στα πειράματα πιλοτικής κλίμακας, τα οποία διεξάχθηκαν σε αντιδραστήρα 300 L ημισυνεχούς λειτουργίας, έγιναν δοκιμές για να εξεταστεί η κλιμάκωση της διεργασίας και εξετάστηκε η ποιότητα της υδρόλυσης ανάλογα με την ποσότητα σκευάσματος και την παροχή νερού. Βρέθηκε πως η παροχή μεγαλύτερης ποσότητας νερού δεν επηρεάζει την υδρόλυση, πέραν της αραιώσης, ενώ η ποσότητα σκευάσματος επηρεάζει αρνητικά την παραγωγή διαλυτού οργανικού φορτίου αν αυξηθεί από  $5 \frac{mL}{kg \text{ ΥΤ}}$  σε  $10 \frac{mL}{kg \text{ ΥΤ}}$  καθώς ο λόγος  $\frac{sCOD}{iCOD}$  μεταβάλλεται από  $46.1 \pm 12.2\%$  σε  $32.7 \pm 10.3\%$  κατά την αλλαγή αυτή. Επιπλέον, έγιναν και δοκιμές αναερόβιας χώνευσης σε αντιδραστήρες διαλείποντος έργου 500 mL, για να μετρηθεί η παραγωγή βιομεθανίου από τα υδρολύματα αυτά, χρησιμοποιώντας αναερόβια λάσπη από 3 διαφορετικές πηγές. Παρατηρήθηκε πως τα υδρολύματα με 5 και 10 mL σκευάσματος/kg ΥΤ είχαν την καλύτερη απόδοση. Συγκεκριμένα, το  $10 \frac{mL}{kg \text{ ΥΤ}}$  είχε το χαμηλότερο χρόνο υστέρησης και τον υψηλότερο ρυθμό παραγωγής μεθανίου, λόγω της καλύτερης οξεογένεσης. Όμως, είχε χαμηλότερη παραγωγή μεθανίου από το υδρόλυμα με 5 mL σκευάσματος/kg ΥΤ, καθώς είχε χειρότερη υδρόλυση. Σε σύγκριση με ανεπεξέργαστα ΥΤ, τα υδρολύματα αυτά είχαν 4-5 φορές μεγαλύτερη παραγωγή μεθανίου. Τα συμπεράσματα αυτά επαληθεύτηκαν χρησιμοποιώντας λάσπες διαφορετικών προελεύσεων και χρησιμοποιώντας υδρόλυμα από εργαστηριακή αλλά και πιλοτική κλίμακα. Συμπερασματικά, η υδρόλυση/βιοαποδόμηση ΥΤ μπορεί να γίνει αποτελεσματικά με ένα εμπορικό σκεύασμα ενζύμων και μικροοργανισμών και το παραγόμενο υδρόλυμα είναι ιδιαίτερα κατάλληλο ως υπόστρωμα για αναερόβια χώνευση.

Λέξεις Κλειδιά: Υπολείμματα τροφίμων, Υδρόλυση, Βιοαποδόμηση, Αναερόβια χώνευση, Παραγωγή μεθανίου

## Abstract

Food Waste (FW) is one of the most important categories of organic waste. Their improper treatment has a very negative impact in all three of the sustainability pillars. One of the initial obstacles in their successful valorization is that they consist of various macromolecules which can not be biodegraded rapidly. For their proper valorization, a hydrolysis step is necessary. Ideally, this is done using enzymes. However, the high cost of enzymic mixtures is a hindering factor for the commercial application of this process. A promising and economic solution for this is the use of commercial mixtures of enzymes and microorganism. Such a mix has high enzymatic activity, thus can effectively hydrolyze the FW and has a very low price compared to pure enzymes. Furthermore, due to the microorganisms, the FW is fermented as well as hydrolyzed. The goal of this study is an in-depth analysis of the function of such a mix for the production of a liquid effluent, rich in volatile fatty acids, in lab and pilot scale. This effluent can be used in processes such as anaerobic digestion. In the lab scale experiments, which were conducted in batch reactors of total volume 1 L, the process was optimized for temperature and mix amount. From these experiments, it was found that the maximum amount of acidogenic products were produced at a temperature of 40 ° C and with a mix amount of 10 mL/kg FW. In the pilot scale experiments, which were conducted in a semi-continuous reactor with volume 300 L, scale-up tests were done, as well as tests for the hydrolysis quality when varying the mix amount and water flow. It was found that increasing the water flow did not affect the hydrolysis, while the addition of mix beyond 5 mL/kg FW negatively affected the process, since  $\frac{sCOD}{tCOD}$  changed from  $46.1 \pm 12.2\%$  to  $32.7 \pm 10.3\%$  when the mix amount was increased to 10 mL/kg FW. Furthermore, anaerobic tests were conducted in batch reactors with volume 500 mL, to assess the biomethane production of these hydrolysates, using sludge from 3 different sources. It was found that the hydrolysates with 5 and 10 mL mix/kg FW had the best production. Specifically, the hydrolysate with 10 mL mix/kg FW had the lowest lag time and fastest production rate, indicating the best acidogenesis, but had less methane production compared to the hydrolysate with 5 mL mix/kg FW. Compared to untreated FW, the hydrolysates had 4-5 times more methane production. These conclusions were validated for different sludge samples and using both lab and pilot scale hydrolysates. To conclude, the hydrolysis/biodegradation of FW can be effectively done using a commercial mixture of enzymes and microorganisms and the produced hydrolysate is a very good substrate for anaerobic digestion.

Keywords: Food waste, Hydrolysis, Biodegradation, Anaerobic digestion, Methane production

# Ευχαριστίες

Η διπλωματική εργασία αυτή δεν θα ήταν δυνατή χωρίς την βοήθεια και καθοδήγηση που δέχτηκα από τον υπεύθυνο καθηγητή μου κ. Ανέστη Βλυσίδα, με τον οποίο είχα εξαιρετική συνεννόηση και συνεργασία. Χάρis αυτόν η εργασία παρουσιάστηκε πρόσφατα στο 14ο Πανελλήνιο Συνέδριο Χημικής Μηχανικής, όπου βραβεύτηκε ως η καλύτερη αναρτημένη εργασία της ημέρας και είμαι ιδιαίτερα ευγνώμων που μου δόθηκε αυτή η ευκαιρία. Ιδιαίτερα πολύτιμη ήταν και η βοήθεια που είχα στην διεξαγωγή των πειραμάτων, αλλά και στη συγγραφή της εργασίας από τους μεταδιδακτορικούς ερευνητές του εργαστηρίου Οργανικής Χημικής Τεχνολογίας Δημοσθένη Τσιβά και Δήμητρα Θεοδόση Παλιμέρη. Και οι δύο ήταν εκεί για ότι χρειάστηκα και η στήριξη τους ήταν πολύ σημαντική για την ολοκλήρωση της εργασίας αυτής.

Ακόμη, νιώθω υπόχρεος στην ομάδα του Statista, οι οποίοι μας πρόσφεραν δωρεάν πρόσβαση σε όλη την ιστοσελίδα τους για μερικούς μήνες. Χάρis αυτό, κατάφερα να βρω πολύ αναλυτικά και ανανεωμένα στατιστικά στοιχεία για το αντικείμενο της μελέτης μου, τα οποία έκαναν την εισαγωγή της εργασίας πολύ πιο ευπαρουσίαστη και ενδιαφέρουσα. Πολλά ευχαριστώ θα ήθελα να δώσω και στους δημιουργούς καθώς και τους maintainers της γλώσσας προγραμματισμού Julia καθώς και όλων των βιβλιοθηκών που χρησιμοποίησα. Οι πολύ πλούσιες δυνατότητες της όχι μόνο στην ανάλυση δεδομένων, αλλά και στην οπτικοποίηση των αποτελεσμάτων με όμορφα γραφήματα, ήταν σημαντικές για το τελικό αποτέλεσμα το οποίο μπορείτε να δείτε. Έχει ένα εξαιρετικό οικοσύστημα και είναι πολύ εύκολη στην χρήση και είμαι ιδιαίτερα χαρούμενος που την επέλεξα για τον σκοπό αυτόν.

Επίσης όμως θα ήθελα να ευχαριστήσω όλο το εργαστήριο Οργανικής Χημικής Τεχνολογίας, από τα μέλη ΕΔΙΠ κ. Δημήτρη Κουλλά και κ. Λάζαρο Καραογλάνογλου, τον μεταδιδακτορικό ερευνητή Κωνσταντίνο Τζάθα, τους υποψήφιους διδάκτορες Παντελή Μάνακα και Ιωάννα Γουδέλη αλλά και τις φοιτήτριες Ιωάννα Κοροπούλη, Αθανασία Δημητρέλου, Στυλιανή Σταύρου και Νεφέλη Καραγιαννοπούλου που έκαναν τις διπλωματικές τους στο εργαστήριο για την ιδιαίτερα ευχάριστη ατμόσφαιρα που είχε το εργαστήριο, κάτι που έκανε την διεξαγωγή των πειραμάτων της εργασίας μου πολύ πιο ευχάριστη. Τέλος, δεν θα μπορούσα να ολοκληρώσω τις ευχαριστίες χωρίς να πω ευχαριστώ στην οικογένεια και στους φίλους μου, οι οποίοι παρότι δεν έπαιξαν άμεσο ρόλο στην εκπόνηση της εργασίας αυτής, με στηρίζουν καθημερινά με άλλους τρόπους.

# Περιεχόμενα

# Κεφάλαια:

<b>I</b>	<b>Θεωρητικό Μέρος</b>	<b>10</b>
1	Εισαγωγή	11
2	Αναερόβια Χώνευση	17
3	Προεπεξεργασία Υπολειμμάτων Τροφών	19
3.1	Μηχανική Επεξεργασία	19
3.2	Θερμική Επεξεργασία	19
3.3	Επεξεργασία με Μικροκύματα	19
3.4	Επεξεργασία με Υπερήχους	20
3.5	Χημική Επεξεργασία	20
3.6	Ενζυμική Επεξεργασία	20
3.7	Απόκριση της Υδρόλυσης	21
4	Βελτιστοποίηση της Διεργασίας της Ενζυμικής Υδρόλυσης	22
4.1	Εντατικοποίηση της Διεργασίας Υδρόλυσης	22
4.2	Ζύμωση Στερεής Κατάστασης	23
4.3	Παραγωγή Υδρολυτικών Ενζύμων από Βακτήρια	24
5	Οξεογένεση	25
5.1	Μεταβολισμός σακχάρων, αμινοξέων και λιπαρών οξέων	25
5.2	Μεταβολισμός του πυροσταφυλικού οξέος	26
5.3	Άλλα μονοπάτια μεταβολισμού της γλυκόζης	28
5.4	Απόκριση της οξεογένεσης	29
6	Οξικογένεση και Μεθανογένεση	30
6.1	Μηχανισμός Μεθανογένεσης	30
6.2	Θερμοδυναμική Παραγωγής Μεθανίου	30
6.3	Πλεονεκτήματα του Direct Interspecies Electron Transfer στην Μεθανογένεση	33
6.4	Απόκριση της μεθανογένεσης	34
<b>II</b>	<b>Πειραματικό Μέρος</b>	<b>36</b>
7	Υλικά και Μέθοδοι	37
7.1	Υπόστρωμα και Εμβόλιο	37
7.2	Πειραματική διάταξη υδρόλυσης εργαστηριακής κλίμακας	38
7.3	Δοκιμαστικά πειράματα υδρόλυσης	39
7.4	Πειραματικός κύκλος υδρόλυσης	40
7.5	Υδρόλυση σε πιλοτική κλίμακα	41
7.6	Πειραματική διάταξη αναερόβιας χώνευσης	42
7.7	Πειραματικός κύκλος αναερόβιας χώνευσης	43

7.8	Αναλυτικές Μέθοδοι	44
<b>8</b>	<b>Επεξεργασία Αποτελεσμάτων</b>	<b>46</b>
8.1	Δοκιμαστικά πειράματα υδρόλυσης	46
8.2	Βασικός πειραματικός κύκλος υδρόλυσης εργαστηριακής κλίμακας	52
8.3	Έλεγχος Υποθέσεων και Ανάλυση Ευαισθησίας	56
8.4	Πειράματα υδρόλυσης πιλοτικής κλίμακας	60
8.5	Πειράματα αναερόβιας χώνευσης	62
<b>9</b>	<b>Συζήτηση Αποτελεσμάτων</b>	<b>69</b>
9.1	Μεταβολικά Μονοπάτια Οξεογένεσης	69
9.2	Συγκεντρωτικά Κριτήρια Απόδοσης	71
9.3	Ανάλυση Ευαισθησίας	72
9.4	Υδρόλυση σε Πιλοτική Κλίμακα	72
9.5	Αναερόβια Χώνευση	73
<b>10</b>	<b>Συμπεράσματα και Προτάσεις</b>	<b>75</b>
<b>III</b>	<b>Παραρτήματα</b>	<b>86</b>
<b>A</b>	<b>Υπολογιστική Ανάλυση Μεταβολικού Μονοπατιού</b>	<b>87</b>
A.1	Backend της ανάλυσης	87
A.2	Ορισμός του μεταβολικού μονοπατιού	88
A.3	Αλγόριθμος βελτιστοποίησης	88
A.4	Αλγόριθμος βελτιστοποίησης	89
A.5	Ανάλυση αποτελεσμάτων	90
A.6	Συμπεράσματα Ανάλυσης	91

# Περιεχόμενα Σχημάτων:

1.1	Παγκόσμια παραγωγή υπολειμμάτων τροφών ανά τομέα . . . . .	12
1.2	Τεχνολογίες επεξεργασίας απορριμμάτων στην Ευρωπαϊκή Ένωση . . . . .	12
1.3	Προϊόντα του αερίου σύνθεσης . . . . .	13
1.4	Φάσεις της αναερόβιας χώνευσης . . . . .	14
1.5	Παγκόσμια παραγωγή ενέργειας από βιοαέριο . . . . .	14
5.1	Μεταβολικά μονοπάτια κατανάλωσης του πυροσταφυλικού οξέος . . . . .	26
5.2	Μεταβολικά Μονοπάτια της Γλυκόζης . . . . .	28
7.1	Πειραματική Διάταξη Υδρόλυσης Εργαστηριακής Κλίμακας . . . . .	39
7.2	Πειραματική Διάταξη Πιλοτικής Υδρόλυσης . . . . .	41
7.3	Πειραματική Διάταξη Αναερόβιας Χώνευσης . . . . .	42
7.4	Διάταξη για τη μέτρηση της δραστικότητας της αναερόβιας λάσπης . . . . .	43
8.1	Μέτρηση TSS - Δοκιμαστικό Πείραμα 1 . . . . .	47
8.2	Μέτρηση Διαλυτού COD - Δοκιμαστικό Πείραμα 1 . . . . .	47
8.3	Μέτρηση COD - Αρχικό Κινητικό Πείραμα . . . . .	48
8.4	Συνολικά Αποτελέσματα HPLC - Αρχικό Κινητικό Πείραμα. Οι συντελεστές 1, 2 αφορούν την 1η και 2η επανάληψη που έγιναν στο πείραμα . . . . .	49
8.5	Συνολική Συγκέντρωση Σακχάρων - Αρχικό Κινητικό Πείραμα . . . . .	50
8.6	Συνολική Συγκέντρωση Προϊόντων - Αρχικό Κινητικό Πείραμα . . . . .	50
8.7	Ρυθμός Εξάτμισης Νερού - 35 °C . . . . .	51
8.8	Μεταβολή του sCOD κατά την υδρόλυση/ζύμωση - Πείραμα 35 °C . . . . .	52
8.9	Αποτελέσματα ανάλυσης HPLC για διαφορετικές συγκεντρώσεις μιξ σε θερμοκρασία 35 °C. . . . .	53
8.10	Συνολική Συγκέντρωση Σακχάρων - Πείραμα 35 °C . . . . .	53
8.11	Συνολική Συγκέντρωση Προϊόντων - Πείραμα 35 °C . . . . .	54
8.12	Μεταβολή του sCOD κατά την υδρόλυση/ζύμωση - Πείραμα 40 °C . . . . .	54
8.13	Αποτελέσματα ανάλυσης HPLC για διαφορετικές συγκεντρώσεις μιξ σε θερμοκρασία 40 °C. . . . .	55
8.14	Συνολική Συγκέντρωση Σακχάρων - Πείραμα 40 °C . . . . .	55
8.15	Συνολική Συγκέντρωση Προϊόντων - Πείραμα 40 °C . . . . .	56
8.16	Ολική Ανάλυση Ευαισθησίας . . . . .	58
8.17	Ανάλυση Ευαισθησίας στην περιοχή 2-8 mL μιξ . . . . .	59
8.18	Ανάλυση ευαισθησίας σε διακριτές θερμοκρασίες . . . . .	59
8.19	COD Υδρολυμάτων για προετοιμασία Αναερόβιας Χώνευσης . . . . .	62
8.20	Παραγωγή Μεθανίου από Εργαστηριακά Υδρολύματα - Λάσπη 1 . . . . .	63
8.21	Παραγωγή Μεθανίου από Υδρολύματα - Λάσπη 1 (Επανάληψη) . . . . .	64
8.22	Παραγωγή Μεθανίου από Εργαστηριακά Υδρολύματα - Λάσπη 2 . . . . .	66
8.23	Παραγωγή Μεθανίου από Πιλοτικά Υδρολύματα - Λάσπη 2 . . . . .	67
8.24	Παραγωγή Μεθανίου από Πιλοτικά Υδρολύματα - Λάσπη 3 . . . . .	68



9.1	Προϊόντα της οξειγενούς ζύμωσης . . . . .	70
9.2	Οξίνιση των Αντιδραστήρων . . . . .	71
9.3	Απόδοση μετατροπής σακχάρων σε οξειγενή προϊόντα . . . . .	72
A.1	Διάγραμμα Προβλεπόμενου Μεταβολικού Δικτύου . . . . .	91
A.2	Ποσοστό γλυκόζης στην ετερογαλακτική ζύμωση . . . . .	92
A.3	Παραγωγή Προπιονικού - 35 C . . . . .	92
A.4	Παραγωγή Προπιονικού - 40 C . . . . .	93
A.5	Μεταβολισμός του Πυροσταφυλικού Οξέος . . . . .	94
A.6	Κατανάλωση πυροσταφυλικού οξέος από τους ιθαγενής μικροοργανισμούς . . . . .	95

## Περιεχόμενα Πινάκων:

7.1	Χαρακτηριστικά Υπολειμμάτων Τροφών . . . . .	37
7.2	Χαρακτηριστικά Λάσπης . . . . .	38
8.1	Ρυθμός Μεταβολής Υγρής και Ξηρής Μάζας . . . . .	51
8.2	Υδρόλυση Πιλοτικής Κλίμακας - Αναλύσεις Πρώτου Κύκλου . . . . .	60
8.3	Υδρόλυση Πιλοτικής Κλίμακας - Κατανάλωση ΥΤ Πρώτου Κύκλου . . . . .	60
8.4	Υδρόλυση Πιλοτικής Κλίμακας - Αναλύσεις Δεύτερου Κύκλου . . . . .	61
8.5	Υδρόλυση Πιλοτικής Κλίμακας - Κατανάλωση ΥΤ Πρώτου Κύκλου . . . . .	61
8.6	Υδρόλυση Πιλοτικής Κλίμακας - Αναλύσεις Τρίτου Κύκλου . . . . .	61
8.7	Υδρόλυση Πιλοτικής Κλίμακας - Κατανάλωση ΥΤ Τρίτου Κύκλου . . . . .	62
8.8	Κινητικές Σταθερές Παραγωγής Μεθανίου για Εργαστηριακά Υδρολύματα με Λάσπη 1 . . . . .	64
8.9	Κινητικές Σταθερές Παραγωγής Μεθανίου για Υδρολύματα με Λάσπη 1 (Επανάληψη) . . . . .	64
8.10	Τελικό pH Αντιδραστήρων Αναερόβιας Χώνευσης με Λάσπη 1 . . . . .	65
8.11	Κινητικές Σταθερές Παραγωγής Μεθανίου για Εργαστηριακά Υδρολύματα με Λάσπη 2 . . . . .	66
8.12	Τελικό pH Αντιδραστήρων Αναερόβιας Χώνευσης με Λάσπη 2 . . . . .	67
8.13	Κινητικές Σταθερές Παραγωγής Μεθανίου για Πιλοτικά Υδρολύματα με Λάσπη 2 . . . . .	67
8.14	Κινητικές Σταθερές Παραγωγής Μεθανίου για Πιλοτικά Υδρολύματα με Λάσπη 3 . . . . .	68
A.1	Πρόβλεψη Μεταβολικού Μονοπατιού - Πίνακας 1 . . . . .	90
A.2	Πρόβλεψη Μεταβολικού Μονοπατιού - Πίνακας 2 . . . . .	90

# Συντομογραφίες

- CO<sub>2</sub>-eq** ισοδύναμο διοξειδίου του άνθρακα. 11
- ABE** ζύμωση ακετόνης-βουτανόλης-αιθανόλης. 28
- Acetyl-CoA** ακέτυλο συνένζυμο Α. 25–27, 29, 33, 69
- AM** ακετοκλαστικοί μεθανογόνοι. 30
- ANOVA** analysis of variance - ανάλυση διακύμανσης. 56, 57
- BMP** biochemical methane potential - βιοχημικό δυναμικό μεθανίου. 34, 43, 67
- COD** chemical oxygen demand - χημικά απαιτούμενο οξυγόνο. 22, 29, 37, 41, 44, 45, 48, 52, 60–63, 73, 75, 76
- DIET** direct interspecies electron transfer - απευθείας διαστοιχειακή μεταφορά ηλεκτρονίων. 33, 34
- ED** μεταβολικό μονοπάτι Entner-Doudoroff. 28
- EMP** μονοπάτι Embden-Meyerhof. 25, 28
- FAO** Οργανισμός Τροφίμων και Αγρονομίας των Ηνωμένων Πολιτειών. 11
- Fd** ferredoxins. 27
- HPLC** high performance liquid chromatography - υγρή χρωματογραφία υψηλής απόδοσης. 45, 48
- HRT** hydraulic retention time - υδραυλικός χρόνος παραμονής. 17
- IHT** interspecies hydrogen transfer - διαστοιχειακή μεταφορά υδρογόνου. 33
- LCFA** λιπαρά οξέα μακριάς ανθρακικής αλυσίδας - long chain fatty acids. 25
- MCFA** λιπαρά οξέα μέτριας ανθρακικής αλυσίδας - medium chain fatty acids. 76
- NAD<sup>+</sup>** nicotinamide adenine dinucleotide. 27, 32
- NADH** nicotinamide adenine dinucleotide hydrogen. 25–27, 32
- OLR** organic loading rate - ρυθμός οργανικής φόρτισης. 18, 34
- ORP** redox potential - οξειδοαναγωγικό δυναμικό. 25, 27

- PHAs** polyhydroxyalkanoates - πολυ-υδροξύαλκανοϊκοί εστέρες. 76
- PI** Process Intensification - Εντατικοποίηση Διεργασιών. 22
- PK** μεταβολικό μονοπάτι Phosphoketolase. 28, 29, 69
- PLA** πολυγαλακτικό οξύ. 13
- PP** μεταβολικό μονοπάτι Pentose Phosphate. 28
- redox** οξειδωαναγωγικό δυναμικό. 27, 31, 69, 70
- S/I** υποστρώματος προς εμβόλιο. 44, 74
- sCOD** διαλυτό COD. 21, 29, 37, 39, 40, 42, 44–46, 52, 54, 61, 62, 71, 73
- SMA** sludge methanogenic activity - ειδική μεθανογόνος δραστηριότητα της λάσπης. 43, 63, 65, 67, 68, 73
- SS** suspended solids - αιωρούμενα στερεά. 39, 40, 44
- SSF** Solid State Fermentation - Ζύμωση στερεής κατάστασης. 23, 24
- syngas** αέριο σύνθεσης. 13
- tCOD** ολικό COD. 21, 42, 45, 60, 62
- TRL** technology readiness level - δείκτης ετοιμότητας τεχνολογίας. 13, 15, 23, 75
- TS** total solids - ολικά στερεά. 22, 42, 44, 50
- TSS** ολικά αιωρούμενα στερεά. 46
- tVFAs** συνολικά πτητικά λιπαρά οξέα. 29
- UASB** upflow anaerobic sludge blanket - αντιδραστήρας ανοδικής ροής διαμέσου στρώσης ιλύος. 18, 38
- VFAs** volatile fatty acids - πτητικά λιπαρά οξέα. 13, 15, 17, 26, 34, 40, 49, 76
- VS** volatile solids - πτητικά στερεά. 42, 44
- VSS** πτητικά αιωρούμενα στερεά. 46
- YM** υδρογονοτρόφοι μεθανογόνοι. 30, 34
- ZVI** zero valent iron - σίδηρος μηδενικού σθένους. 31, 34
- AX** αναερόβια χώνευση. 13, 15, 16, 19, 22–26, 28, 30–32, 38, 42, 62, 71, 74–76
- ΔG** μεταβολή ελεύθερης ενέργειας Gibbs. 27, 30–33
- ΚΕΛ** κέντρο επεξεργασίας λυμάτων. 38
- ΥΤ** υπολείμματα τροφών. 11, 13, 15, 16, 19–24, 29, 32, 34, 37, 39–42, 44, 52, 60, 61, 65, 67, 69, 73–76
- ΧΥΤΑ** Χώρος Υγειονομικής Ταφής Απορριμάτων. 11, 75
- μιξ** σκεύασμα ενζύμων και μικροοργανισμών. 15, 16, 37, 40–42, 44, 52, 53, 56, 57, 60, 65, 71–74, 76

Μέρος Ι  
Θεωρητικό Μέρος

# Κεφάλαιο 1

## Εισαγωγή

Τα υπολείμματα τροφών (ΥΤ) αποτελούν ένα σημαντικό πρόβλημα στις σύγχρονες κοινωνίες. Ο Οργανισμός Τροφίμων και Αγρονομίας των Ηνωμένων Πολιτειών (FAO) υπολογίζει πως περίπου το 1/3 της παγκόσμιας παραγωγής τροφών ετησίως (1.3 δις τόνοι) χάνεται κατά την παραγωγική διαδικασία ή απορρίπτεται <sup>1</sup>.

Η μη ορθή διαχείριση των αποβλήτων αυτών επιβαρύνει κάθε έναν από τους τρεις πυλώνες της βιωσιμότητας. Συγκεκριμένα, έχει προσδιοριστεί πως το ισοδύναμο διοξειδίου του άνθρακα (CO<sub>2</sub>-eq) που παράγεται λόγω της μη ορθής αυτής διαχείρισης των υπολειμμάτων ανέρχεται στους 3.3 δις τόνους <sup>2</sup>. Ακόμη, έχει βρεθεί πως τα υπολείμματα τροφών που οφείλονται μόνο στην απόρριψη τροφών από καταναλωτές σε ανεπτυγμένες χώρες είναι σχεδόν όσα παράγουν οι υποσαχάρειες και αφρικανικές χώρες συνολικά (περίπου 230 εκατομμύρια) <sup>1</sup>. Οπότε η αποφυγή της δημιουργίας τόσων υπολειμμάτων - ή η καλύτερη αξιοποίηση τους - θα μπορούσε να λύσει πολλά προβλήματα υποσιτισμού. Ακόμη και στον οικονομικό τομέα, δημιουργούνται σοβαρά προβλήματα από την ανεξέλεγκτη αυτή απόρριψη καθώς η καθαρή αξία των τροφών που χάνονται ή απορρίπτονται σε κάποιο σημείο της εφοδιαστικής αλυσίδας είναι 936 δις δολάρια ανά έτος με ελάχιστο κέρδος, καθώς πολύ μικρές ποσότητες των υπολειμμάτων αυτών αξιοποιούνται <sup>1</sup>.

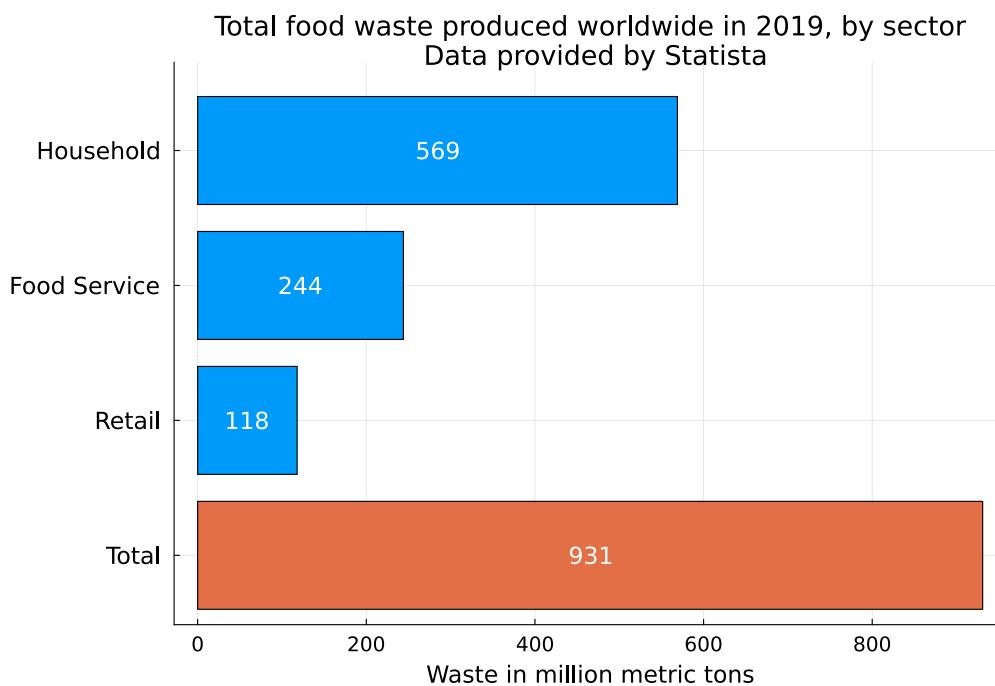
Μία από τις βασικότερες υποκατηγορίες ΥΤ είναι τα οικιακά ΥΤ, τα οποία αποτελούν το μεγαλύτερο κομμάτι της παγκόσμιας παραγωγής ΥΤ (περίπου 61%) <sup>3</sup>. Στο Σχήμα 1.1 φαίνεται η παγκόσμια παραγωγή ΥΤ ανά τομέα.

Η Ελλάδα είναι η χώρα με την δεύτερη μεγαλύτερη παραγωγή οικιακών ΥΤ κατά κεφαλήν παγκοσμίως (142 κιλά/άτομο ετησίως) <sup>3</sup>. Η παραγωγή ΥΤ, ειδικά στον τομέα της κατανάλωσης, όπου βρίσκονται τα οικιακά υπολείμματα, καθώς και αυτά της εστίασης, είναι πολύ συχνά αναπόφευκτη. Οπότε, παρόλο που με πιο σωστές πρακτικές θα μπορούσαν να παράγονται λιγότερα υπολείμματα, η ανάπτυξη τεχνολογιών αξιοποίησης των ΥΤ είναι πάρα πολύ σημαντικές. Οι τεχνολογίες αυτές θα πρέπει να είναι εύκολα εφαρμόσιμες και οικονομικές, ενώ η κλιμάκωση τους να είναι εφικτή.

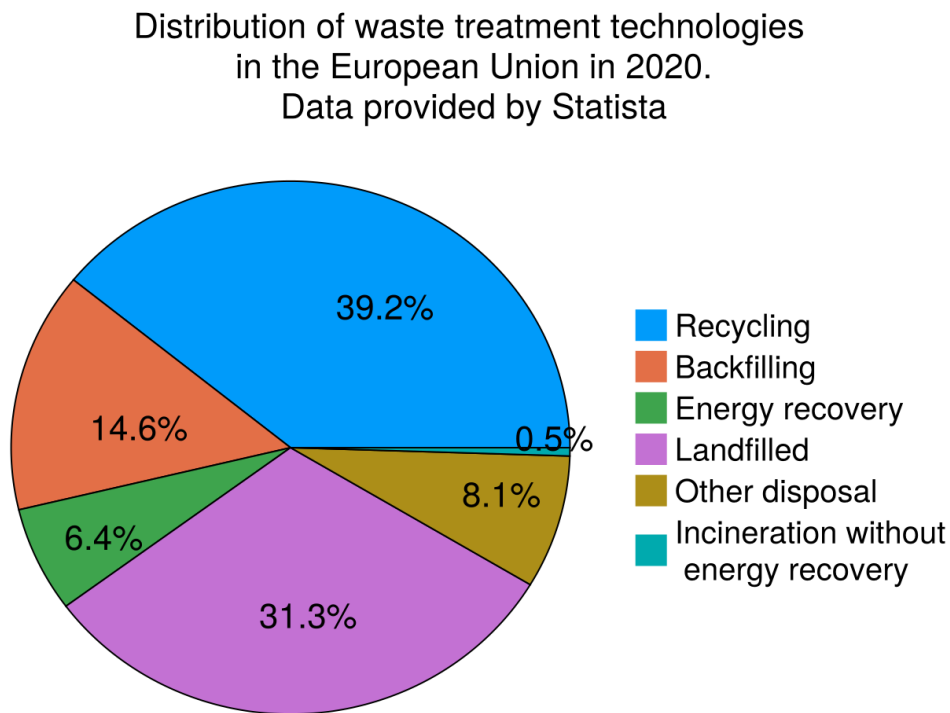
Η αγορά της διαχείρισης αποβλήτων είναι αρκετά μεγάλη (υπολογίζεται περίπου στα 1293 δις δολάρια ετησίως από μία μελέτη του 2022), ενώ προβλέψεις λένε πως θα φτάσει τα 2000 δις μέχρι το 2030. Κομμάτι της ανάπτυξης αυτής, θα πρέπει να είναι και η ανάπτυξη βιώσιμων τεχνολογιών αξιοποίησης απορριμμάτων, καθώς αυτή την στιγμή, με εξαίρεση τα απορρίμματα τα οποία είναι ανακυκλώσιμα, οι βασικές τεχνολογίες που εφαρμόζονται είναι η ανάκτηση ενέργειας μέσω καύσης και η διάθεση των απορριμμάτων σε Χώρους Υγειονομικής Ταφής Απορριμμάτων (ΧΥΤΑ) όπως φαίνεται και στο Σχήμα 1.2 <sup>3</sup>.

Οι τεχνολογίες αυτές χρησιμοποιούνται επειδή είναι πολύ απλές και έχουν χαμηλό κόστος. Στα πλαίσια όμως της βιώσιμης ανάπτυξης και της κυκλικής οικονομίας, πρέπει τα απορρίμματα να εξετάζονται ως μία νέα πρώτη ύλη, από την οποία μπορούν να διυλιστούν προϊόντα αυξημένης αξίας.

Αυτές οι τεχνολογίες μπορεί να είναι θερμικές, όπως η πυρόλυση <sup>4,5</sup> η οποία παράγει ένα

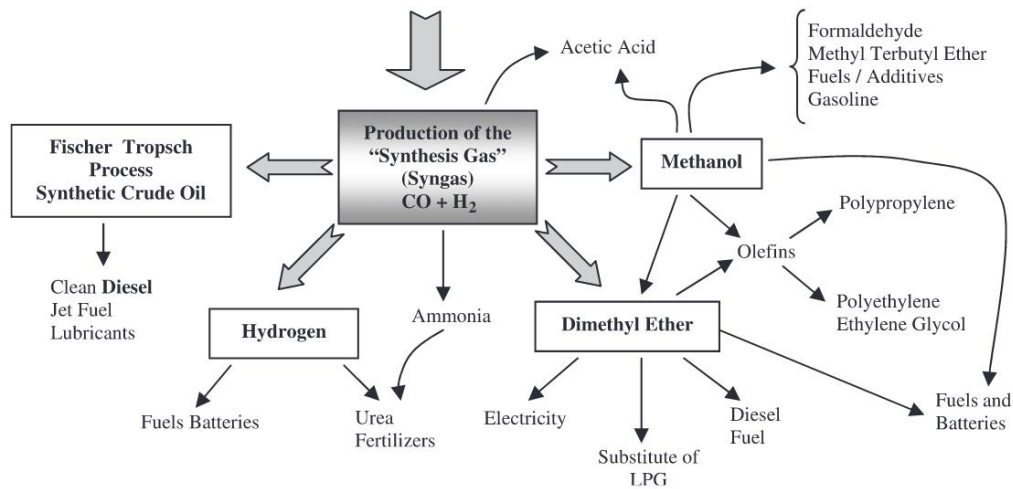


Σχήμα 1.1: Παγκόσμια παραγωγή υπολειμμάτων τροφών ανά τομέα <sup>3</sup>



Σχήμα 1.2: Τεχνολογίες επεξεργασίας απορριμμάτων στην Ευρωπαϊκή Ένωση <sup>3</sup>

προϊόν γνωστό ως biochar, το οποίο έχει πολύ χρήσιμες ιδιότητες <sup>6,7</sup>, ή η αεριοποίηση <sup>5,8</sup>, η οποία παράγει ένα μίγμα υδρογόνου και μονοξειδίου του άνθρακα γνωστό ως **αέριο σύνθεσης (syngas)**, το οποίο μπορεί να χρησιμοποιηθεί ως πρώτη ύλη για πολλά προϊόντα. Στο Σχήμα 1.3 φαίνονται οι πιο συνηθισμένες εφαρμογές του αερίου σύνθεσης <sup>9</sup>



Σχήμα 1.3: Προϊόντα του αερίου σύνθεσης <sup>9</sup>

Εκτός από θερμικές τεχνολογίες, υπάρχει μεγάλο ενδιαφέρον στις βιολογικές τεχνολογίες. Αυτές μπορεί να είναι αερόβιες, όπως η κομποστοποίηση, η οποία παράγει ένα εδαφοβελτιωτικό προϊόν <sup>10</sup>, ή αναερόβιες όπως η αναερόβια χώνευση, η οποία έχει ως κύριο προϊόν το βιοαέριο, ένα μείγμα μεθανίου και διοξειδίου του άνθρακα που μπορεί να χρησιμοποιηθεί ως βιοκαύσιμο <sup>11,12</sup>, ή διάφορες διεργασίες ζύμωσης. Σε αυτές υπάγονται η αλκοολική ζύμωση, μία από τις πιο ευρέως χρησιμοποιούμενες τεχνολογίες αξιοποίησης απορριμμάτων <sup>13,14</sup>, η σκοτεινή ζύμωση για την παραγωγή υδρογόνου <sup>15,16</sup>, ή οι ζυμώσεις με σκοπό την παραγωγή μονομερών για βιοπολυμερή όπως το **πολυγαλακτικό οξύ (PLA)** <sup>17,18</sup>.

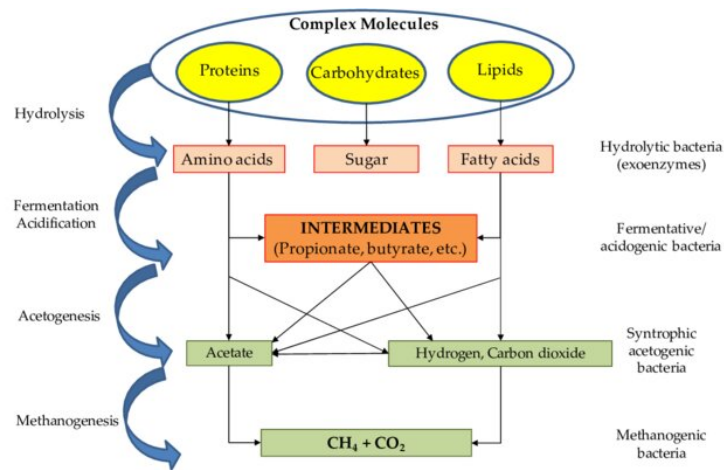
Η παρούσα μελέτη θα εστιάσει στην **αναερόβια χώνευση (AX)**, καθώς είναι μία τεχνολογία με μεγάλο δείκτη ετοιμότητας **technology readiness level - δείκτης ετοιμότητας τεχνολογίας (TRL)** <sup>19</sup>, η οποία έχει εφαρμοστεί επιτυχώς σε μεγάλη κλίμακα, είναι οικονομική και φιλική προς το περιβάλλον <sup>20</sup>.

Η **AX** είναι μία αναερόβια βιολογική διεργασία η οποία διακρίνεται σε 4 στάδια. Στο πρώτο στάδιο, το αρχικό υπόστρωμα της διεργασίας, το οποίο συχνά αποτελείται από περίπλοκα πολυμερή όπως οι υδατάνθρακες, οι πρωτεΐνες και τα λιπίδια, υδρολύονται σε απλούστερες ενώσεις. Αυτές μπορούν να χρησιμοποιηθούν από τα οξεογόνα βακτήρια τα οποία τα μετατρέπουν σε **volatile fatty acids - πτητικά λιπαρά οξέα (VFAs)** όπως το οξικό οξύ, το προπιονικό οξύ, το βουτυρικό οξύ ή το γαλακτικό οξύ και σε αλκοόλες όπως η αιθανόλη. Στο 3ο στάδιο, οι ενώσεις αυτές μετατρέπονται σε οξικό οξύ, υδρογόνο και διοξείδιο του άνθρακα κατά την διεργασία της οξικογένεσης, ενώ τελικά, το οξικό οξύ μετατρέπεται σε μεθάνιο από μία κατηγορία μεθανογόνων μικροοργανισμών ενώ το υδρογόνο και το διοξείδιο του άνθρακα μετατρέπονται σε μεθάνιο από μία άλλη κατηγορία μεθανογόνων. Τα στάδια αυτά φαίνονται και στο Σχήμα 1.4 <sup>21</sup>.

Καθώς τα **ΥΤ** είναι πλούσια σε εύκολα αποδομήσιμη οργανική ύλη, αποτελούν ένα πολύ καλό υπόστρωμα για **AX**. Ακόμη, έχουν θρεπτικά στοιχεία όπως το άζωτο, με αποτέλεσμα να έχουν έναν υψηλό λόγο C/N, ο οποίος είναι καθοριστικός για την **AX** <sup>11</sup>.

Επιπροσθέτως, η **AX** λύνει και άλλο ένα από τα σημαντικά προβλήματα του 21ου αιώνα, το οποίο είναι η ενέργεια. Αυτή τη στιγμή, πάνω από το 80% της ενέργειας που καταναλώνεται παγκοσμίως βασίζεται σε μη ανανεώσιμες πηγές όπως το πετρέλαιο και το φυσικό αέριο. Οι ενεργειακές απαιτήσεις παγκοσμίως έχουν μία συνεχή αύξηση, ενώ οι πρώτες ύλες αυτές

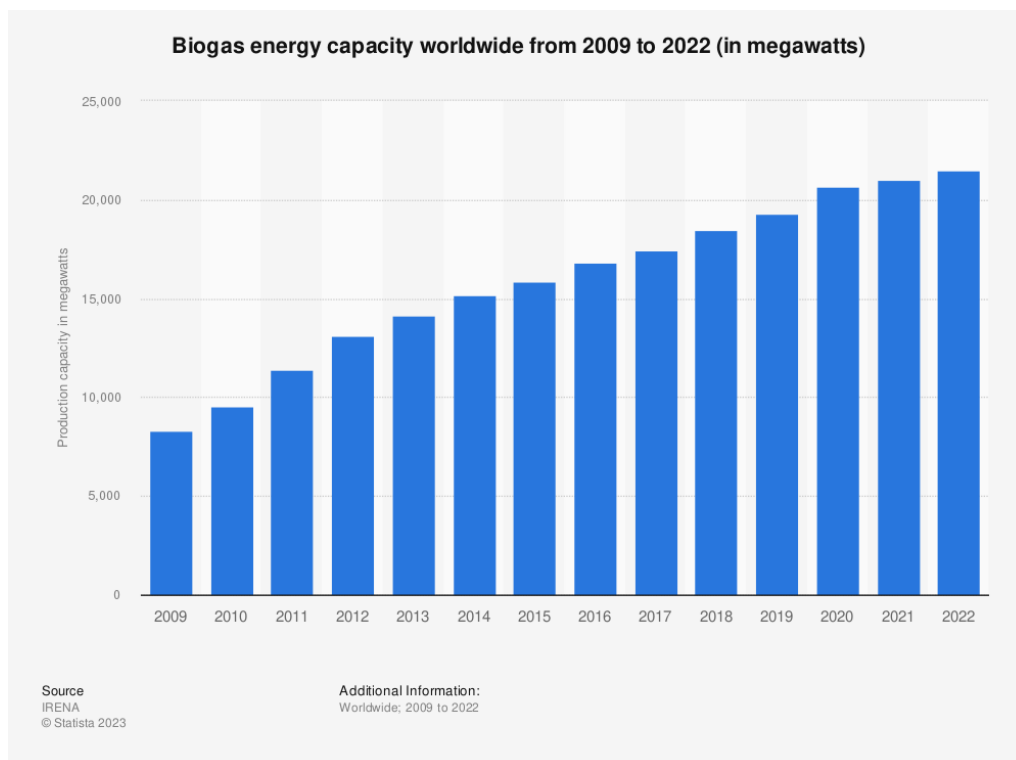




Σχήμα 1.4: Φάσεις της αναερόβιας χώνευσης <sup>21</sup>

εξαλείφονται <sup>3</sup>. Οπότε, τεχνολογίες παραγωγής ενέργειας από ανανεώσιμες πηγές, οι οποίες να έχουν το δυναμικό να αντικαταστήσουν τις πηγές αυτές, θα γίνουν απαραίτητες τα επόμενα χρόνια. Οι περισσότερες τεχνολογίες ανανεώσιμης ενέργειας (πχ αιολική, ηλιακή ή υδροηλεκτρική ενέργεια) έχουν δυσκολία να φτάσουν τέτοια επίπεδα και για αυτό χρησιμοποιούνται επικουρικά σε μία κύρια πηγή ενέργειας (αυτή τη στιγμή, περίπου το 30% της παγκόσμιας παραγωγής ηλεκτρισμού οφείλεται σε τέτοιες πηγές) <sup>3</sup>. Τα υπολείμματα τροφών από την άλλη είναι άφθονα οπότε θεωρείται πως με μία αποτελεσματική επεξεργασία θα μπορέσουν να καλύψουν ένα πολύ σημαντικό ποσοστό της παγκόσμιας ανάγκης σε ενέργεια.

Στο Σχήμα 1.5 φαίνεται η παγκόσμια παραγωγή ενέργειας από βιοαέριο τα τελευταία 15 χρόνια, η οποία έχει ραγδαία αύξηση. Παρόλα αυτά, αποτελεί μόνο ένα 0.28% της παγκόσμιας παραγωγής ενέργειας <sup>3</sup>.



Σχήμα 1.5: Παγκόσμια παραγωγή ενέργειας από βιοαέριο <sup>3</sup>

Βέβαια, η **AX** έχει και κάποια σημαντικά προβλήματα. Ένας από τους βασικότερους περιορισμούς της είναι η ευαισθησία των μεθανογόνων μικροοργανισμών. Οι μικροοργανισμοί αυτοί μπορούν να λειτουργήσουν σε ένα μικρό εύρος θερμοκρασίας και pH, οπότε η λειτουργία της **AX** επιλέγεται με βάση αυτό. Αυτό όμως οδηγεί στην λιγότερο αποτελεσματική διεξαγωγή των υπόλοιπων σταδίων. Το κυριότερο πρόβλημα που δημιουργείται είναι πως η υδρόλυση γίνεται σε πολύ αργό ρυθμό, καθιστώντας την το περιοριστικό στάδιο της **AX**. Αντίστοιχα, επιβραδύνεται και η οξεογένεση. Όμως, καθώς η οξεογένεση είναι γενικά γρήγορη, το κύριο πρόβλημα σε αυτήν δεν είναι ο ρυθμός αλλά η επίδραση που υπάρχει στα μεταβολικά προϊόντα. Στις συνθήκες που επιλέγονται δεν ευνοούνται τα ιδανικά προϊόντα της οξεογένεσης (πχ οξικό οξύ). Ακόμη και με την επιβράδυνση του ρυθμού, καθώς η μεθανογένεση είναι γενικά αργή, σε ορισμένες περιπτώσεις, ο ρυθμός της οξεογένεσης ξεπερνάει αυτόν της μεθανογένεσης, με αποτέλεσμα να παράγονται υπερβολικές ποσότητες από **VFAs**. Αυτό οδηγεί σε οξίνιση του αντιδραστήρα και κατάρρευση της διεργασίας καθώς οι μεθανογόνοι δεν μπορούν να λειτουργήσουν σε χαμηλές τιμές pH, το οποίο είναι ένα ακόμη σημαντικό πρόβλημα της διεργασίας <sup>5,22,23</sup>.

Ένας τρόπος να επιλυθεί το πρόβλημα αυτό είναι ο διαχωρισμός των σταδίων της υδρόλυσης και της ζύμωσης, σε μία διεργασία δύο <sup>24</sup> ή τριών <sup>25</sup> σταδίων. Αυτό που πετυχαίνεται με τον διαχωρισμό αυτόν είναι να λειτουργούν όλα τα στάδια της διεργασίας στο βέλτιστο σημείο λειτουργίας τους και άρα να είναι πολύ πιο αποτελεσματικά. Επιπροσθέτως, ο αντιδραστήρας δεν οξινίζεται κατά την διάρκεια της μεθανογένεσης, με αποτέλεσμα η διεργασία να είναι πολύ πιο σταθερή. Όμως, υπάρχει το πρόβλημα πως οι διεργασίες αυτές έχουν υψηλότερο κόστος, λόγω του επιπλέον εξοπλισμού, αλλά και πολυπλοκότητας της διεργασίας. Για τον λόγο αυτόν, η διεργασία αναερόβιας χώνευσης πολλαπλών σταδίων έχει πολύ χαμηλότερο **TRL** και δεν έχει εφαρμοστεί ευρέως σε μεγάλη κλίμακα <sup>5,11,22,26</sup>.

Η υδρόλυση αποτελεί σημαντικό στάδιο της επεξεργασίας **YT**. Αυτή μπορεί να γίνει θερμικά, μηχανικά, χημικά ή ενζυμικά <sup>11,27,28</sup>. Συνήθως η υδρόλυση γίνεται ενζυμικά καθώς έχει καταγραφεί πως επιφέρει τις υψηλότερες αποδόσεις και δεν παράγει προϊόντα τοξικά για τους μικροοργανισμούς. Ακόμη, είναι η μόνη που μπορεί να γίνει παράλληλα με την οξεογένεση για την περίπτωση της αναερόβιας χώνευσης σε 2 στάδια <sup>11,29,30</sup>. Παρόλα αυτά, το υψηλό κόστος των ενζύμων καθιστά αυτή την τεχνολογία απαγορευτική σε μεγάλη κλίμακα. Γι αυτό, πραγματοποιείται παγκοσμίως αρκετή έρευνα γύρω από τεχνολογίες μείωσης του κόστους της ενζυμικής υδρόλυσης για την πιο αποτελεσματική λειτουργία της διεργασίας αυτής <sup>18,31-33</sup>. Μια υποσχόμενη και οικονομική λύση είναι η χρήση σκευασμάτων τα οποία περιέχουν ένα μείγμα ενζύμων και μικροοργανισμών. Συνήθως οι μικροοργανισμοί που χρησιμοποιούνται είναι φυσικής προέλευσης από κάποιο περιβαλλοντικό οικοσύστημα και έχουν επιλεχθεί για την ικανότητα τους να διασπούν αποτελεσματικά ενώσεις όπως η κυτταρίνη, το άμυλο, οι πρωτεΐνες και τα λιπίδια. Αυτοί οι μικροοργανισμοί ενεργοποιούνται ταχύτατα και εκκρίνουν υδρολυτικά ένζυμα, με αποτέλεσμα να μπορούν να υδρολύσουν πολύ αποτελεσματικά ένα υπόστρωμα όπως τα **YT**. Ταυτόχρονα, γίνεται μία ζύμωση από τους μικροοργανισμούς, για παραγωγή χρήσιμων προϊόντων, όπως η αιθανόλη και τα **VFAs**. Αυτά μπορούν να ανακτηθούν ως έχουν, ή να χρησιμοποιηθούν σε διάφορες βιοδιεργασίες, όπως η **AX**. Ένα τέτοιο υπόστρωμα μπορεί να βελτιώσει την σταθερότητα μίας αναερόβιας χώνευσης αφού περιορίζονται τα στάδια της υδρόλυσης και οξεογένεσης και ευνοείται η δράση των μεθανογόνων μικροοργανισμών <sup>5</sup>. Συνήθως, τα σκευάσματα αυτά χρησιμοποιούνται για την ταχεία έναρξη βιολογικών συστημάτων όπως η ενεργός ιλύς, ή για καθαρισμό σωλήνων/βόθρων από λύματα, αλλά η χρήση τους ως υδρολυτικό σκεύασμα για υποστρώματα όπως τα **YT** είναι μία καινοτόμα επιλογή για την μείωση του κόστους της υδρόλυσης καθώς η τιμή ενός τέτοιου σκευάσματος είναι αρκετά χαμηλή (πχ 25 € ανά κιλό).

Ο σκοπός της παρούσας μελέτης είναι αρχικά να κάνει μία βιβλιογραφική ανασκόπηση των τεχνολογιών **AX** σε πολλαπλά στάδια. Με βάση αυτήν θα αναπτυχθεί μία διεργασία αξιοποίησης υπολειμμάτων τροφίμων, αξιοποιώντας ένα **σκεύασμα ενζύμων και μικροοργαν-**

ισμών (μιξ), η οποία να είναι οικονομικά βιώσιμη και ταυτόχρονα αποτελεσματική. Αρχικά, θα αξιολογηθεί η ποιότητα της υδρόλυσης καθώς και της οξεογένεσης κατά την διεργασία αυτή σε εργαστηριακή κλίμακα, όπου υπάρχει η δυνατότητα ελέγχου πολλαπλών παραμέτρων όπως η θερμοκρασία και η ποσότητα του μιξ. Έπειτα, θα εξεταστεί η κλιμάκωση της διεργασίας σε πιλοτική κλίμακα εξετάζοντας την ποσότητα του μιξ και την παροχή νερού ως λειτουργικές παραμέτρους. Τέλος, θα διερευνηθεί η δυνατότητα αξιοποίησης της παραγόμενης υγρής εκροής για την παραγωγή μεθανίου σε αναερόβιους αντιδραστήρες εργαστηριακής κλίμακας.

Η δομή της εργασίας έχει ως εξής: Στο πρώτο μέρος πραγματοποιείται μία βιβλιογραφική ανασκόπηση, η οποία χωρίζεται σε 5 κεφάλαια. Αρχικά, στο **Κεφάλαιο 2** θα γίνει μία πιο αναλυτική παρουσίαση της **ΑΧ** και των προβλημάτων που δημιουργούνται αν όλα τα στάδια γίνονται ταυτόχρονα. Σκοπός αυτού είναι η ανάδειξη της σημασίας της **ΑΧ** σε πολλαπλά στάδια. Έτσι, τα επόμενα κεφάλαια θα εστιάσουν στα στάδια της **ΑΧ** αν αυτά διεξαχθούν ξεχωριστά. Στο **Κεφάλαιο 3** θα αναλυθούν όλες οι μέθοδοι προ-επεξεργασίας υπολειμμάτων τροφών που έχουν βρεθεί στην βιβλιογραφία για να υδrolύσουν πιο αποτελεσματικά τα **ΥΤ**, με τα πλεονεκτήματα και τα μειονεκτήματά τους, ενώ στο **Κεφάλαιο 4** θα δοθεί ιδιαίτερη έμφαση στην ενζυμική υδρόλυση, και στις προσπάθειες μείωσης του κόστους αυτής. Το **Κεφάλαιο 5** θα εστιάσει στην οξεογένεση και θα αναφέρει όλα τα διαθέσιμα μεταβολικά μονοπάτια αυτής και πως καθορίζεται ποιο θα επικρατήσει με βάση τις λειτουργικές συνθήκες. Ακόμη, θα αναφερθεί η χρησιμότητα του κάθε μεταβολικού προϊόντος για την **ΑΧ** για να αποφανθεί το βέλτιστο μεταβολικό μονοπάτι. Τέλος, στο **Κεφάλαιο 6** θα μελετηθούν η οξικογένεση και η μεθανογένεση. Τα 2 αυτά στάδια δεν θα διαχωριστούν, καθώς στην πράξη, το ένα εξαρτάται από το άλλο και γίνονται συνεργιστικά.

Έχοντας τις πληροφορίες αυτές, μπορεί στο δεύτερο μέρος, να γίνει μία ανάλυση των πειραματικών αποτελεσμάτων της εργασίας και να προκύψουν κάποια συμπεράσματα από αυτά. Συγκεκριμένα, στο **Κεφάλαιο 7** θα αναλυθούν οι πειραματικές διαδικασίες που χρησιμοποιήθηκαν καθώς και οι πρώτες ύλες που χρειάστηκαν. Στο **Κεφάλαιο 8** θα αναφερθούν τα πρωτογενή αποτελέσματα κάθε πειραματικού κύκλου, αλλά και πως αυτά αναλύθηκαν με σκοπό στο **Κεφάλαιο 9** να γίνει μία συζήτηση των αποτελεσμάτων αυτών καθώς και η παράθεση κάποιων συγκριτικών αποτελεσμάτων, από τα οποία θα προκύψουν άμεσα και τα συμπεράσματα της εργασίας, τα οποία θα παρατεθούν στο **Κεφάλαιο 10** μαζί με κάποιες προτάσεις για περαιτέρω έρευνα στο αντικείμενο αυτό.

## Κεφάλαιο 2

# Αναερόβια Χώνευση

Η αναερόβια χώνευση είναι μία αναερόβια βιολογική διεργασία η οποία μετατρέπει περίπλοκη οργανική ύλη σε μεθάνιο και διοξείδιο του άνθρακα με βάση τον μηχανισμό του σχήματος 1.4. Η διεργασία αυτή έχει πολλά πλεονεκτήματα, όπως η απλότητα της λειτουργίας, το χαμηλό σχετικά λειτουργικό κόστος (χρειάζεται μόνο η διατήρηση της θερμοκρασίας σε ένα σταθερό επίπεδο) και την παραγωγή ενός πολύ αποτελεσματικού ενεργειακού φορέα, του μεθανίου<sup>27</sup>. Για αυτούς τους λόγους μάλιστα έχει δει ραγδαία ανάπτυξη τα τελευταία χρόνια<sup>3</sup>.

Όμως, παραμένει περιορισμένη σε μεγάλο βαθμό από τα λειτουργικά της προβλήματα<sup>27</sup>. Αρχικά, είναι μία αργή διεργασία. Αυτό οφείλεται εν μέρει στους μεθανογόνους μικροοργανισμούς, οι οποίοι χρειάζονται ένα μεγάλο **hydraulic retention time - υδραυλικός χρόνος παραμονής (HRT)** για να μπορέσουν να αναπτυχθούν και να μην εκπλυθούν. Αλλά, για τα περισσότερα υποστρώματα, το περιοριστικό στάδιο της διεργασίας είναι η υδρόλυση και διαλυτοποίηση, δηλαδή η διάσπαση των στερεών και μακρομερών σωματιδίων σε διαλυτές ενώσεις, οι οποίες μπορούν να μεταβολιστούν. Στην περίπτωση των υπολειμμάτων τροφών, ένα μεγάλο ποσό της οργανικής ύλης βρίσκεται σε σωματιδιακή μορφή και δεν είναι διαλυτό. Είναι στην πλειοψηφία του ένα εύκολα υδρολύσιμο υπόστρωμα, αλλά αν η υδρόλυση γίνει κατά την διάρκεια της χώνευσης, επιβραδύνει τον χρόνο που διαρκεί η χώνευση<sup>5,11,28</sup>. Αυτό γίνεται επειδή κατά την λειτουργία ενός χωνευτήρα, οι λειτουργικές συνθήκες ρυθμίζονται στις βέλτιστες των μεθανογόνων μικροοργανισμών, οι οποίοι είναι οι πιο ευαίσθητοι. Αυτές είναι συνήθως στη μεσόφιλη περιοχή της θερμοκρασίας (35-37 °C) και σε pH κοντά στο ουδέτερο (6.4-8.0). Αντιθέτως, η βέλτιστη λειτουργία της υδρόλυσης από τους ήδη υπάρχοντες μικροοργανισμούς στην λάσπη είναι βέλτιστη σε πολύ πιο όξινα pH<sup>25,34</sup> και τα συνήθη υδρολυτικά ένζυμα που εκκρίνονται από τους μικροοργανισμούς αυτούς λειτουργούν βέλτιστα σε υψηλότερες θερμοκρασίες<sup>11,29,35</sup>. Για τους λόγους αυτούς, είναι συχνό να γίνεται κάποια προ-επεξεργασία πριν την αναερόβια χώνευση, η οποία αποσκοπεί στην υδρόλυση και διαλυτοποίηση του υποστρώματος<sup>11,27,36,37</sup>.

Το άλλο βασικό πρόβλημα της αναερόβιας χώνευσης, είναι η ανισορροπία στους ρυθμούς της αντίδρασης. Στην περίπτωση που και τα 4 στάδια γίνονται ταυτόχρονα, μία ευσταθής συνθήκη λειτουργίας, θα ήταν όλα τα στάδια να έχουν τον ίδιο ρυθμό, ώστε όλη η παραγόμενη να καταναλώνεται. Στην πράξη όμως, αυτό δεν συμβαίνει. Οι οξεογόνοι μικροοργανισμοί συχνά μεταβολίζουν το υπόστρωμα τους πιο γρήγορα από τους μεθανογόνους, οπότε σε πολλές περιπτώσεις μπορεί να παρατηρηθεί συσσώρευση πτητικών λιπαρών οξέων. Η συσσώρευση αυτή σημαίνει πως θα μειωθεί το pH του αντιδραστήρα σε ένα επίπεδο που θα ανασχεθεί η λειτουργία των μεθανογόνων μικροοργανισμών και σταδιακά θα σταματήσει η παραγωγή μεθανίου, κάτι που θα συντελέσει στην κατάρρευση του συστήματος. Η ανισορροπία αυτή στους ρυθμούς μπορεί όμως να συντελέσει και σε άλλο ένα πρόβλημα. Εκτός από **VFAs**, παράγεται και υδρογόνο κατά την οξεογένεση. Η υψηλή μερική πίεση υδρογόνου στο σύστημα είναι επίσης ανασταλτική για τους μεθανογόνους και μπορεί να οδηγήσει το σύστημα σε κατάρρευση. Λόγω των προβλημάτων αυτών, το σύστημα αναερόβιας χώνευσης ενός σταδίου,

δεν έχει ιδιαίτερα μεγάλη σταθερότητα <sup>12,22,25,27</sup>.

Ο συμβατικός τρόπος που επιλύεται αυτό είναι ο χαμηλός **organic loading rate - ρυθμός οργανικής φόρτισης (OLR)**. Αν το σύστημα τροφοδοτείται με μικρή ποσότητα υποστρώματος, θα είναι χαμηλός γενικά ο ρυθμός της οξεογένεσης, με αποτέλεσμα να είναι πιο δύσκολο να δημιουργηθεί αστάθεια. Βέβαια, η χρήση πολύ χαμηλού **OLR** είναι προβληματική επειδή περιορίζει σημαντικά τον ρυθμό επεξεργασίας του αποβλήτου. Ειδικά στην περίπτωση των υπολειμμάτων τροφών τα οποία παράγονται σε πολύ μεγάλους ρυθμούς, θα ήταν ιδανικό ο χωνευτήρας να λειτουργεί σε υψηλό ρυθμό οργανικής φόρτισης. Ένας τρόπος να αυξηθεί ο **OLR** είναι η χρήση ενός ταχύρυθμου αντιδραστήρα όπως ο **upflow anaerobic sludge blanket - αντιδραστήρας ανοδικής ροής διαμέσου στρώσης ιλύος (UASB)**. Στον αντιδραστήρα αυτόν, η λάσπη που δημιουργείται είναι κοκκώδης και παρατηρείται σχηματισμός βιοφίλμ. Έτσι, ο κάθε κόκκος αποτελεί ένα μικροβιακό οικοσύστημα όπου οι πιο ευαίσθητοι μικροοργανισμοί, όπως οι μεθανογόνοι προστατεύονται από τις εξωτερικές συνθήκες. Αυτό έχει ως αποτέλεσμα η διεργασία να έχει μεγαλύτερη σταθερότητα και να μπορεί να διεξαχθεί πιο γρήγορα. Αυτό επιτρέπει και την αύξηση του **OLR** <sup>22,26,38</sup>.

Όμως, ο πιο αποτελεσματικός τρόπος να αυξηθεί ο **organic loading rate - ρυθμός οργανικής φόρτισης** σε έναν αντιδραστήρα αναερόβιας χώνευσης είναι μία διάταξη σε δύο στάδια <sup>22-24</sup>. Σε αυτή, διαχωρίζονται τα στάδια της υδρόλυσης και οξεογένεσης από την μεθανογένεση. Ως αποτέλεσμα, η εκροή του οξεογενή αντιδραστήρα μπορεί να υποστεί μία ρύθμιση pH στην περιοχή που λειτουργούν βέλτιστα οι μεθανογόνοι και εφόσον έχει ολοκληρωθεί ήδη η οξεογένεση, δεν υπάρχει ο κίνδυνος να οξινιστεί ο αντιδραστήρας, κάτι που θα οδηγούσε στην κατάρρευση του. Έτσι, τα συστήματα αυτά είναι πολύ πιο σταθερά και μπορούν να λειτουργήσουν σε μεγαλύτερα **OLR** πολύ αποτελεσματικά <sup>24,26</sup>. Η οξεογένεση είναι μία περίπλοκη διεργασία η οποία μπορεί να ακολουθήσει πολλά μεταβολικά μονοπάτια ανάλογα με τις συνθήκες στις οποίες θα διεξαχθεί. Η επιλογή του βέλτιστου μονοπατιού εξαρτάται από πολλούς παράγοντες και θα αναλυθεί περαιτέρω στο **Κεφάλαιο 5**, αλλά είναι κάτι που είναι εφικτό μόνο σε συστήματα δύο φάσεων. Η βέλτιστη λειτουργία της υδρόλυσης είναι λίγο πιο καθορισμένη. Όμως, συνήθως δεν λαμβάνεται υπόψιν στα συστήματα δύο φάσεων, καθώς συνήθως καθορίζονται από την οξεογένεση. Καθώς η υδρόλυση λειτουργεί βέλτιστα σε όξινα pH, η λειτουργία της στο σύστημα αυτό είναι σίγουρα πιο αποτελεσματική από την υδρόλυση στο σύστημα μίας φάσης <sup>5,11,22,26</sup>. Στην βιβλιογραφία, υπάρχουν και κάποια συστήματα αναερόβιας χώνευσης τριών σταδίων <sup>5,25,34,39</sup>, στα οποία λειτουργεί χωριστά η υδρόλυση. Η διεργασία αυτή είναι πιο αποτελεσματική και πιο σταθερή, αλλά ταυτόχρονα και πιο περίπλοκη. Οπότε, γενικά προτιμάται η διεργασία δύο σταδίων, ως μία ισορροπία μεταξύ πολυπλοκότητας και σταθερότητας της λειτουργίας <sup>5</sup>.

## Κεφάλαιο 3

# Προεπεξεργασία Υπολειμμάτων Τροφών

Τα **ΥΤ** έχουν υψηλή περιεκτικότητα σε βιοπολυμερή. Για να μπορέσουν να χρησιμοποιηθούν αποδοτικά ως ένα υπόστρωμα για διεργασίες όπως η **ΑΧ**, απαιτείται κάποια διεργασία η οποία θα υδρολύσει το υπόστρωμα αυτό. Υπάρχουν πολλές τεχνολογίες για να βοηθήσουν την υδρόλυση του υποστρώματος αυτού όπως η μηχανική, θερμική, χημική ή ενζυμική προεπεξεργασία και η προ-επεξεργασίες με υπερήχους και μικροκύματα.

### 3.1 Μηχανική Επεξεργασία

Η πιο απλή είναι η μηχανική επεξεργασία. Μία μηχανική επεξεργασία όπως ο τεμαχισμός είναι αρκετά αποτελεσματική. Ο σκοπός της είναι η ομογενοποίηση της στερεής μάζας και μείωση του μεγέθους κόκκων της ώστε να επιταχυνθούν τα επόμενα στάδια της προ-επεξεργασίας. Είναι το πιο σύνηθες στάδιο προ-επεξεργασίας και γίνεται ανεξαρτήτως των επόμενων σταδίων συνήθως <sup>5,40,41</sup>.

### 3.2 Θερμική Επεξεργασία

Η θερμική υδρόλυση βασίζεται στην αύξηση της θερμοκρασίας, με σκοπό την διάσπαση των πολυμερικών δεσμών. Είναι πολύ αποτελεσματική ως μία προ-επεξεργασία για δύσκολα αποδομήσιμη βιομάζα. Στην περίπτωση των **ΥΤ**, οι υψηλές θερμοκρασίες δεν είναι αναγκαίες για την αποικοδόμηση και μάλιστα συνήθως υποβαθμίζουν την ποιότητα του υποστρώματος καθώς καταστρέφουν οργανική ύλη και μπορεί να παράξουν προϊόντα θερμικής αποδόμησης τα οποία είναι τοξικά για τα επόμενα βιολογικά στάδια. Ακόμη, είναι μία τεχνική με σχετικά υψηλές ενεργειακές απαιτήσεις <sup>11,27,36</sup>.

### 3.3 Επεξεργασία με Μικροκύματα

Αντίστοιχη λογική έχει και η χρήση μικροκυμάτων, η οποία αυξάνει την θερμοκρασία μέσω ενός ηλεκτρομαγνητικού πεδίου. Θεωρείται πιο αποτελεσματική από την θερμική τεχνολογία λόγω της μικρότερης κατανάλωσης ενέργειας. Επίσης, συνδυάζει θερμικά με μη θερμικά φαινόμενα. Όμως, όπως και στη περίπτωση της θερμικής υδρόλυσης, δεν επιφέρει ιδιαίτερα θετικά αποτελέσματα για την επεξεργασία **ΥΤ** <sup>11,27,36</sup>.



### 3.4 Επεξεργασία με Υπερήχους

Η χρήση υπερήχων βασίζεται στην δημιουργία ελεύθερων ριζών υδροξυλίου  $OH\cdot$ , οι οποίες διασπούν ταχύτατα τα στερεά, απελευθερώνοντας μεγάλα ποσά οργανικής ύλης. Πειράματα που έχουν χρησιμοποιήσει υπερήχους ως μία προ-επεξεργασία για αναερόβια χώνευση έχουν δείξει πως βελτιώνει αρκετά την παραγωγή μεθανίου. Βέβαια, υδρολύουν μόνο σε περιορισμένο βαθμό το υπόστρωμα, με αποτέλεσμα να πρέπει να γίνει και κάποια υδρόλυση κατά την διάρκεια της χώνευσης <sup>11,36</sup>.

### 3.5 Χημική Επεξεργασία

Σε ένα παρόμοιο μηχανισμό βασίζεται και η χημική τεχνολογία της οζόνωσης, καθώς η τροφοδοσία με όζον δημιουργεί και αυτή ελεύθερες ρίζες οι οποίες διασπούν την στερεή οργανική ύλη. Είναι όμως μία πιο έντονη επεξεργασία η οποία χρησιμοποιείται σε υποστρώματα τα οποία είναι πιο δύσκολα στην αποδόμηση. Στην περίπτωση των **ΥΤ** μπορεί να οδηγήσουν σε μείωση του COD λόγω οξειδωσης ακόμη και των ζυμώσιμων σακχάρων και παραγωγής προϊόντων πιο δύσκολα αποδομήσιμα από τα αρχικά, για αυτό αποφεύγεται <sup>27,36</sup>.

Βέβαια, η πιο συχνή κατηγορία χημικής επεξεργασίας είναι αυτή που βασίζεται στην προσθήκη οξέος ή βάσης. Η προσθήκη των ενώσεων αυτών βασίζεται στην επίτευξη ακραίων τιμών pH, στις οποίες καταρρέει η πολυμερική δομή. Στην τεχνολογία αυτή χρησιμοποιούνται ισχυρά οξέα ή βάσεις (πχ θειικό οξύ, υδροχλωρικό οξύ, καυστικό νάτριο ή ασβέστης). Η τεχνολογία αυτή είναι η πιο απλή και φθηνή τεχνολογία προ-επεξεργασίας, αλλά είναι και αρκετά αποτελεσματική. Για αυτό χρησιμοποιείται αρκετά <sup>11,29,36</sup>. Ακόμη, για την αλκαλική υδρόλυση, ισχύει πως αν τα **ΥΤ** χρησιμοποιηθούν μετά για αναερόβια χώνευση, το σύστημα θα έχει αποκτήσει μεγαλύτερη αλκαλικότητα, με αποτέλεσμα να έχει καλύτερη σταθερότητα η διεργασία <sup>27</sup>. Όμως, μπορεί να παραχθούν μη επιθυμητά προϊόντα κατά την όξινη ή αλκαλική αποδόμηση των **ΥΤ**, όπως η φουρφουράλη, τα οποία είναι τοξικά προς μικροοργανισμούς και άρα να μειωθεί σημαντικά η απόδοση της διεργασίας <sup>11,29,30</sup>.

### 3.6 Ενζυμική Επεξεργασία

Τέλος, υπάρχει η ενζυμική επεξεργασία. Αυτή βασίζεται στην χρήση υδρολυτικών ενζύμων όπως οι υδρολάσες υδατανθράκων, οι πρωτεάσες και οι λιπάσες για την διάσπαση των βιοπολυμερών. Η διεργασία αυτή δεν έχει κανένα τοξικό παραπροϊόν, ήπιες συνθήκες (οι οποίες συνδέονται με το κόστος) και εξαιρετική απόδοση υδρόλυσης/βιοαποδόμησης <sup>11,30,42</sup>. Επίσης, είναι η μόνη προ-επεξεργασία, της οποίας οι συνθήκες μπορούν να ρυθμιστούν έτσι ώστε να γίνει ταυτόχρονα με την οξεογένεση, το οποίο επιτρέπει την αναερόβια χώνευση σε 2 στάδια. Σε κάθε άλλη περίπτωση, η διεργασία πρέπει να γίνει σε τρία στάδια, το οποίο παρότι προσφέρει σταθερότητα και πιθανόν καλύτερες αποδόσεις, δημιουργεί και πολυπλοκότητα στην διεργασία <sup>5,11</sup>. Παρόλα αυτά, το κόστος των ενζύμων είναι πολύ υψηλό, κάτι που καθιστά την συμβατική ενζυμική υδρόλυση μία τεχνολογία απαγορευτική σε μεγάλη κλίμακα. Συγκριμένα, η καθαρή  $\alpha$ -αμυλάση ενεργότητας 30 U/mg παραγόμενη από *Aspergillus oryzae* κοστίζει 236 € ανά 50 γραμμάρια (SigmaAldrich), ενώ η αμυλογλυκοζιδάση ενεργότητας 30-60 U/mg παραγόμενη από *Aspergillus niger* 585 € ανά 100 mg (SigmaAldrich). Ακόμη και σε εμπορικά ενζυμικά σκευάσματα όπως το Viscozyme L της Novozyme, το οποίο είναι χαμηλότερου κόστους από αυτά, κοστίζει 394 € ανά 250 mL, το οποίο είναι και πάλι πολύ υψηλό κόστος για εφαρμογές μεγάλης κλίμακας. Για τον λόγο αυτόν, στην βιβλιογραφία υπάρχουν αρκετές μελέτες χρησιμοποιώντας πρωτοποριακές τεχνολογίες ενζυμικής υδρόλυσης χαμηλού κόστους για να λύσουν το πρόβλημα αυτό <sup>18,25,33,43,44</sup>. Οι τεχνολογίες αυτές θα αναλυθούν σε περισσότερο βάθος στο **Κεφάλαιο 4**.

### 3.7 Απόκριση της Υδρόλυσης

Αλλά μία σημαντική ερώτηση που έγκειται για την υδρόλυση, είναι πως προσδιορίζεται πειραματικά η απόδοση μίας τέτοιας διεργασίας. Στην πράξη, το σημαντικότερο μέτρο για αυτό είναι ο λόγος **διαλυτό COD (sCOD)** προς **ολικό COD (tCOD)**. Αυτό δείχνει πόση από την οργανική ύλη έχει διαλυτοποιηθεί και στα **ΥΤ** ξεκινάει συνήθως από 20 – 30% και μπορεί να φτάσει σε 60 – 80% σε μία αρκετά αποδοτική υδρόλυση <sup>28,37,45</sup>.



## Κεφάλαιο 4

# Βελτιστοποίηση της Διεργασίας της Ενζυμικής Υδρόλυσης

Στο **Κεφάλαιο 3** αναφέρθηκαν όλες οι τεχνολογίες προ-επεξεργασίας των **ΥΤ**. Σκοπός αυτών είναι η επίτευξη υψηλών αποδόσεων σε επόμενα βιολογικά στάδια όπως η **ΑΧ**. Προέκυψε, πως η ενζυμική υδρόλυση/βιοαποδόμηση είναι η πιο αποτελεσματική καθώς δεν έχει παραπροϊόντα, χρησιμοποιεί ήπιες συνθήκες, μειώνει αποτελεσματικά τα **total solids - ολικά στερεά (TS)** και αυξάνει το διαλυτό **chemical oxygen demand - χημικά απαιτούμενο οξυγόνο (COD)**, ενώ μπορεί να γίνει παράλληλα με την οξεογένεση. Όμως, αναφέρθηκε πως το κύριο εμπόδιο της είναι το κόστος των ενζυμικών σκευασμάτων. Για αυτό, στο κεφάλαιο αυτό θα αναφερθούν όλες οι τεχνολογίες που έχουν προταθεί στην βιβλιογραφία για την μείωση του κόστους της διεργασίας αυτής. Γενικά, κατατάσσονται σε δύο κατηγορίες:

- Εντατικοποίηση της διεργασίας υδρόλυσης (**Process Intensification - Εντατικοποίηση Διεργασιών (PI)**) και μείωση του απαιτούμενου χρόνου υδρόλυσης, ο οποίος σε συνεχή συστήματα αντιστοιχεί στην ποσότητα ενζύμων που απαιτούνται.
- Χρήση μικροοργανισμών, οι οποίοι στις κατάλληλες συνθήκες θα εκκρίνουν υδρολυτικά ένζυμα in-situ για την υδρόλυση

### 4.1 Εντατικοποίηση της Διεργασίας Υδρόλυσης

Οι μελέτες οι οποίες υπάγονται σε αυτήν την κατηγορία αποτελούν τις μελέτες οι οποίες έχουν προσπαθήσει να βελτιστοποιήσουν διάφορες συνθήκες της υδρόλυσης, με σκοπό την πιο αποτελεσματική και γρήγορη ενζυμική υδρόλυση, η οποία θα έχει χαμηλότερο κόστος.

Μία μελέτη προσπάθησε να μειώσει πολύ τον χρόνο παραμονής του οργανικού κλάσματος στην υδρόλυση και έδειξε ότι με βέλτιστες συνθήκες, σε περίπου 4 ώρες έχει γίνει ικανοποιητική υδρόλυση <sup>37</sup>. Καθώς ο χρόνος αυτός συχνά είναι στις 24 ώρες, μία τέτοια μείωση θα μπορούσε να μειώσει σημαντικά την απαίτηση σε ένζυμα και άρα να βελτιώσει το κόστος της διεργασίας <sup>11,46,47</sup>.

Μία άλλη μελέτη προσπάθησε να βελτιστοποιήσει μία διεργασία παραγωγής βιοαιθανόλης από απόβλητα της βιομηχανίας επεξεργασίας πατάτας λαμβάνοντας υπόψιν συνθήκες όπως η ποσότητα ενζύμων που θα χρησιμοποιηθεί και η πιθανότητα χρήσης άλλων διεργασιών υδρόλυσης επικουρικά, όπως η προσθήκη HCl ή χρήση υπερήχων κατά την διεργασία <sup>44</sup>.

Μία άλλη ιδέα ήταν ο συνδυασμός υπερήχων και ενζυμικής υδρόλυσης με σκοπό οι υπέρηχοι να διασπάσουν την βιομάζα κάνοντας την πιο προσβάσιμη στα ένζυμα, με σκοπό να μειωθεί σημαντικά η ποσότητα ενζύμων που πρέπει να προστεθεί. Η μελέτη αυτή έδειξε πως αυτός ο συνδυασμός είναι αρκετά αποτελεσματικός αφού η συνδυαστική αυτή διεργασία μείωσε κατά περίπου 50% την ποσότητα ενζύμων που χρειαζόταν <sup>48</sup>.

Παρόλο που υπήρχαν αρκετές επιτυχίες με τις τεχνικές αυτές, ακόμη και με σημαντική μείωση της ποσότητας ενζύμων που χρειάζονται, όσο μεγαλώνει η κλίμακα, γίνεται όλο και πιο δύσκολο να λειτουργήσει αποτελεσματικά η εντατικοποίηση της διεργασίας ως τεχνική για την μείωση του κόστους. Οπότε, θεωρείται πως οι πιο αποτελεσματικές τεχνικές υδρόλυσης είναι στην δεύτερη κατηγορία, όπου το σύστημα τροφοδοτείται με μικροοργανισμούς και οι συνθήκες ελέγχονται ώστε να παραχθούν in-situ μεγάλες ποσότητες υδρολυτικών ενζύμων.

## 4.2 Ζύμωση Στερεής Κατάστασης

Η ζύμωση στερεής κατάστασης (**Solid State Fermentation - Ζύμωση στερεής κατάστασης (SSF)**) είναι μία αρκετά ενδιαφέρουσα κατηγορία ζύμωσης. Η βασική της αρχή είναι πως δεν χρησιμοποιείται νερό στον αντιδραστήρα όπου θα αναπτυχθεί ο μικροοργανισμός (ή οι μικροοργανισμοί στη περίπτωση μικτής καλλιέργειας) αλλά κάποια στερεή φάση, η οποία μπορεί να χρησιμοποιηθεί ως η τροφή του μικροοργανισμού <sup>18,33</sup>.

Μία από τις βασικές εφαρμογές της **SSF** είναι η ανάπτυξη μυκήτων οι οποίοι μπορούν να εκκρίνουν μεγάλη ποσότητα ενζύμων. Η τεχνολογία αυτή για την παραγωγή υδρολυτικών ενζύμων έχει αρκετό ενδιαφέρον, καθώς είναι μία διεργασία η οποία χρησιμοποιεί συχνά απόβλητα ως πρώτη ύλη. Για παράδειγμα, μπορούν τα ίδια **ΥΤ** που θα χρησιμοποιηθούν για την **ΑΧ** να χρησιμοποιηθούν και στην **SSF** <sup>49</sup>. Έπειτα, η βιομάζα που έχει παραχθεί στην **SSF** μπορεί να αναμειχθεί με τα υπόλοιπα **ΥΤ** και το μείγμα αυτό να χρησιμοποιηθεί για διεργασίες όπως η αναερόβια χώνευση <sup>33,50</sup>. Έτσι, μπορούν να παραχθούν μεγάλες ποσότητες υδρολυτικών ενζύμων σε πολύ χαμηλό κόστος <sup>18,31,32</sup>.

Επιπλέον, στην διεργασία **SSF** δεν απαιτούνται στάδια καθαρισμού, καθώς όλη η βιομάζα του μύκητα, η οποία είναι πλούσια σε υδρολυτικά ένζυμα, προστίθεται στον αντιδραστήρα. Ο καθαρισμός των ενζύμων είναι το δυσκολότερο κομμάτι της παραγωγής τους και ο βασικός λόγος για τον οποίο είναι ακριβά. Μία τέτοια διεργασία μπορεί να παράγει ένζυμα χωρίς αυτόν τον περιορισμό, και σε ορισμένες περιπτώσεις να είναι και πιο αποτελεσματική από την χρήση ενός εμπορικού σκευάσματος. Επιπροσθέτως, μπορεί να παραχθεί ένα μείγμα ενζύμων το οποίο είναι δύσκολο να βρεθεί ως έχει εμπορικά <sup>31-33</sup>.

Εκτός όμως από το κόστος, η τεχνολογία αυτή έχει πολλά πλεονεκτήματα. Αρχικά, καθώς μιλάμε για στερεή φάση και όχι υδατική, ο όγκος του αντιδραστήρα που απαιτείται είναι αρκετά μικρός, το οποίο μειώνει σημαντικά το κόστος της διεργασίας. Επίσης, σε μία στερεή φάση, υπάρχει μικρότερος κίνδυνος για μόλυνση σε σχέση με την υγρή. Ακόμη, το προϊόν της ζύμωσης προκύπτει πυκνό και χωρίς ανάγκη ακριβού διαχωρισμού στον οποίο θα απομακρυνθεί το νερό, μειώνοντας σημαντικά το κόστος. Επιπλέον, εφόσον δεν απομακρύνεται νερό, δεν υπάρχουν υγρά απόβλητα τα οποία απαιτούν διαχείριση <sup>33,51</sup>. Όμως, είναι μία σχετικά καινούργια τεχνολογία, η οποία δεν έχει τόσο υψηλό **TRL** και δεν έχει αξιοποιηθεί εμπορικά σε μεγάλο βαθμό. Παρόλα αυτά, θεωρείται πως έχει πολύ μεγάλο περιθώριο εφαρμογής για διεργασίες που θέλουν ενζυμική υδρόλυση, αλλά το κόστος της την κάνει ανεπιθύμητη <sup>51</sup>.

Για την διεργασία αυτή, ένα από τα πιο βασικά γένη είναι τα *Aspergillus*, με τα *A. awamori*, *A. oryzae*, *A. terreus* και *A. niger* να είναι τα βασικότερα στελέχη που έχουν εφαρμοστεί στην διεργασία. Έχει βρεθεί πως ο *A. awamori* είναι ένας από τους αποτελεσματικότερους μύκητες για την παραγωγή υδρολασών υδατανθράκων, ο *A. oryzae* είναι ένας από τους πιο αποτελεσματικούς για πρωτεάσες ενώ ο *A. terreus* είναι ένας από τους πιο αποτελεσματικούς για λιπάσες <sup>31,50</sup>. Ο λόγος που χρησιμοποιούνται μικροοργανισμοί του γένους αυτού είναι επειδή μπορούν να προσαρμοστούν εύκολα σε διάφορες περιβαλλοντικές συνθήκες και έχουν μεγάλο εύρος θερμοκρασιών και pH στα οποία μπορούν να αναπτυχθούν (από ψυχρόφιλος μέχρι 10 °C μέχρι θερμοφιλος στους 50 °C και από οξέοφιλος σε pH έως και 2 μέχρι αλκαλόφιλος σε pH 11). Επίσης, μπορούν να λειτουργήσουν αποτελεσματικά ακόμη και σε συνθήκες ολιγοτροφισμού. Τα χαρακτηριστικά αυτά, τους κάνουν πολύ ικανούς για την διεργασία αυτή. <sup>50,51</sup>

### 4.3 Παραγωγή Υδρολυτικών Ενζύμων από Βακτήρια

Βέβαια, εκτός από **SSF** με χρήση μυκήτων, υδρολυτικά ένζυμα μπορούν να παραχθούν και από βακτήρια. Από το Σχήμα 1.4 φαίνεται πως κατά την αναερόβια χώνευση, μπορεί να γίνει υδρόλυση από τα υδρολυτικά βακτήρια, τα οποία εκκρίνουν ένζυμα<sup>21</sup>. Όμως, οι συνθήκες της χώνευσης δεν είναι σύμφωνες με τις ιδανικές για τους μικροοργανισμούς αυτούς, οπότε η χώνευση, διεξάγεται πολύ αργά. Αν διεξαχθεί ένα χωριστό στάδιο υδρόλυσης, οι συνθήκες αυτές μπορούν να ρυθμιστούν καλύτερα<sup>25,34</sup>. Η υδρόλυση λειτουργεί βέλτιστα σε όξινα pH (πχ 4.5-5.0) και πολλά από τα υδρολυτικά βακτήρια είναι θερμοφιλά, οπότε οι υψηλές θερμοκρασίες (πχ 45-55 °C) μπορεί να συνεισφέρουν στην πιο αποτελεσματική υδρόλυση<sup>25,52,53</sup>. Οπότε, μπορεί η ίδια λάσπη που θα χρησιμοποιηθεί στην αναερόβια χώνευση να χρησιμοποιηθεί και ως εμβόλιο για το στάδιο της υδρόλυσης, μόνο που οι συνθήκες θα είναι ρυθμισμένες έτσι ώστε να είναι βέλτιστη η υδρόλυση.

Αυτή είναι και η αρχή λειτουργίας της αναερόβιας χώνευσης σε 2 φάσεις. Στις συνθήκες αυτές, εκτός από υδρόλυση θα διεξαχθεί και οξεογένεση (οι οξεογόνοι μικροοργανισμοί μπορούν να δράσουν στις συνθήκες αυτές)<sup>22,24,26</sup>. Συχνά, σε ένα τέτοιο σύστημα οι συνθήκες ρυθμίζονται για την βελτιστοποίηση της οξεογένεσης, αλλά μπορούν να επιλεχθούν και συνθήκες με βάση την βελτιστοποίηση της υδρόλυσης.

Άλλη μία αλλαγή που μπορεί να βοηθήσει την υδρόλυση είναι ο αερισμός. Τα βακτήρια που συμμετέχουν στα στάδια της υδρόλυσης και οξεογένεσης είναι προαιρετικά αναερόβια και μάλιστα λειτουργούν πιο αποτελεσματικά σε αερόβιες συνθήκες. Ακόμη, στις συνθήκες αυτές γίνεται πιο πλούσια η μικροβιακή ποικιλότητα στον αντιδραστήρα<sup>53,54</sup>. Οπότε, αν ο αντιδραστήρας αυτός αερίζεται, μπορεί να βελτιωθεί η απόδοση της υδρόλυσης αλλά και της οξεογένεσης. Μία από τις πρώτες μελέτες που διαπίστωσε αυτό το συμπέρασμα το διαπίστωσε μετά από μικροβιακή ανάλυση, στην οποία υπήρχαν υποχρεωτικά αερόβια βακτήρια σε έναν χωνευτήρα σε δύο φάσεις<sup>55</sup>. Μετά από μελέτη του συστήματος αυτού, διαπιστώθηκε πως πράγματι η προσθήκη οξυγόνου βοηθάει το σύστημα, αρκεί να μην είναι πάρα πολύ ισχυρή, αφού στην περίπτωση αυτή αρχίζει να δημιουργεί προβλήματα στα επόμενα στάδια, τα οποία είναι υποχρεωτικά αναερόβια<sup>43,56,57</sup>. Έτσι, η τεχνολογία του μικροαερισμού στην αναερόβια χώνευση έχει διερευνηθεί από πολλές ερευνητικές ομάδες<sup>43,57-60</sup>.

Εκτός από την υδρόλυση, ο αερισμός βοηθάει και στην απομάκρυνση του υδρόθειου που μπορεί να δημιουργηθεί σε έναν χωνευτήρα και αποτελεί πρόβλημα<sup>43,54</sup>. Αυτό δεν είναι πρόβλημα στην περίπτωση των **ΥΤ**, καθώς αυτά δεν περιέχουν θείο, το οποίο θα μπορούσε να αναχθεί σε υδρόθειο κατά την **ΑΧ**.

Πέρα από τις τεχνικές αυτές για την έκκριση ενζύμων από βακτήρια τα οποία υπάρχουν στην αναερόβια λάσπη, υπάρχουν και εμπορικά σκευάσματα με κατάλληλα επιλεγμένους μικροοργανισμούς από φυσικά οικοσυστήματα, οι οποίοι ενεργοποιούνται ταχύτατα και συνοδεύονται από υδρολυτικά ένζυμα υψηλής ενεργότητας. Συνήθως αυτά τα σκευάσματα παρασκευάζονται για να ενεργοποιήσουν πιο γρήγορα μία βιολογική δράση όπως η ενεργός ίλύς ή για σωληνώσεις οι οποίες έχουν φρακάρει. Η τιμή ενός τέτοιου σκευάσματος είναι περίπου 25 € ανά κιλό, το οποίο είναι πολύ πιο φθηνό από καθαρά ενζυμικών σκευασμάτων. Οπότε, αποτελεί μία πολύ εύκολα εφαρμοσιμή και φθηνή επιλογή για την υδρόλυση οργανικής ύλης, θεωρείται πως είναι μία καινοτόμα, αλλά αποτελεσματική τεχνολογία για την υδρόλυση ενός υποστρώματος όπως τα **ΥΤ**, η οποία μπορεί να κλιμακωθεί σχετικά εύκολα. Η χρήση των συνθηκών που αναφέρθηκαν είναι και πάλι επιθυμητή για την βέλτιστη λειτουργία, αλλά η χρήση ενός τέτοιου σκευάσματος επιτρέπει την πιο εύκολη και αποτελεσματική παραγωγή υδρολυτικών ενζύμων σε σχέση με την χρήση μίας κοινής αναερόβιας λάσπης.

## Κεφάλαιο 5

# Οξεογένεση

Στα προηγούμενα κεφάλαια αναφέρθηκαν τα βασικά πλεονεκτήματα της διεργασίας **AX** σε πολλαπλά στάδια καθώς και όλες οι δυνατές διεργασίες υδρόλυσης που προηγούνται της οξεογένεσης ή γίνονται ταυτόχρονα με αυτήν. Ένα από τα βασικά πλεονεκτήματα της ξεχωριστής οξεογένεσης, είναι η δυνατότητα ελέγχου του μεταβολικού μονοπατιού που θα ακολουθήσει αυτή, ώστε να παραχθούν προϊόντα τα οποία είναι πιο εύκολα μεταβολίσιμα στα επόμενα στάδια. Γενικά, η οξεογενετική ζύμωση είναι μία διεργασία η οποία μπορεί να ακολουθήσει διάφορα μεταβολικά μονοπάτια ανάλογα με την θερμοκρασία, το pH, το **redox potential - οξειδοαναγωγικό δυναμικό (ORP)** και την μικροβιακή ποικιλότητα στον αντιδραστήρα <sup>61-65</sup>. Όμως, για να γίνουν οι αντιδράσεις που αναφέρονται απαιτούνται αναερόβιες συνθήκες. Στην περίπτωση της αερόβιας δράσης, θα υπάρξει πλήρης οξειδωση του υποστρώματος μέσω του κύκλου του Krebs για παραγωγή ενέργειας, υδρογόνου και διοξειδίου του άνθρακα <sup>66</sup>.

### 5.1 Μεταβολισμός σακχάρων, αμινοξέων και λιπαρών οξέων

Το πρώτο στάδιο της οξεογενετικής ζύμωσης είναι ο μεταβολισμός των άμεσων προϊόντων της υδρόλυσης, δηλαδή των σακχάρων, αμινοξέων και λιπαρών οξέων.

Τα σάκχαρα τα οποία παράγονται υδρολύονται μέχρι να καταλήξουν σε μονομερή όπως η γλυκόζη και η φρουκτόζη. Τα σάκχαρα αυτά χρησιμοποιούνται στο **μονοπάτι Embden-Meyerhof (EMP)**, γνωστό ως και ως μονοπάτι της γλυκόλυσης. Το τελικό προϊόν αυτού είναι το πυροσταφυλικό οξύ (pyruvate), το οποίο είναι το βασικότερο ενδιάμεσο της οξεογενετικής ζύμωσης και το υπόστρωμα το οποίο θα μετατραπεί εν τέλει σε οξέα. Επιπλέον, πρέπει να σημειωθεί πως η μετατροπή της γλυκόζης σε πυροσταφυλικό είναι οξειδωτική αντίδραση και παράγει 2 mol αναγωγικά μέσα ανά mol γλυκόζης (**nicotinamide adenine dinucleotide hydrogen (NADH)**) <sup>61</sup>.

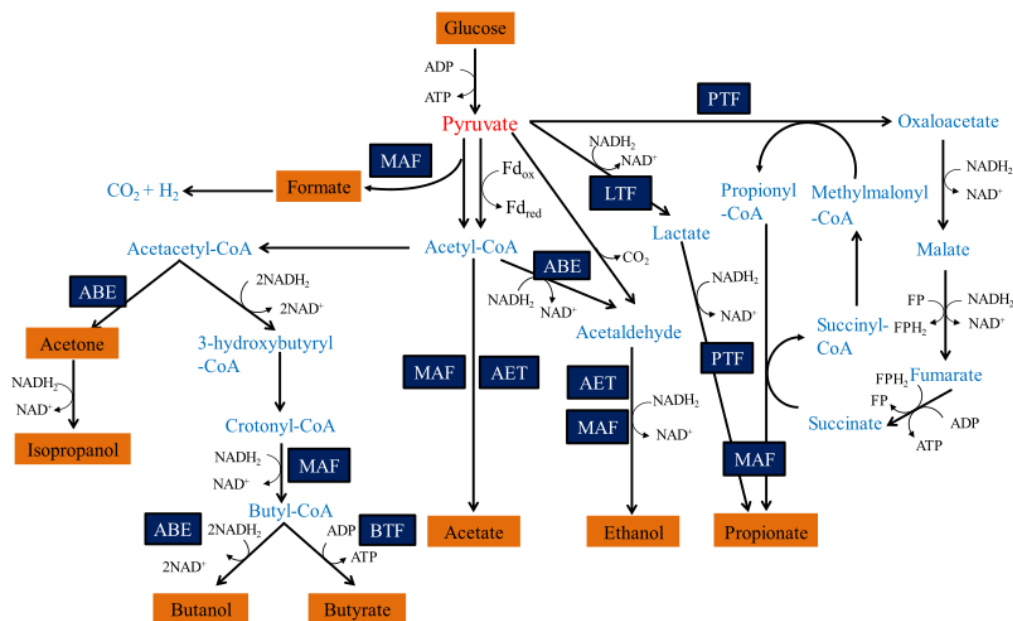
Τα αμινοξέα οξειδώνονται από keto acids (ενώσεις με μία κετονομάδα και μία καρβοξυλομάδα), όπως το πυροσταφυλικό οξύ, παράγοντας άλλα keto acids (με ίδιο αριθμό ανθράκων όσους το αμινοξύ), τα οποία υδρολύονται και σταδιακά μετατρέπονται σε πυροσταφυλικό <sup>67</sup>. Παραπροϊόν της διεργασίας είναι η αμμωνία η οποία αποδεσμεύεται από τα αμινοξέα. Η αμμωνία είναι μια αρκετά αλκαλική ένωση. Σε υψηλές συγκεντρώσεις μπορεί να αναστείλει την δράση της **AX** λόγω αύξησης του pH, αλλά σε χαμηλότερες συγκεντρώσεις είναι πολύ καλή για την χώνευση, καθώς η αύξηση της αλκαλικότητας οδηγεί σε βελτιωμένη σταθερότητα του αντιδραστήρα, καθώς περιορίζεται η οξίνιση <sup>68</sup>. Για τον λόγο αυτόν, η υδρόλυση των πρωτεϊνών είναι αρκετά επιθυμητή.

Κατά την υδρόλυση των λιπιδίων, απελευθερώνονται λιπαρά οξέα μεγάλης αλυσίδας (**λιπαρά οξέα μακριάς ανθρακικής αλυσίδας - long chain fatty acids (LCFA)**) και γλυκερόλη. Η γλυκερόλη αποτελεί ενδιάμεσο προϊόν κατά την διεργασία της γλυκόλυσης και όση παράγεται στο στάδιο αυτό μπορεί να μεταβολιστεί σε πυροσταφυλικό κατά την γλυκόλυση. Τα **LCFA** μεταβολίζονται στον κύκλο της β-οξειδωσης και παράγουν τελικά **ακέτυλο συνένζυμο**

**A (Acetyl-CoA)**. Λόγω της μεγάλης ανθρακικής αλυσίδας, είναι πολύ καλά υποστρώματα για **AX** καθώς παράγουν μεγάλες ποσότητες **VFAs** <sup>33,69</sup>. Αξίζει να αναφερθεί όμως πως αν τα λιπίδια δεν υδρολυθούν μπορούν να δημιουργήσουν προβλήματα στην λειτουργία του αντιδραστήρα όπως άφρισμα, οπότε στην περίπτωση που δεν γίνει υδρόλυση, πρέπει να γίνει ένας λιποδιαχωρισμός <sup>33,50</sup>.

## 5.2 Μεταβολισμός του πυροσταφυλικού οξέος

Το πυροσταφυλικό οξύ που παράχθηκε από την γλυκόλυση είναι ένα σημαντικό ενδιάμεσο της διεργασίας. Στο Σχήμα 5.1 φαίνονται τα βασικά μεταβολικά μονοπάτια για την κατανάλωση του.



Σχήμα 5.1: Μεταβολικά μονοπάτια κατανάλωσης του πυροσταφυλικού οξέος <sup>70</sup>

Στο σύστημα μετά την οξείδωση της γλυκόζης επικρατούν αναγωγικές συνθήκες. Οπότε, είναι πολύ πιθανό να διεξαχθούν αναγωγικές αντιδράσεις. Η απλούστερη αναγωγική αντίδραση είναι η αναγωγή του πυροσταφυλικού οξέος σε γαλακτικό οξύ. Σε πολλές περιπτώσεις, το γαλακτικό οξύ μπορεί να αναχθεί περαιτέρω σε προπιονικό οξύ μέσω του **NADH**. Γενικά, το γαλακτικό οξύ επικρατεί σε όξινα pH (4.0-5.0) ενώ με την αύξηση του pH παράγεται περισσότερο προπιονικό. Βέβαια, ακόμη και στα pH που το γαλακτικό επικρατεί, λόγω του υψηλού αναγωγικού φορτίου που είναι διαθέσιμο, θα παραχθεί κάποια ποσότητα προπιονικού. Το μονοπάτι αυτό λέγεται ομογαλακτική ζύμωση, επειδή παράγονται 2 mol γαλακτικού ανά mol γλυκόζης, σε αντίθεση με την ετερογαλακτική ζύμωση όπου παράγεται 1 mol γαλακτικού ανά mol γλυκόζης <sup>70,71</sup>.

Το προπιονικό μπορεί να παραχθεί και από άλλο ένα μονοπάτι, το transcarboxylase cycle, το οποίο είναι ένα κυκλικό μονοπάτι μεταξύ οργανικών οξέων με 4 άνθρακες, το οποίο ξεκινάει λόγω της εναλλαγής ενός **CO<sub>2</sub>** μεταξύ του πυροσταφυλικού οξέος και του μεθυλομηλονικού οξέος, το οποίο μετατρέπεται σε προπιονικό οξύ λόγω αυτού. Ως μεταβολικό προϊόν, μπορεί να παραχθεί σε μεγάλο εύρος pH, αλλά δεν είναι πουθενά το κύριο προϊόν καθώς οι μικροοργανισμοί που παράγουν προπιονικό οξύ αναστέλλονται ισχυρά από το προπιονικό οξύ <sup>70</sup>. Γενικά, είναι σπάνιο να συσσωρευθεί οποιοδήποτε από τα ενδιάμεσα του κύκλου αυτού, αλλά με το κατάλληλο μικροβιακό πληθυσμό, σε ουδέτερο προς αλκαλικό pH (7-8.5) και συσσώρευση **CO<sub>2</sub>**, μπορεί να παρατηρηθεί συσσώρευση ηλεκτρικού οξέος στον αντιδραστήρα <sup>64</sup>. Ο λόγος



που αν συσσωρευτεί κάτι, θα είναι το ηλεκτρικό οξύ, είναι επειδή αυτό αποτελεί το στάδιο του κύκλου το οποίο περιορίζει τον ρυθμό, οπότε αν διακοπεί κάπου ενδιάμεσα, θα είναι στο στάδιο αυτό <sup>72</sup>.

Η άλλη βασική αντίδραση κατανάλωσης του πυροσταφυλικού, είναι η οξειδωση του σε **Acetyl-CoA**. Αυτή δεν καταλύεται από το  $\text{NAD}^+$  καθώς στις αναγωγικές συνθήκες που επικρατούν αυτό βρίσκεται στην μορφή του  $\text{NADH}$ , αλλά από ένα είδος πρωτεϊνών γνωστές ως **ferredoxins (Fd)**. Οι πρωτεΐνες αυτές αποτελούνται από σίδηρο και χαλκό και συνεισφέρουν σε καταλυτικές αντιδράσεις, ανάλογα με την οξειδωτική κατάσταση του σιδήρου. Είναι πιο ισχυρό οξειδοαναγωγικό μέσο από το  $\text{NAD}^+$ , οπότε μπορεί να καταλύσει την αντίδραση αυτή παρότι το περιβάλλον είναι αρκετά αναγωγικό <sup>65,70,73</sup>. Η αντίδραση αυτή παράγει και ένα mol  $\text{CO}_2$  και  $\text{H}_2$  κατά την οξειδωση. Οι δύο ενώσεις αυτές βρίσκονται σε ισορροπία με το μυρμηκικό οξύ  $\text{H}_2 + \text{CO}_2 \rightleftharpoons \text{HCOOH}$ . Η αντίδραση αυτή έχει **μεταβολή ελεύθερης ενέργειας Gibbs ( $\Delta G$ )** αρκετά κοντά στο 0, οπότε, το αν τα δύο αέρια θα είναι σε ελεύθερη μορφή ή θα μετατραπούν σε μυρμηκικό οξύ εξαρτάται σε μεγάλο βαθμό από τις συνθήκες. Η βασικότερη εξάρτηση είναι το pH. Το μυρμηκικό οξύ παρατηρείται γενικά σε pH από 7 και πάνω, ενώ σε χαμηλότερες τιμές η μετατροπή είναι θερμοδυναμικά ανέφικτη. Ο ρόλος του μυρμηκικού οξέος στο σύστημα είναι ότι είναι ένα εναλλακτικό αναγωγικό μέσο, όταν το υδρογόνο δεν είναι στην ελεύθερη μορφή. Δεν συμμετέχει σε άλλες μεταβολικές αντιδράσεις οξεογένεσης <sup>64</sup>.

Από το **Acetyl-CoA** παράγονται τα υπόλοιπα προϊόντα της διεργασίας. Το πιο "εύκολο" μεταβολικό προϊόν είναι το οξικό οξύ. Παράγεται απευθείας από το **Acetyl-CoA** ανεξάρτητα από το **οξειδωαναγωγικό δυναμικό (redox)** και σε μεγάλο εύρος pH. Οπότε, είναι το κύριο προϊόν του **Acetyl-CoA** εκτός αν λόγω συνθηκών επικρατήσει κάποιο άλλο <sup>61,74</sup>. Επίσης, οξικό οξύ παράγεται ως συμπροϊόν των αναγωγικών προϊόντων (γαλακτικό και προπιονικό) για να εξισορροπήσει το **ORP**.

Τα άλλα βασικά προϊόντα από το **Acetyl-CoA** είναι η αιθανόλη και το βουτυρικό οξύ. Η αιθανόλη παράγεται από την αναγωγή του **Acetyl-CoA** με ενδιάμεσο την φορμαλδεύδη. Μεγάλες ποσότητες αιθανόλης παρατηρούνται σε πολύ όξινα pH (4.0-4.5) και ξανά εμφανίζονται σε αλκαλικά pH (8.0) <sup>62,64,75</sup>. Η ισορροπία αιθανόλης/οξικού είναι μία αρκετά ενδιάμεση ισορροπία. Η αιθανόλη παράγεται από το **Acetyl-CoA** οπότε η παραγωγή οξικού οξέος ως συμπροϊόν της δεν γίνεται για εξισορρόπηση του **ORP**. Όμως, συνήθως δεν υπάρχει αρκετό αναγωγικό δυναμικό για να παραχθεί μόνο αιθανόλη. Το πιο συχνά παρατηρούμενο είναι 1 mol γλυκόζης να μετατραπεί σε ένα ισομοριακό μείγμα αιθανόλης και οξικού οξέος, επειδή όλο το αναγωγικό δυναμικό χρησιμοποιείται για την παραγωγή ενός mol αιθανόλης και άρα το άλλο **Acetyl-CoA** μετατρέπεται σε οξικό. Το μονοπάτι αυτό ονομάζεται ζύμωση αιθανόλης-οξικού <sup>70,74,75</sup>.

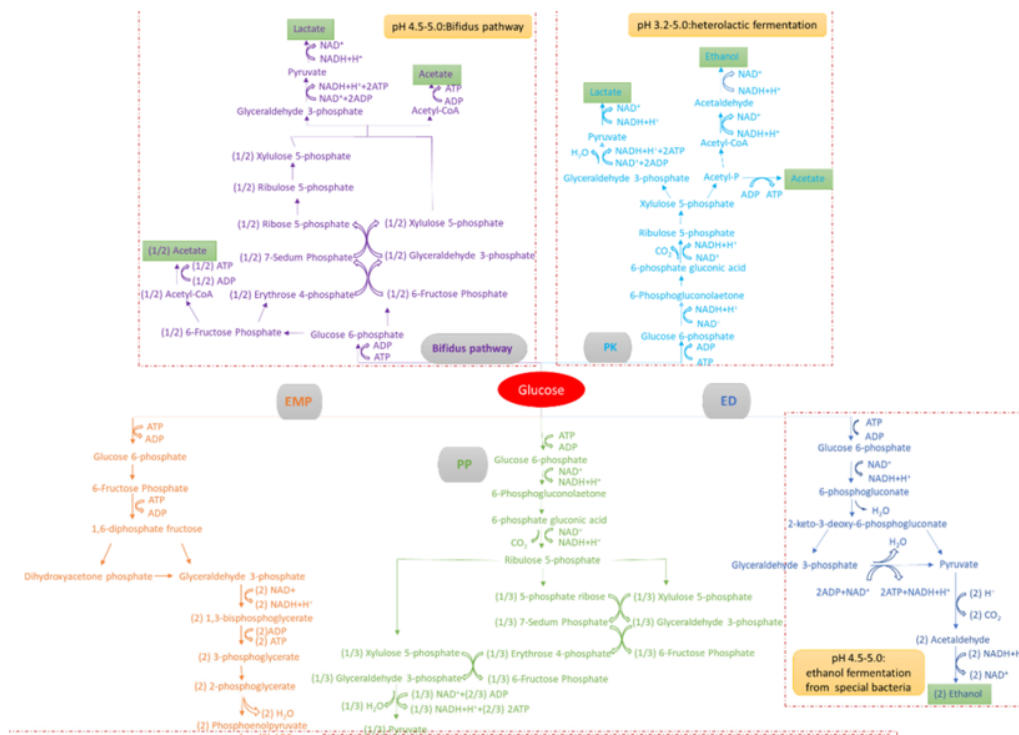
Το βουτυρικό οξύ παράγεται από το acetacetyl-CoA, το οποίο είναι το προϊόν της αντίδρασης 2 mol **Acetyl-CoA**. Μετά από δύο αναγωγές, αυτό μετατρέπεται σε butyryl-CoA, το οποίο μετατρέπεται αυθόρμητα σε βουτυρικό οξύ. Έτσι, το βουτυρικό οξύ είναι το μόνο από τα κύρια προϊόντα του μεταβολισμού του πυροσταφυλικού οξέος το οποίο απαιτεί 2 mol πυροσταφυλικού για να παραχθεί. Αποτελεί το κύριο συμπροϊόν του οξικού οξέος σε pH από 5 έως 6.5. Παράγεται ως συμπροϊόν του οξικού επειδή όπως και για την αιθανόλη, συχνά δεν φτάνει το αναγωγικό δυναμικό για να παραχθεί μόνο του και κάποια mol **Acetyl-CoA** θα μετατραπούν σε οξικό <sup>61,62,70</sup>.

Στην περίπτωση που το pH ξεπεράσει το 6.5, σταματάει να επικρατεί κάποιο οξεογενετικό προϊόν και προτιμάται το μονοπάτι γνωστό ως ζύμωση μικτών οξέων, όπου παράγονται: μυρμηκικό, οξικό, προπιονικό, βουτυρικό και βαλερικό οξύ σε κάποια περιεκτικότητα. Αυτό είναι το μεταβολικό μονοπάτι που ακολουθείται και στην περίπτωση που η οξεογένεση διεξάγεται ταυτόχρονα με την μεθανογένεση, καθώς αυτό είναι το pH στο οποίο διεξάγεται η μεθανογένεση. Αυτό το μονοπάτι δεν είναι ιδιαίτερα επιθυμητό στην περίπτωση που ελέγχεται η οξεογένεση, επειδή προτιμάται ένα πιο ελεγχόμενο προφίλ προϊόντων <sup>61,64,70</sup>.

Ένα τελευταίο μονοπάτι, το οποίο αξίζει να σημειωθεί, παρόλο που δεν παρατηρείται σε μία τυπική οξεογενή ζύμωση είναι η ζύμωση ακετόνης-βουτανόλης-αιθανόλης (ΑΒΕ). Η αιθανόλη έχει ήδη αναφερθεί ως προϊόν της οξεογενετικής ζύμωσης. Όπως φαίνεται στο Σχήμα 5.1, η βουτανόλη παράγεται από την αναγωγή του butyryl-CoA σε ισορροπία με το βουτυρικό οξύ, αντίστοιχη με αυτήν του οξικού με την αιθανόλη. Η ακετόνη, είναι εναλλακτικό προϊόν του Acetyl-CoA. Ο μηχανισμός της ζύμωσης αυτής είναι πως ξεκινάει με οξεογένεση και συγκεκριμένα ζύμωση οξικού-βουτυρικού, καθώς διεξάγεται συνήθως σε pH 5.5-6.0, όπου επικρατούν τα δύο αυτά προϊόντα, και σταδιακά μετατρέπεται σε solventogenesis, όπου το acetyl-CoA παράγει αιθανόλη ενώ το acetacetyl-CoA παράγει ακετόνη και βουτανόλη. Βέβαια, για να γίνει αυτό απαιτούνται κάποια ειδικά βακτήρια τα οποία να μπορούν να διεξάγουν το μονοπάτι solventogenesis. Αυτά είναι μία κατηγορία των βακτηρίων του γένους Clostridium <sup>47,70</sup>.

### 5.3 Άλλα μονοπάτια μεταβολισμού της γλυκόζης

Το μονοπάτι EMP το οποίο έχει αναλυθεί έως τώρα είναι το πιο συχνό μονοπάτι μεταβολισμού της γλυκόζης. Όμως, δεν είναι το μοναδικό μονοπάτι στο οποίο μπορεί να μεταβολιστεί η γλυκόζη. Στο Σχήμα 5.2 φαίνονται όλα τα μεταβολικά μονοπάτια μεταβολισμού της γλυκόζης <sup>62</sup>.



Σχήμα 5.2: Μεταβολικά Μονοπάτια της Γλυκόζης <sup>61</sup>

Το μεταβολικό μονοπάτι Entner-Doudoroff (ED) είναι το μονοπάτι παραγωγής 2 mol αιθανόλης από ένα mol γλυκόζης και υπάρχει κυρίως σε ζύμες. Παρατηρείται σπανίως σε μικτές καλλιέργειες βακτηρίων όπως αυτές που χρησιμοποιούνται στην AX δύο σταδίων. Το μεταβολικό μονοπάτι Pentose Phosphate (PP) είναι ένα μονοπάτι παρόμοιο του EMP καθώς κάθε mol γλυκόζη μετατρέπεται σε 1/3 mol πυροσταφυλικό και 2/3 mol fructose 6-P το οποίο μπορεί να μεταβολιστεί σε πυροσταφυλικό <sup>61,62</sup>.

Τα άλλα 2 μονοπάτια που παρουσιάζονται στο Σχήμα 5.2 είναι και τα σημαντικότερα. Το μεταβολικό μονοπάτι Phosphoketolase (PK), γνωστό και ως ετερογαλακτική ζύμωση είναι ένα μονοπάτι στο οποίο παράγονται ως τελικά προϊόντα ένα μείγμα γαλακτικού οξέος και

αιθανόλης, ή σπανίως οξικού οξέος. Στο μονοπάτι αυτό, παράγεται η ένωση Xylulose 5-Phosphate μετά από 2 οξειδώσεις με αποτέλεσμα να υπάρχει περίσσεια αναγωγικού φορτίου. Η ένωση αυτή διασπάται σε Glyceraldehyde 3-Phosphate - ένωση από την οποία μπορεί να παραχθεί πυροσταφυλικό - και Acetyl-CoA. Καθώς υπάρχει πολύ αναγωγικό δυναμικό στο μονοπάτι αυτό, είναι αρκετά σπάνιο να παραχθεί οξικό οξύ, οπότε παράγεται γαλακτικό οξύ από το πυροσταφυλικό και αιθανόλη από το Acetyl-CoA. Αυτό το μονοπάτι έχει την ιδιαιτερότητα ότι λειτουργεί συνήθως σε pH 4.0-5.0, αλλά μπορεί να γίνει και σε pH κάτω από 4.0 ιδιαίτερα αποτελεσματικά <sup>61,62</sup>. Από άποψη μικροβιακής ποικιλότητας, αυτό το μονοπάτι γίνεται από διάφορα βακτήρια, κυρίως του γένους Lactobacillus, τα οποία είναι ιδιαίτερα ενεργά σε ΥΤ. Για αυτό είναι ιδιαίτερα συχνό μονοπάτι όταν χρησιμοποιείται αυτό το υπόστρωμα <sup>71,76</sup>.

Το μονοπάτι Bifidus είναι παρόμοιο του PK, καθώς και σε αυτό παράγεται 1 mol Xylulose-5-phosphate. Η βασική διαφορά είναι το πως φτάνει στην ένωση αυτή. Δεν υπάρχει κανένα οξειδωτικό βήμα, με αποτέλεσμα το αναγωγικό δυναμικό στην περίπτωση αυτή να είναι πολύ χαμηλό. Οπότε, το Acetyl-CoA θα μετατραπεί σε οξικό, ενώ το πυροσταφυλικό θα μετατραπεί σε γαλακτικό λόγω του σταδίου οξείδωσης του glyceraldehyde 3-phosphate σε πυροσταφυλικό, το οποίο δημιουργεί αναγωγικό δυναμικό που πρέπει να αξιοποιηθεί. Μία ακόμη διαφορά του μονοπατιού αυτού είναι πως ο ένας άνθρακας που αποβάλλεται για να δημιουργηθεί το Xylulose-5-phosphate δεν γίνεται CO<sub>2</sub>, αλλά μισό mol Acetyl-CoA, το οποίο μετατρέπεται και αυτό σε οξικό, με αποτέλεσμα κάθε mol γλυκόζης να δίνει 1.5 mol οξικό και 1 mol γαλακτικό. Το μονοπάτι αυτό γίνεται σε λίγο πιο υψηλά pH από το PK όπως 4.5-5.5 <sup>61,71</sup>.

## 5.4 Απόκριση της οξεογένεσης

Έχοντας εξετάσει όλα τα δυνατά μονοπάτια της οξεογενετικής ζύμωσης, φτάνει τώρα να εισαχθούν κάποια ποσοτικά στοιχεία για το πως κρίνεται η ποιότητα της οξεογένεσης. Ένα βασικό κριτήριο είναι προφανώς το προφίλ των προϊόντων <sup>76,77</sup>. Άλλωστε, αν δεν είχε σημασία το προφίλ αυτό, δεν θα υπήρχε ενδιαφέρον στον έλεγχο του μονοπατιού της οξεογένεσης. Η ποιότητα όμως του κάθε προϊόντος για την αναερόβια χώνευση θα αναλυθεί στο **Κεφάλαιο 6**.

Ένα άλλο, πιο γενικό κριτήριο για να κριθεί η οξεογένεση είναι τα **συνολικά πτητικά λιπαρά οξέα (tVFAs)**. Συγκεκριμένα, αν αυτά εκφραστούν στο ισοδύναμο COD τους, μπορούν να συγκριθούν με το sCOD. Σε μία καλή οξεογένεση, ο λόγος **συνολικά πτητικά λιπαρά οξέα (tVFAs)** προς sCOD, ο οποίος είναι γνωστός ως οξίνιση του αντιδραστήρα είναι 80 – 90% <sup>45,77</sup>.



## Κεφάλαιο 6

# Οξικογένεση και Μεθανογένεση

Στα προηγούμενα κεφάλαια αναλύθηκαν εις βάθος η υδρόλυση και η οξεογένεση, τα 2 πρώτα στάδια της **AX**, τα οποία είναι και αυτά που συνήθως διαχωρίζονται όταν η διεργασία διεξάγεται σε 2 στάδια. Συγκεκριμένα, στο **Κεφάλαιο 5** αναλύθηκαν όλα τα πιθανά μονοπάτια οξεογένεσης και τα προϊόντα του καθενός, και αναφέρθηκε πως είναι επιθυμητό να ελεγχθεί το μεταβολικό μονοπάτι που θα ακολουθηθεί, επειδή δεν είναι όλα τα προϊόντα το ίδιο χρήσιμα για την μεθανογένεση. Για να επεξηγηθεί αυτό, θα πρέπει να εξεταστεί σε βάθος ο μηχανισμός με τον οποίο διεξάγεται η μεθανογένεση, το οποίο είναι ο σκοπός του κεφαλαίου αυτού.

### 6.1 Μηχανισμός Μεθανογένεσης

Η μεθανογένεση είναι το σημαντικότερο αλλά και πιο ευαίσθητο στάδιο της αναερόβιας χώνευσης. Γίνεται από μικροοργανισμούς του κλάδου των αρχαίων, οι οποίοι είναι υποχρεωτικά αναερόβιοι μικροοργανισμοί με στενό λειτουργικό εύρος pH (περίπου 6.4-8.0). Τα αρχαία τα οποία παράγουν μεθάνιο διαχωρίζονται σε δύο βασικές κατηγορίες, τους ακετοκλαστικούς μεθανογόνους (**AM**), οι οποίοι χρησιμοποιούν το οξικό οξύ ως υπόστρωμα και τους υδρογονότροφους μεθανογόνους (**YM**), οι οποίοι ανάγκουν διοξείδιο του άνθρακα σε μεθάνιο παρουσία υδρογόνου. Σε κανονικές συνθήκες, περίπου 2/3 του μεθανίου παράγονται από τους **AM** ενώ τα υπόλοιπα από τους **YM** <sup>72,78</sup>.

Για να μπορούν να αναπτυχθούν οι μικροοργανισμοί αυτοί, πρέπει όλα τα προϊόντα της οξεογένεσης να μετατραπούν σε οξικό οξύ και υδρογόνο. Για αυτό υπάρχει το στάδιο της οξικογένεσης. Στο στάδιο αυτό, τα διάφορα προϊόντα που παράχθηκαν κατά την οξεογένεση μετατρέπονται σε οξικό οξύ, ενώ ταυτόχρονα παράγεται και υδρογόνο, καθώς όλες οι αντιδράσεις αυτές είναι οξειδωτικές. Οι περισσότερες αντιδράσεις οξικογένεσης έχουν θετική  $\Delta G$ , δηλαδή, δεν μπορούν να γίνουν αυθόρμητα <sup>79</sup>. Ο μηχανισμός με τον οποίο διεξάγονται οι αντιδράσεις αυτές είναι γνωστός ως syntrophic metabolism. Στον μηχανισμό αυτόν, οι οξικογόνοι και μεθανογόνοι μικροοργανισμοί λειτουργούν σε συνεργασία. Οι αντιδράσεις μεθανογένεσης έχουν πολύ αρνητική  $\Delta G$ , με αποτέλεσμα, το άθροισμα μίας αντίδρασης οξικογένεσης και της αντίστοιχης μεθανογένεσης να έχουν αρνητική  $\Delta G$ . Οπότε, αν οι αντιδράσεις αυτές γίνουν διαδοχικά, υπάρχει ενεργειακό όφελος για το μικροβιακό σύστημα και έτσι μπορούν να γίνουν οι αντιδράσεις της οξικογένεσης <sup>78-80</sup>.

Παρακάτω αναλύεται η θερμοδυναμική της παραγωγής μεθανίου από κάθε ένα από τα συχνά προϊόντα της οξεογένεσης.

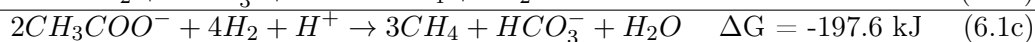
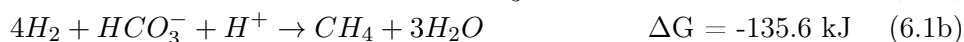
### 6.2 Θερμοδυναμική Παραγωγής Μεθανίου

Τα προϊόντα τα οποία θα συζητηθούν εδώ θα είναι τα εξής: Οξικό οξύ, προπιονικό οξύ, γαλακτικό οξύ, βουτυρικό οξύ, αιθανόλη. Τα υπόλοιπα προϊόντα που μπορούν να παραχθούν από οξεογένεση ή δεν παράγονται σε μεγάλη ποσότητα (πχ βαλερικό οξύ), ή όταν παράγονται,

ο σκοπός της διεργασίας δεν είναι η παραγωγή μεθανίου (πχ ακετόνη ή βουτανόλη) <sup>47,79,81</sup>. Ως αρχικό υπόστρωμα θα εξεταστεί η γλυκόζη, καθώς τα σάκχαρα είναι και το συχνότερο υπόστρωμα της **AX**, ενώ αντίστοιχα λειτουργεί και ο μεταβολισμός άλλων υποστρωμάτων.

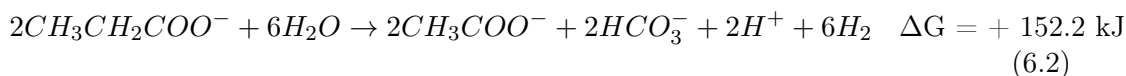
Η μετατροπή της γλυκόζης σε μεθάνιο ( $C_6H_{12}O_6 \rightarrow 3CH_4 + 3CO_2$ ) είναι μία αυθόρμητη αντίδραση με  $\Delta G = -404 \text{ kJ/mol}$  σε πρότυπες συνθήκες <sup>79</sup>. Από τον νόμο του Hess, είναι γνωστό πως η ενθαλπία (και κατ'επέκτασιν η ελεύθερη ενέργεια Gibbs) μίας αντίδρασης είναι ίδια ανεξαρτήτως του μονοπατιού με το οποίο έγινε η αντίδραση. Οπότε, ανεξαρτήτως του ενδιαμέσου, το σύστημα της **AX** θα παράγει αυτή την ενέργεια για αυτήν την μετατροπή. Όμως, όσο πιο κοντά στο 0 είναι το άθροισμα των  $\Delta G$  της οξεικογένεσης και μεθανογένεσης, τόσο πιο δύσκολο είναι να ολοκληρωθεί η αντίδραση με βάση το μονοπάτι αυτό, με αποτέλεσμα η **AX** να μην λειτουργεί σωστά. Ακόμη, οι  $\Delta G$  που θα αναφερθούν παρακάτω είναι σε πρότυπες συνθήκες. Σε διαφορετικά pH (δηλαδή συγκέντρωση υδρογονοκατιόντων) ή σε διαφορετική συγκέντρωση του κάθε προϊόντος, μπορεί η  $\Delta G$  της αντίδρασης να είναι διαφορετική. Οπότε, αν είναι κοντά στο 0 σε πρότυπες συνθήκες, είναι πιθανόν να υπάρχει συνθήκη όπου η αντίδραση δεν μπορεί πλέον να συνεχίσει.

1. Οξικό Οξύ: Το οξικό οξύ είναι το ιδανικό υπόστρωμα για μεθανογένεση καθώς είναι το μόνο που μεταβολίζεται απευθείας σε μεθάνιο. Οι αντιδράσεις μεθανογένεσης που διεξάγονται είναι οι



με αποτέλεσμα το στάδιο αυτό να είναι αυθόρμητο με  $\Delta G = -197.6 \text{ kJ}$ , δηλαδή σχεδόν η μισή ενέργεια που παράγεται κατά την μετατροπή της γλυκόζης σε μεθάνιο να οφείλεται στην μεθανογένεση (αξίζει να αναφερθεί πως οι συντελεστές είναι με βάση τις ποσότητες που παράγει 1 mol γλυκόζη) <sup>79</sup>.

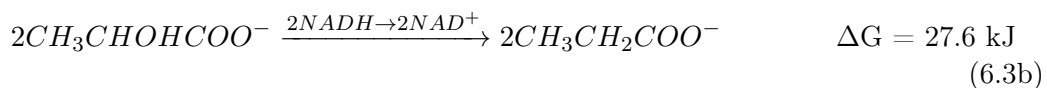
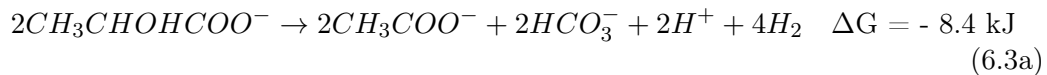
2. Προπιονικό Οξύ: Το προπιονικό οξύ είναι συχνό αναγωγικό προϊόν του μεταβολισμού του πυροσταφυλικού οξέος και παρατηρείται συχνά στην **AX** <sup>70,74</sup>. Εκτός από τις αντιδράσεις **6.1a**, **6.1b**, γίνεται και η αντίδραση



με αποτέλεσμα, το άθροισμα οξειογένεσης και μεθανογένεσης να είναι  $-45.4 \text{ kJ}$  και μόνο ένα 11.4% της συνολικής ενέργειας να οφείλεται στην μεθανογένεση. Η αντίδραση αυτή παραμένει αυθόρμητη, όμως αποτελεί μία πολύ πιο δύσκολη αντίδραση, διότι οι μεθανογόνοι σπαταλούν πολύ περισσότερη ενέργεια για να διεξαχθεί <sup>72,79</sup>. Επιπλέον, σε συνθήκες μακριά από τις πρότυπες (πχ μεγάλη μερική πίεση υδρογόνου ή πολύ όξινο περιβάλλον), η  $\Delta G$  την αντίδρασης **6.2** θα είναι ακόμη μεγαλύτερη, με αποτέλεσμα το άθροισμα να είναι ακόμη πιο κοντά στο 0. Σε ακραίες περιπτώσεις, έχει παρατηρηθεί και κατάρρευση του συστήματος της **AX** επειδή έχει παραχθεί πολύ προπιονικό οξύ και στις συνθήκες που υπάρχουν, δεν μπορεί να μετατραπεί σε μεθάνιο. Οπότε, το προπιονικό οξύ είναι γενικά ένα αρκετά ανεπιθύμητο προϊόν <sup>79,82,83</sup>. Όμως, καθώς αποτελεί το βασικότερο αναγωγικό προϊόν της οξειογένεσης, συχνά δεν μπορεί να αποφευχθεί πλήρως <sup>70</sup>. Στην βιβλιογραφία, έχουν προταθεί τρόποι για να γίνει πιο εύκολη η αντίδραση αυτή και να μην αναστέλλει το σύστημα, όπως η προσθήκη σιδήρου μηδενικού σθένους (**ZVI**), ο οποίος μειώνει αρκετά το **redox** του αντιδραστήρα, το οποίο κάνει πολύ

πιο αρνητικό το  $\Delta G$  της αντίδρασης <sup>84</sup> αλλά και άλλες τεχνολογίες όπως η προσθήκη κάποιου buffer, ή απαραίτητων ιχνοστοιχείων για να γίνει πιο αποτελεσματική η αντίδραση <sup>72</sup>.

3. Γαλακτικό Οξύ: Ένα άλλο συχνό αναγωγικό προϊόν είναι το γαλακτικό οξύ, το οποίο όπως αναφέρθηκε, παράγεται σε μεγάλες ποσότητες κατά την ζύμωση **ΥΤ** <sup>71,76</sup>. Το γαλακτικό οξύ είναι ένα ενδιαφέρον ενδιάμεσο για την **ΑΧ** καθώς η αναγωγή του σε προπιονικό οξύ και η οξειδωση του σε οξικό οξύ είναι αντιδράσεις οι οποίες είναι κοντά στην ισορροπία. Σε πρότυπες συνθήκες είναι οι εξής: <sup>79,85</sup>

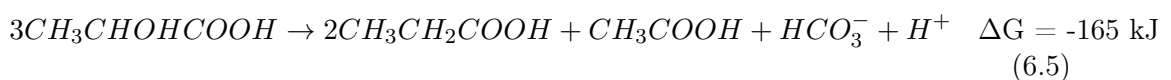


Επίσης υπενθυμίζεται πως το ζεύγος **NADH** με **NAD<sup>+</sup>** είναι ένα οξειδωαναγωγικό ζεύγος με την ισορροπία



Οπότε, παρόλο που η **6.3a** είναι μία αρκετά επιθυμητή αντίδραση ( $\Delta G < 0$ ), ο συνδυασμός των **6.3b** και **6.4** είναι πιο θερμοδυναμικά επιθυμητός σε πρότυπες συνθήκες (οι δύο αντιδράσεις αυτές έχουν  $\Delta G = -16 \text{ kJ}$  σε πρότυπες συνθήκες ενώ η **6.3a** έχει  $\Delta G = -8.4 \text{ kJ}$ ). Επιπλέον, αν οι συνθήκες απομακρυνθούν από τις πρότυπες, είναι πιο συχνό το περιβάλλον να γίνει πιο αναγωγικό και άρα να ευνοείται ακόμη περισσότερο η **6.3b** (καθώς πολλές αντιδράσεις στην **ΑΧ** παράγουν υδρογόνο το οποίο είναι αναγωγικό μέσο).

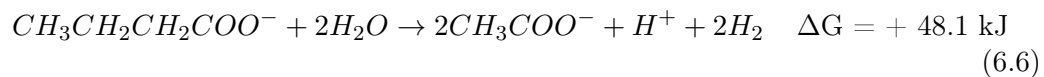
Όμως, για την οξειδωση του γαλακτικού οξέος σε οξικό οξύ είναι σημαντικό και το syntrophic metabolism με τους μεθανογόνους, καθώς οι αντιδράσεις μεθανογένεσης του οξικού οξέος και του υδρογόνου που παράγονται θα προσφέρουν πολύ περισσότερη ενέργεια στο σύστημα (-197.6 kJ). Στην πράξη, καθώς και τα δύο μονοπάτια είναι αυθόρμητα, ο πιο συχνός μεταβολισμός του γαλακτικού οξέος είναι ένας μικτός μεταβολισμός με βάση την αντίδραση



Η αντίδραση αυτή είναι μία οξειδωαναγωγική αντίδραση όπου τα υδρογόνα της **6.3a** χρησιμοποιούνται για την **6.3b** με αποτέλεσμα η συνολική αντίδραση να είναι ιδιαίτερα θερμοδυναμικά επιθυμητή <sup>85</sup>.

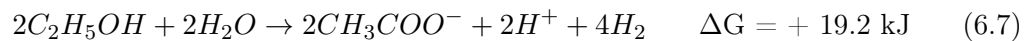
Οπότε, το γαλακτικό οξύ δεν είναι ένα ιδιαίτερα επιθυμητό ενδιάμεσο, λόγω της πιθανότητας να μεταβληστεί σε προπιονικό <sup>79</sup>, αλλά υπό τις κατάλληλες συνθήκες αποτελεί ένα πολύ καλό ενδιάμεσο της διεργασίας και κάποιες μελέτες έχουν δείξει πολύ καλή απόδοση στην **ΑΧ** από υπόστρωμα πλούσιο σε γαλακτικό <sup>76,84</sup>.

4. Βουτυρικό Οξύ: Το βουτυρικό οξύ είναι ένα ακόμη σύνηθες προϊόν της οξεογένεσης <sup>70,77</sup>. Η οξικογένεση του βουτυρικού είναι η αντίδραση



Η αντίδραση αυτή δεν είναι αυθόρμητη σε πρότυπες συνθήκες, αλλά σε syntrophic metabolism με τις αντιδράσεις 6.1 έχει ένα τελικό  $\Delta G = -149.5 \text{ kJ}$  <sup>79,85</sup>. Γενικά το βουτυρικό οξύ είναι ένα προϊόν το οποίο μετατρέπεται εύκολα σε μεθάνιο λόγω αυτού και υπάρχουν μελέτες που έχουν δείξει πως είναι ένα από τα πιο επιθυμητά προϊόντα της οξειογένεσης <sup>70,77,83</sup>.

5. Αιθανόλη: Η αιθανόλη είναι το τελευταίο προϊόν το οποίο θα εξεταστεί. Αποτελεί ένα αναγωγικό προϊόν του Acetyl-CoA που παράγεται ως συμπροϊόν του οξικού οξέος σε χαμηλά pH <sup>61,70</sup>. Η αιθανόλη μπορεί να μετατραπεί σε οξικό αρκετά εύκολα για τον λόγο αυτό. Η αντίστοιχη αντίδραση είναι η



η οποία έχει θετική αλλά χαμηλή  $\Delta G$  με αποτέλεσμα σε συνδυασμό με τις αντιδράσεις 6.1 να έχει  $\Delta G = -178.4 \text{ kJ}$ , το οποίο καθιστά την μετατροπή της αιθανόλης σε μεθάνιο αρκετά εύκολη. Ακόμη, σε ορισμένες συνθήκες (χαμηλή μερική πίεση υδρογόνου, υψηλή συγκέντρωση αιθανόλης) μπορεί η αντίδραση αυτή να γίνει αυθόρμητη και από μόνη της και να παρατηρηθεί οξικογένεση χωρίς syntrophic metabolism <sup>79,85</sup>.

Εκτός από το γεγονός ότι είναι ένα ενδιάμεσο που μετατρέπεται εύκολα σε μεθάνιο και άρα είναι καλό για μεθανογένεση <sup>76,86</sup>, η αιθανόλη έχει δείξει να βελτιώνει την ρυθμιστική ικανότητα του αντιδραστήρα <sup>87</sup> και να προάγει το μεταβολικό μονοπάτι **direct interspecies electron transfer - απευθείας διαστοιχειακή μεταφορά ηλεκτρονίων (DIET)** για την μεθανογένεση, το οποίο είναι ενεργειακά πολύ αποτελεσματικό <sup>88-90</sup>. Τα πλεονεκτήματα του μονοπατιού αυτού έναντι του συμβατικού (**interspecies hydrogen transfer - διαστοιχειακή μεταφορά υδρογόνου (IHT)**) θα αναλυθούν περισσότερο παρακάτω.

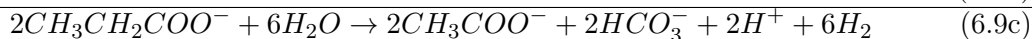
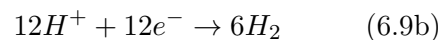
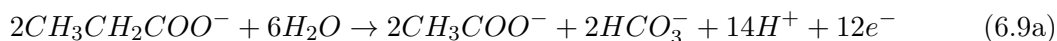
### 6.3 Πλεονεκτήματα του Direct Interspecies Electron Transfer στην Μεθανογένεση

Το συμβατικό μοντέλο syntrophic metabolism μεταξύ των οξικογόνων μικροοργανισμών και των μεθανογόνων, βασίζεται στην παραγωγή οξικού οξέος αλλά και υδρογόνου, η μεθανογένεση των οποίων προσφέρει στο σύστημα την απαιτούμενη ενέργεια για να λειτουργήσει <sup>79,85</sup>. Ο ρόλος του υδρογόνου είναι η αναγωγή του  $CO_2$  σε  $CH_4$ . Ένα αναγωγικό μέσο είναι μία ένωση που προσφέρει ηλεκτρόνια σε άλλες ενώσεις. Οπότε, ουσιαστικά το υδρογόνο δρα ως ένας φορέας ηλεκτρονίων τον οποίο δημιουργούν οι οξικογόνοι για να επιτρέψουν αναγωγικές αντιδράσεις στους μεθανογόνους. Ο μηχανισμός αυτός λέγεται **interspecies hydrogen transfer - διαστοιχειακή μεταφορά υδρογόνου (IHT)** <sup>85,90</sup>.

Όμως, το υδρογόνο δεν αποτελεί το κύριο προϊόν της οξειδωσης. Το κύριο προϊόν μίας οξειδωτικής αντίδρασης είναι τα ηλεκτρόνια, τα οποία παράγουν το υδρογόνο για να μεταφέρουν την αναγωγική τους ιδιότητα σε κάποια ένωση. Στην πράξη, όλες οι οξικογενετικές αντιδράσεις είναι οξειδωαναγωγικές αντιδράσεις, των οποίων η αναγωγική ημί-αντίδραση είναι η



Για παράδειγμα, η οξικογένεση από προπιονικό οξύ είναι στην ουσία το άθροισμα των αντιδράσεων



Το πρόβλημα, έγκειται στο γεγονός ότι η θερμοδυναμική ευνοεί τον ιοντισμό του υδρογόνου σε υδρογονοκατιόντα και ηλεκτρόνια, αλλά δεν ευνοεί την αντιστροφή της αντίδρασης αυτής. Σε μία παρόμοια λογική με παραπάνω, η αντίδραση αυτή γίνεται επειδή το σύστημα θα κερδίσει ενέργεια αν παραχθεί υδρογόνο, μεταφερθεί στους **YM** και αυτοί το μεταβολίσουν. Όμως, αν μπορούσαν να μεταφερθούν απευθείας τα ηλεκτρόνια και να ανάγουν αυτά το  $\text{CO}_2$  κατά την μεθανογένεση, το σύστημα θα ήταν πολύ πιο αποδοτικό ενεργειακά <sup>90</sup>.

Αυτό είναι το μεταβολικό μονοπάτι **direct interspecies electron transfer - απευθείας διαστοιχειακή μεταφορά ηλεκτρονίων (DIET)**, στο οποίο παρακάμπτεται η παραγωγή υδρογόνου και τα ηλεκτρόνια μεταφέρονται απευθείας. Το μονοπάτι αυτό παρατηρήθηκε πρώτη φορά μεταξύ του ζεύγους μικροοργανισμών των γενών *Geobacter* (οξικογόνοι) και *Methanosaeta* (ακετοκλαστικοί μεθανογόνοι) κατά την επεξεργασία υγρών αποβλήτων ζυθοποιίας <sup>90</sup>. Με μία μικροβιακή ανάλυση, παρατηρήθηκε πως οι **YM** ήταν λιγότερο από 1% των αρχαίων, όμως, ενώσεις όπως η αιθανόλη μεταβολιζόντουσαν κανονικά. Ακόμη, η παραγωγή μεθανίου ήταν περισσότερη από ότι θα μπορούσε να είναι αν μόνο το οξικό μετατρεπόταν σε μεθάνιο. Μετά από διερεύνηση, βρέθηκαν γονίδια αναγωγής του  $\text{CO}_2$ , παρότι η αναγωγή δεν γινόταν από υδρογόνο. Οπότε, υποτέθηκε πως τα ηλεκτρόνια μεταφέρονται απευθείας από την μία ομάδα μικροοργανισμών στην άλλη.

Μετά την δημοσίευση αυτή, έγινε πολύ περισσότερη έρευνα πάνω στον μηχανισμό αυτόν. Βρέθηκε πως και άλλοι μικροοργανισμοί μπορούν να συμμετέχουν σε αυτόν τον μεταβολισμό <sup>91</sup> και διαπιστώθηκε πειραματικά πως ο λόγος που βρέθηκε πρώτα σε απόβλητα ζυθοποιίας είναι επειδή η αιθανόλη ενεργοποιεί το μονοπάτι αυτό, όχι μόνο αν υπάρχει εξαρχής εκεί, αλλά και στην περίπτωση που γίνει ένα ethanol-type fermentation κατά την οξεογένεση <sup>89,92,93</sup>. Αυτό είναι ιδιαίτερα ενδιαφέρον για όξια απόβλητα όπως τα **YT** επειδή σε μία αναερόβια χώνευση σε 2 στάδια, είναι συχνό ένα από τα κύρια προϊόντα της οξεογένεσης να είναι η αιθανόλη και άρα να ενεργοποιηθεί το **DIET** <sup>68,88</sup>. Ακόμη, βρέθηκε πως εκτός από την αιθανόλη, η προσθήκη αγώγιμων ενώσεων ή πρόσθετων μπορεί να ενεργοποιήσει και να ενισχύσει το μονοπάτι αυτό για ακόμη καλύτερη αποδοτικότητα. Υλικά όπως ο ενεργός άνθρακας, το biochar ή ο **ZVI** μελετήθηκαν στην διεργασία αυτή και φάνηκε πως την βελτιώνουν <sup>68,88,94</sup>.

Εκτός όμως από τα πλεονεκτήματα του **DIET** ενεργειακά, έχει παρατηρηθεί πως μπορεί να βοηθήσει και στην ρυθμιστική ικανότητα του αντιδραστήρα <sup>87,88</sup> αλλά και στην αντοχή του σε μεγάλες συγκεντρώσεις **VFAs**, υψηλά **OLR** και υψηλή μερική πίεση υδρογόνου. Ως αποτέλεσμα, η μεθανογένεση μέσω του **DIET** είναι πολύ πιο σταθερή, εκτός από αποτελεσματική <sup>92,94,95</sup>.

## 6.4 Απόκριση της μεθανογένεσης

Παραπάνω αναφέρθηκε η ποιότητα του κάθε προϊόντος για την μεθανογένεση σε θεωρητικό επίπεδο. Στην πράξη, για να μετρηθεί η ποιότητα ενός υποστρώματος για μεθανογένεση, χρησιμοποιείται το **biochemical methane potential - βιοχημικό δυναμικό μεθανίου (BMP)** ή κάποια άλλη παρόμοια δοκιμή. Σκοπός αυτών είναι μία batch δοκιμή στην οποία μπορεί να υπάρξει εύκολη παρατήρηση της αναερόβιας χώνευσης και μπορούν να εξεταστούν πολλά υποστρώματα ταυτόχρονα. Έτσι, μπορεί να γίνει μία ανάλυση της μέγιστης ποσότητας μεθανίου που μπορεί να παράξει κάθε υπόστρωμα (είτε ανά gCOD που καταναλώνεται ή ανά

gVS λάσπης του αντιδραστήρα) καθώς και του ρυθμού παραγωγής τους. Έτσι, μπορεί να προκύψει το βέλτιστο υπόστρωμα από όσα θα εξεταστούν <sup>76,77,96,97</sup>.

Στην περίπτωση του ρυθμού παραγωγής, ο προσδιορισμός αυτού απαιτεί την επιλογή ενός κινητικού μοντέλου. Για αυτό έχουν προταθεί πολλά μοντέλα, όπως το λογιστικό μοντέλο, το μοντέλο κώνου, το μοντέλο Richards και το μοντέλο Gompertz <sup>76,87,98,99</sup>. Έχει αποδειχθεί πως το μοντέλο Gompertz, το οποίο περιγράφεται από την εξίσωση 6.10

$$y = a \exp[-\exp(b - cx)] \quad (6.10)$$

είναι ένα μοντέλο το οποίο έχει την απαραίτητη πολυπλοκότητα για να περιγράψει πολύ αναλυτικά την βακτηριδιακή ανάπτυξη (σε αντίθεση με απλούστερα μοντέλα όπως το λογιστικό), ενώ μοντέλα με μεγαλύτερη πολυπλοκότητα (πχ περισσότερες παραμέτρους όπως το μοντέλο Richards) δεν βελτιώνουν ιδιαίτερα την απόδοση της προσαρμογής <sup>98</sup>. Συγκεκριμένα, οι συγγραφείς αυτού προτείνουν μία τροποποίηση του μοντέλου ώστε οι 3 σταθερές του να αποκτήσουν φυσικό νόημα. Η εξίσωση που προκύπτει είναι η

$$y = A \exp \left[ -\exp \left( \frac{\mu_{\max} e}{A} (\lambda - t) + 1 \right) \right] \quad (6.11)$$

στην οποία η σταθερά A είναι το πλατό της καμπύλης της μικροβιακής ανάπτυξης (στάσιμη φάση), η σταθερά  $\mu_{\max}$  είναι ο μέγιστος ειδικός ρυθμός ανάπτυξης της μικροβιακής διεργασίας και  $\lambda$  ο χρόνος υστέρησης της.

Το μοντέλο αυτό έχει χρησιμοποιηθεί ευρέως για την μοντελοποίηση της μεθανογένεσης με πολύ καλά αποτελέσματα <sup>32,45,76,97,100</sup>.

Μέρος II  
Πειραματικό Μέρος



## Κεφάλαιο 7

# Υλικά και Μέθοδοι

### 7.1 Υπόστρωμα και Εμβόλιο

Τα **ΥΤ** που χρησιμοποιήθηκαν συλλέχθηκαν από την φοιτητική λέσχη του Εθνικού Μετσόβιου Πολυτεχνείου και αποθηκεύτηκαν στους  $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$  για περαιτέρω χρήση. Για τα εργαστηριακά πειράματα, όπου χρειάστηκε μικρή ποσότητα υποστρώματος ανά πείραμα, συλλέχθηκαν τρόφιμα μίας ημέρας και τεμαχίστηκαν σε μπλέντερ (Cecotec Powder Black Titanium 2000). Έτσι, επιτεύχθηκε μία ομοιόμορφη ημιστερεή φάση η οποία μπορεί να χρησιμοποιηθεί ως υπόστρωμα για τα πειράματα της υδρόλυσης. Το υλικό αυτό αναλύθηκε ως προς το pH, την ηλεκτρική αγωγιμότητα, τα στερεά, την πυκνότητα και το **chemical oxygen demand - χημικά απαιτούμενο οξυγόνο (COD)**. Η σύσταση του φαίνεται στον πίνακα 7.1. Στην διάταξη της πιλοτικής κλίμακας, ο τεμαχισμός δεν ήταν απαραίτητος καθώς ο αντιδραστήρας είχε την δυνατότητα αυτή. Λόγω των ποσοτήτων που χρειαζόντουσαν, υπήρχε καθημερινή συλλογή **ΥΤ**, τα χαρακτηριστικά των οποίων δεν αναλύθηκαν.

Πίνακας 7.1: Χαρακτηριστικά Υπολειμμάτων Τροφών

Παράμετροι	Τιμή
pH	$4.62 \pm 0.02$
EC ( $\mu\text{S}/\text{cm}$ )	$1817.7 \pm 38.0$
TS (%)	$11.54 \pm 2.18$
VS (%)	$10.93 \pm 2.07$
VS/TS (%)	$94.70 \pm 4.46$
Density ( $\text{g}/\text{mL}$ )	$1.03 \pm 0.01$
sCOD ( $\text{mg}/\text{L}$ )	$20009 \pm 1980$
tCOD ( $\text{mg}/\text{L}$ )	$96031 \pm 2204$
sCOD/tCOD(%)	$20.82 \pm 1.58$

Τα **ΥΤ** που χρησιμοποιήθηκαν ήταν αρκετά όξινα με  $\text{pH} = 4.62$ , το οποίο είναι αρκετά σύνηθες για **ΥΤ**, ιδιαίτερα αν αυτά είναι πλούσια σε φρούτα και λαχανικά, κάτι το οποίο ίσχυε για τα υπολείμματα αυτά <sup>38</sup>. Η υγρασία των **ΥΤ** ήταν 88.5% καθώς 11.5% της μάζας τους ήταν στερεά, το 95% των οποίων ήταν πτητικά. Αυτή είναι γενικά μία μεγάλη υγρασία, αλλά μπορεί να εξηγηθεί και αυτή λόγω της μεγάλης ποσότητας φρούτων και λαχανικών στα **ΥΤ** που συλλέχθηκαν <sup>38,58,76</sup>. Ως προς την οργανική ύλη, τα **ΥΤ** αυτά ήταν πλούσια σε διαλυτή οργανική ύλη (sCOD) αλλά το μεγαλύτερο ποσοστό της οργανικής ύλης ήταν σε αδιάλυτη μορφή, καθώς ο λόγος sCOD/tCOD ήταν 20.82%. Αυτό είναι στα αναμενόμενα πλαίσια για **ΥΤ** καθώς συνήθως ο λόγος αυτός είναι περίπου 15 – 20% <sup>76</sup>.

Το **σκεύασμα ενζύμων και μικροοργανισμών (μιξ)** που χρησιμοποιήθηκε είναι το εμπορικό σκεύασμα PROGEN L 100 της εταιρείας NCR Biochemical. Το σκεύασμα αυτό έχει ειδικά επιλεγμένους μικροοργανισμούς του γένους Bacillus οι οποίοι είναι ιδιαίτερα ενεργοί και εί-



να ικανοί να μεταβολίσουν οργανικά απόβλητα. Ιδιαίτερη έμφαση δίνεται στον μεταβολισμό λιπαρών ενώσεων, οι οποίες είναι και αυτές που δημιουργούν πρόβλημα σε βιολογικές δράσεις αν δεν αποδομηθούν<sup>50</sup>. Καθώς το σκεύασμα είναι εμπλουτισμένο και με ένζυμα, εκτός από μικροοργανισμούς, είναι σε θέση να υδρολύσει τα μακρομόρια των ΥΤ και στη συνέχεια να μεταβολίσει τα υδρολύματα αρκετά γρήγορα. Αυτό το κάνει ιδανικό για την πιο αποτελεσματική εκκίνηση ή την υποβοήθηση μίας βιολογικής δράσης, όπως για παράδειγμα η αναερόβια χώνευση. Είναι φιλικό προς το περιβάλλον καθώς οι μικροοργανισμοί που περιέχει επηρεάζουν θετικά το οικοσύστημα στο οποίο θα απορριφθούν.

Για την **AX** χρησιμοποιήθηκε αναερόβια λάσπη προερχόμενη από τρεις διαφορετικές πηγές. Η πρώτη λάσπη (Λάσπη 1) από το **κέντρο επεξεργασίας λυμάτων (ΚΕΛ)** των βορείων προαστίων της Αττικής, η δεύτερη (Λάσπη 2) από μονάδα ανακύκλωσης απορριμάτων στην Βοιωτία και η τρίτη (Λάσπη 3) από αναερόβιο χωνευτήρα εγκατεστημένο σε βιομηχανία τροφίμων στην Αττική. Οι λάσπες αυτές αναλύθηκαν ως προς τα στερεά, το pH και την αλκαλικότητα. Τα αποτελέσματα των αναλύσεων αυτών φαίνονται στον πίνακα 7.2.

Πίνακας 7.2: Χαρακτηριστικά Λάσπης

Παράμετροι	Λάσπη 1	Λάσπη 2	Λάσπη 3
TS (g/kg)	46.277 ± 0.033	25.546 ± 0.238	4.315 ± 0.151
VS (g/kg)	12.364 ± 0.322	16.148 ± 0.704	2.001 ± 0.072
VS/TS (%)	26.72 ± 0.72	63.23 ± 3.34	46.38 ± 0.05
pH	8.33 ± 0.01	8.90 ± 0.07	7.50 ± 0.03
Αλκαλικότητα (mg/L)	12250	14200	1100

Οι 2 πρώτες λάσπες είναι παρόμοιες. Έχουν πολλά στερεά, αλκαλικό pH και πολύ μεγάλη αλκαλικότητα. Η βασική τους διαφορά είναι πως η Λάσπη 1 έχει πολύ χαμηλά VS, καθώς η αναμενόμενη αναλογία VS/TS είναι περίπου 40 – 60%<sup>38,76,77</sup>. Η αλκαλικότητα της λάσπης εκφράζει την δυσκολία να μεταβληθεί το pH της. Η μεγάλη αλκαλικότητα είναι ένας θετικός παράγοντας καθώς το υπόστρωμα που χρησιμοποιείται είναι αρκετά όξινο (pH < 4) και το pH μειώνεται περαιτέρω με την πάροδο της αναερόβιας χώνευσης. Οπότε, θα παρατηρηθεί μόνο μικρή μείωση του pH με την πάροδο της αναερόβιας χώνευσης. Αυτή είναι επιθυμητή καθώς η βέλτιστη λειτουργία της **AX** είναι σε pH πιο κοντά στο ουδέτερο, αλλά η υψηλή αλκαλικότητα επιβεβαιώνει την σταθερή λειτουργία της διεργασίας.

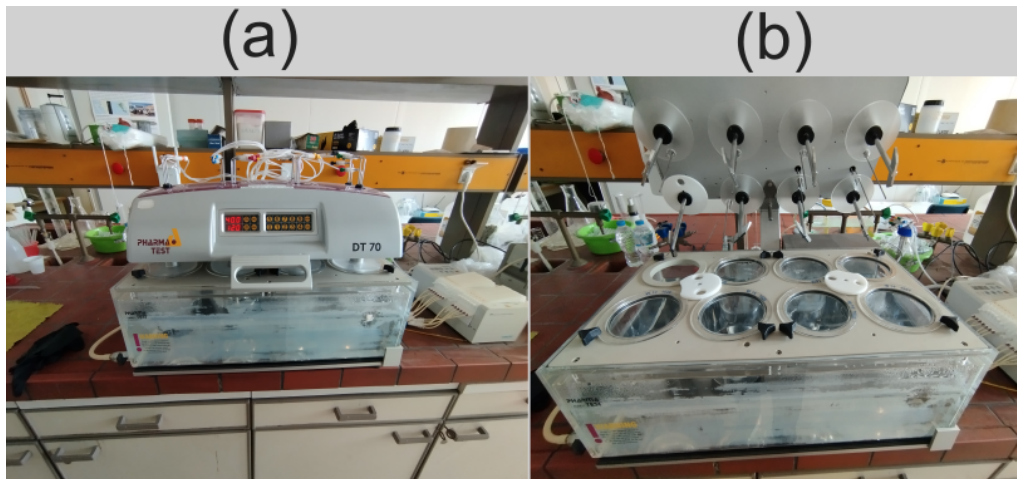
Η Λάσπη 3 είναι κοκκώδης λάσπη από αντιδραστήρα **UASB**. Έχει πολύ χαμηλότερα στερεά, χαμηλή αλκαλικότητα και pH κοντά στο ουδέτερο. Όμως, καθώς είναι κοκκώδη, θεωρείται πως έχει υψηλή ενεργότητα και μεγαλύτερη ανοχή στο pH, καθώς οι ευαίσθητοι μεθανογόνοι μικροοργανισμοί είναι σχετικά προστατευμένοι μέσα στους κόκκους από τους λιγότερο ευαίσθητους μικροοργανισμούς<sup>38,58</sup>.

## 7.2 Πειραματική διάταξη υδρόλυσης εργαστηριακής κλίμακας

Τα πειράματα υδρόλυσης/βιοαποδόμησης σε εργαστηριακή κλίμακα έγιναν στο όργανο DT70 της PHARMA TEST. Η διάταξη αυτού φαίνεται στο Σχήμα 7.1.

Συγκεκριμένα, το σύστημα αυτό αποτελείται από 7 ανεξάρτητα δοχεία χωρητικότητας 1 L, τα οποία είναι τοποθετημένα σε υδατόλουτρο για ρύθμιση της θερμοκρασίας και είναι εξοπλισμένα με αναδευτήρες τύπου κουπιού (Σχήμα 7.1 (b)). Η θερμοκρασία και η ανάδευση ρυθμίζονται από μία οθόνη την οποία διαθέτει το μηχάνημα (Σχήμα 7.1 (a)).

Ένα από τα βασικά πλεονεκτήματα μίας τέτοιας διάταξης είναι η ευκολία να δοκιμαστούν ταυτόχρονα πολλές λειτουργικές συνθήκες, καθώς το κάθε δοχείο λειτουργεί ανεξάρτητα. Έτσι, αποτελεί μία ιδανική διάταξη για την εξέταση και βελτιστοποίηση μίας τέτοιας διεργασίας. Ένα μειονέκτημα της διάταξης είναι ότι δεν μπορεί να λειτουργήσει πλήρως αναερόβια,



Σχήμα 7.1: Πειραματική Διάταξη Υδρόλυσης Εργαστηριακής Κλίμακας

κάτι το οποίο θα ήταν επιθυμητό, καθώς η οξεογένεση είναι μία αναερόβια δράση. Όμως, με βάση την βιβλιογραφία (Ενότητα 4.3), τα υδρολυτικά και οξεογενετικά βακτήρια, όπως αυτά που έχουν επιλεγεί στη παρούσα μελέτη, είναι προαιρετικά αναερόβια. Μάλιστα, αρκετές μελέτες έχουν δείξει πως ο μικροαερισμός, δηλαδή η προσθήκη μικρής ποσότητας οξυγόνου στην πρώτη φάση μίας αναερόβιας χώνευσης δύο σταδίων, μπορεί να ευνοήσει την διεργασία. Συγκεκριμένα, έχει παρατηρηθεί πως η προσθήκη αυτή βελτιώνει την μικροβιακή ποικιλότητα του αντιδραστήρα, αυξάνει την απόδοση της υδρόλυσης και δεν δημιουργεί προβλήματα στο επερχόμενο στάδιο της μεθανογένεσης, το οποίο είναι υποχρεωτικά αναερόβιο <sup>43,57</sup>.

### 7.3 Δοκιμαστικά πειράματα υδρόλυσης

Για να αποφανθούν οι σημαντικότερες συνθήκες λειτουργίας της διεργασίας υδρόλυσης/βιοαποδόμησης έγιναν κάποια δοκιμαστικά πειράματα.

Το πρώτο δοκιμαστικό πείραμα χρησιμοποίησε τα **suspended solids - αιωρούμενα στερεά (SS)** και το **διαλυτό COD (sCOD)** ως βασικές αποκρίσεις. Για τις μετρήσεις αυτές, γινόταν διήθηση του δείγματος από τον αντιδραστήρα. Από το διήθημα μετρήθηκε το **sCOD** ενώ από το στερεό υπόλειμμα τα **SS** με βάση τις μεθοδολογίες που παρουσιάζονται στην Ενότητα 7.8. Η λογική αυτού ήταν πως τα **SS** θα πρέπει να μειώνονται καθώς γίνεται υδρόλυση, ενώ δεν θα επηρεάζονται από αυξήσεις που οφείλονται στην ανάπτυξη των μικροοργανισμών και το **sCOD** θα αυξάνεται καθώς γίνεται υδρόλυση και η στερεή οργανική ύλη διαλύεται. Εξετάστηκαν διαφορετικές αναλογίες **ΥΤ-νερού** (1:1, 1:2 και 1:3), κρατώντας την ποσότητα **ΥΤ** σταθερή στα 200 g, σε υγρή βάση, για να βρεθεί αν το μείγμα παραμένει ομοιογενές και μπορεί να παρατηρηθεί ικανοποιητική υδρόλυση. Η ανάδευση ρυθμίστηκε στα 120 rpm, όπου παρατηρήθηκε πως όλα τα μίγματα αναδεύοντουσαν αποτελεσματικά. Η θερμοκρασία ρυθμίστηκε στους 45 °C, καθώς οι διεργασίες ενζυμικής υδρόλυσης είναι συνήθως αποδοτικές σε θερμοκρασίες κοντά στους 50 °C.

Διαπιστώθηκε πως τα **suspended solids - αιωρούμενα στερεά (SS)** μειώνονται σε 24 ώρες, αλλά και το **sCOD** μειώθηκε. Έτσι, προέκυψε το συμπέρασμα πως η υδρόλυση και η ζύμωση διεξάγονται ταυτόχρονα και η ζύμωση έχει γρηγορότερο ρυθμό (εφόσον υπάρχει μείωση στερεών αλλά και μείωση **sCOD**). Επίσης, παρατηρήθηκαν προβλήματα στην διεξαγωγή της διήθησης στις αραιώσεις 1:1 και 1:2, οπότε για όλα τα επόμενα πειράματα χρησιμοποιήθηκε η αραιώση 1:3.

Για να μελετηθεί πιο αναλυτικά η αλληλεπίδραση των δύο διεργασιών (υδρόλυση και ζύμωση) και να επιλεγθούν οι κατάλληλες συνθήκες για έναν πειραματικό σχεδιασμό βελτιστοποίησης, έγινε ένα δεύτερο πείραμα. Στο πείραμα αυτό χρησιμοποιήθηκαν 2 επαναλήψεις του ίδιου

πειράματος (για να μελετηθεί η επαναληψιμότητα της διεργασίας), στο οποίο χρησιμοποιήθηκε αναλογία **ΥΤ**-νερού 1:3 και ανάδευση 120 rpm, όπως επιλέχθηκαν από το προηγούμενο πείραμα. Η θερμοκρασία ρυθμίστηκε στους 45 °C και προστέθηκαν 2 mL **μιξ**. Ως μεταβλητές απόκρισης, δοκιμάστηκαν οι εξής: **SS** (ολικά και πτητικά), **sCOD**, συγκέντρωση σακχάρων και συγκέντρωση προϊόντων οξεογενούς ζύμωσης (συγκεκριμένα μετρήθηκαν γαλακτικό οξύ, οξικό οξύ, προπιονικό οξύ και αιθανόλη). Για να αποφασισθεί η διάρκεια της διεργασίας υδρόλυσης/βιοαποδόμησης, η δειγματοληψία στο πείραμα αυτό ήταν συχνή. Συγκεκριμένα, την πρώτη μέρα έγινε δειγματοληψία στις 0, 1, 2, 3, 4, 5, 6 ώρες ενώ τις επόμενες 4 ημέρες, γινόταν δειγματοληψία κάθε 2 ώρες για 6 ώρες. Στο 2ο δείγμα (που χρησιμοποιείται για επανάληψη) δεν έγιναν οι συχνές δειγματοληψίες την πρώτη μέρα, αλλά μόνο δειγματοληψίες στις 0, 1 και 5 ώρες. Καθώς παρατηρήθηκαν αλλαγές μέχρι και την 5η μέρα (98 ώρες), το πείραμα αυτό αφέθηκε να λειτουργήσει και πάρθηκαν 2 τελευταία δείγματα στις 167 και 171 ώρες για να διαπιστωθεί αν θα παρατηρηθεί κάποιο πλατό.

Τέλος, έγινε ένα τρίτο πείραμα, όπου μετρήθηκε κατά βάση η εξάτμιση του νερού, η οποία παρατηρήθηκε πως έπαιξε σημαντικό ρόλο στα προηγούμενα πειράματα. Συγκεκριμένα, καθώς η διάταξη που χρησιμοποιήθηκε έχει 7 θέσεις, τοποθετήθηκαν 7 πανομοιότυπα πειράματα με τις εξής συνθήκες: 200 g **ΥΤ** σε υγρή βάση, 600 g νερό, 2 mL **μιξ**, θερμοκρασία ρυθμισμένη στους 35 °C και ανάδευση στα 120 rpm. Μετά από 1, 2, 3, 7, 9, 11 και 14 ημέρες μετά την έναρξη του πειράματος, ένα από τα 7 δείγματα αφαιρούταν από την διάταξη και μετριοταν η μάζα του καθώς και τα TS του. Αφαιρώντας την μείωση μάζας των στερεών (η οποία οφείλεται καθαρά στην υδρόλυση) από την μείωση της συνολικής υγρής μάζας, μπόρεσε να προσδιοριστεί η μείωση της μάζας του νερού. Εφόσον δεν υπήρχαν δειγματοληψίες, η απώλεια μάζας αυτή οφειλόταν αποκλειστικά στην εξάτμιση. Έτσι, ποσοτικοποιήθηκε και ο ρυθμός εξάτμισης.

## 7.4 Πειραματικός κύκλος υδρόλυσης

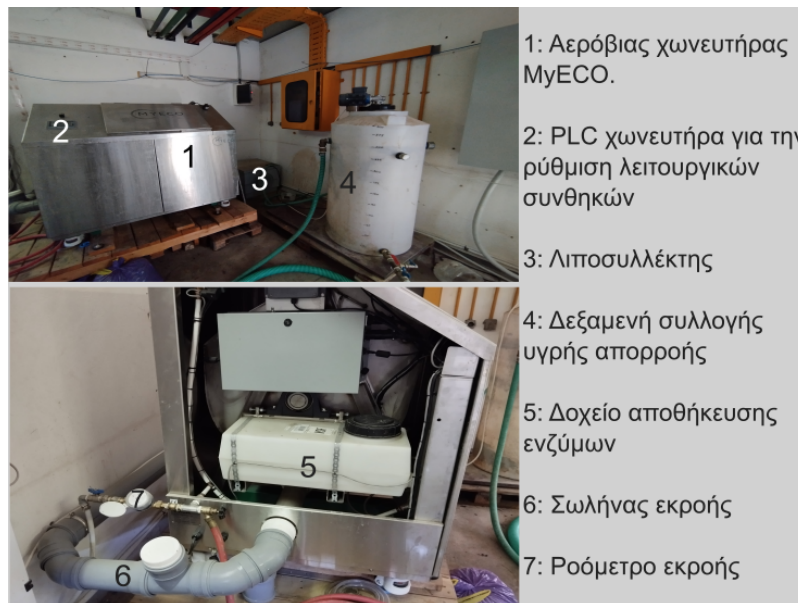
Με βάση τα αποτελέσματα των δοκιμαστικών πειραμάτων αυτών σχεδιάστηκε ένας πειραματικός κύκλος για την βελτιστοποίηση της διεργασίας. Η αραίωση και η ανάδευση διατηρήθηκαν σταθερές στις τιμές των προηγούμενων πειραμάτων (200 mL **ΥΤ**, 600 mL νερό, 120 rpm ανάδευση), ενώ ως παράμετροι προς βελτιστοποίηση επιλέχθηκαν η θερμοκρασία και η ποσότητα του **μιξ**. Για την θερμοκρασία, εξετάστηκαν οι τιμές 35 και 40 °C ως δύο αντιπροσωπευτικές τιμές της μεσόφιλης περιοχής, ενώ όπου υπήρχε η δυνατότητα, εξετάστηκε και η διαφορά τους με την θερμοκρασία 45 °C όπου έγινε ένα από τα δοκιμαστικά πειράματα. Για την ποσότητα του **μιξ** εξετάστηκαν οι τιμές 0 (επίδραση μόνο της θερμοκρασίας), 1, 2, 4 και 8 ml ανά 200 mL **ΥΤ** σε υγρή βάση.

Ως μεταβλητές απόκρισης στα πειράματα αυτά επιλέχθηκαν η μέτρηση των συγκεντρώσεων σακχάρων, των **VFAs** και του **sCOD**. Με αυτά, μπορούν να υπολογιστούν τα εξής: η συνολική συγκέντρωση **VFAs** η οποία δείχνει πόσα προϊόντα παράχθηκαν και ιδιαίτερα ο λόγος  $\frac{tVFAs \text{ in COD-eq}}{sCOD}$  ο οποίος είναι ένας πολύ χρήσιμος λόγος για μία διεργασία οξεογένεσης καθώς αποτελεί την απόδοση της. Επίσης, σημαντική είναι και η αναλογία της τελικής υγρής απορροής στα διάφορα **VFAs**, η οποία είναι καθοριστική για την ποιότητα της αναερόβια χώνευση.

Εκτός από την τελική δειγματοληψία όμως, έγιναν και δειγματοληψίες κατά την διάρκεια του πειράματος (μία φορά την ημέρα). Η δειγματοληψία αυτή επέτρεψε την καταγραφή κάποιων σταδίων στην διεργασία, το οποίο επέτρεψε την διαπίστωση των μεταβολικών μονοπατιών που ακολουθήθηκαν.

## 7.5 Υδρόλυση σε πιλοτική κλίμακα

Για τα πειράματα σε πιλοτική κλίμακα χρησιμοποιήθηκε ο πρωτότυπος αερόβιος χωνευτήρας (MyECO) χωρητικότητας 300 L. Η διάταξη αυτού φαίνεται στο Σχήμα 7.2.



Σχήμα 7.2: Πειραματική Διάταξη Πιλοτικής Υδρόλυσης

Στο εσωτερικό του χωνευτήρα έχει τοποθετηθεί αδρανές πλαστικό πληρωτικό υλικό, για την καλύτερη διεπαφή **ΥΤ** και ενζύμων-μικροοργανισμών καθώς και τον σχηματισμό βιοφίλμ, ο οποίος ανεβάζει την απόδοση επεξεργασίας της χώνευσης. Ακόμη, στο εσωτερικό του χωνευτήρα υπάρχει ένας οριζόντιος άξονας με 4 ράβδους οι οποίες επιτρέπουν τον τεμαχισμό και ταυτόχρονα την ανάδευση του συστήματος. Συγκεκριμένα, οι ράβδοι αυτές έχουν ελαστικά άκρα, όποτε μπορούν να τεμαχίσουν τα υδρολύματα κατά την περιστροφή τους και να τα μεταφέρουν προς την εκροή, αναδεύοντας τα. Το σύστημα αυτό έχει ισχύ 1 HP. Επιπλέον, ο χωνευτήρας διαθέτει εσωτερική ζυγαριά για την μέτρηση της μάζας της τροφοδοσίας και ενσωματωμένο PLC (2) που επιτρέπει την ρύθμιση του ρυθμού τροφοδοσίας του σκευάσματος, το οποίο είναι αποθηκευμένο σε ειδικό δοχείο του οργάνου (5), καθώς και του νερού που προστίθεται στο εσωτερικό του αντιδραστήρα, αλλά και στην εκροή του, για την αραιώση του τελικού προϊόντος. Μετά από κάποιον χρόνο παραμονής, η επεξεργασμένη υγρή εκροή αποβάλλεται από τον χωνευτήρα (6) και οδηγείται σε λιποσυλλέκτη (3) για να απομακρυνθούν οι λιπαρές ενώσεις. Η εκροή αυτού οδηγείται στη δεξαμενή συλλογής χωρητικότητας 300 L (4) από την οποία γίνεται η δειγματοληψία για την ανάλυση των δειγμάτων της υδρόλυσης. Το όργανο διαθέτει ροόμετρο για την μέτρηση της εκροής του (7).

Η λειτουργία του είναι ημι-συνεχής καθώς ο αντιδραστήρας τροφοδοτείται 2 φορές την ημέρα (μία το πρωί και μία το απόγευμα) ενώ η εκροή του λειτουργεί συνεχώς.

Τα πειράματα που διεξήχθησαν στην κλίμακα αυτή είχαν ως σκοπό να εξετάσουν την εφικτότητα της υδρόλυσης σε μεγαλύτερη κλίμακα και την συλλογή και εξέταση του υδρολύματος που παράγεται για παραγωγή βιομεθανίου μέσω αναερόβιας χώνευσης, για να διαπιστωθεί αν αυτή είναι το ίδιο αποτελεσματική με το υδρόλυμα που παράγεται στην εργαστηριακή κλίμακα. Για τον σκοπό αυτόν, η τροφοδοσία του **μξ** ρυθμίστηκε σε τιμές οι οποίες αντιστοιχούν στις αναλογίες που χρησιμοποιήθηκαν στα πειράματα εργαστηριακής κλίμακας. Βέβαια, ο πιλοτικός χωνευτήρας δεν έχει την δυνατότητα ελέγχου της θερμοκρασίας. Για να εξεταστεί κάποια άλλη λειτουργική συνθήκη του συστήματος, έγινε ένας πειραματικός κύκλος όπου αυξήθηκε η προσθήκη νερού στον χωνευτήρα, για να διαπιστωθεί αν θα επηρεάσει πραγματικά το σύστημα, δηλαδή αν θα αυξήσει την υδρόλυση, ή αν θα μειώσει απλώς το **COD** λόγω αραιώσης.



Οπότε, οι 3 κύκλοι οι οποίοι διεξήχθησαν είχαν τις εξής συνθήκες:

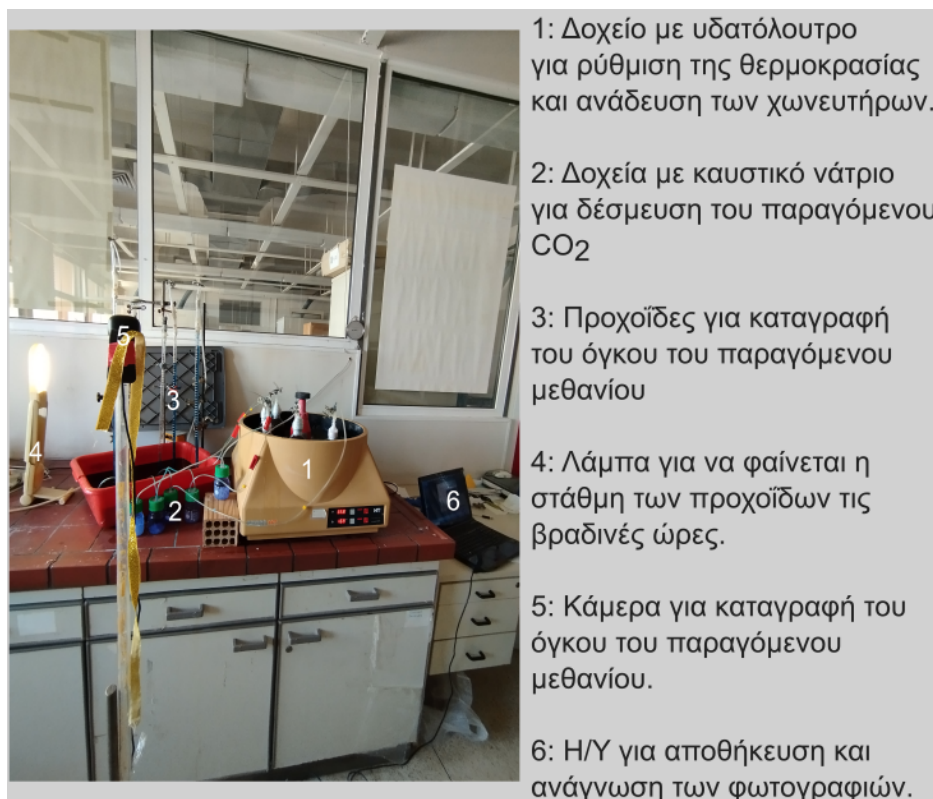
- 1ος κύκλος (P1): Τροφοδοσία 35.8 kg ΥΤ/day με προσθήκη 4.24 L νερό/kg ΥΤ και 5 mL μίξ/kg ΥΤ.
- 2ος κύκλος (P2): Τροφοδοσία 37.5 kg ΥΤ/day με προσθήκη 5.71 L νερό/kg ΥΤ και 5 mL μίξ/kg ΥΤ.
- 3ος κύκλος (P3): Τροφοδοσία 24.9 kg ΥΤ/day με προσθήκη 8.9 L νερό/kg ΥΤ και 10 mL μίξ/kg ΥΤ.

Αξίζει να αναφερθεί πως το νερό είναι σε κάθε περίπτωση περισσότερο από αυτό που χρησιμοποιούνταν στα πειράματα εργαστηριακής κλίμακας (3 L νερό/kg ΥΤ). Αυτό συμβαίνει διότι στην πιλοτική διάταξη απαιτείται περισσότερο νερό από ότι στην εργαστηριακή κλίμακα για να είναι ομοιογενής η λειτουργία και να μην υπάρχουν προβλήματα συσσώρευσης ΥΤ και φραγής της εξόδου.

Ως απόκριση της διεργασίας, εξετάστηκαν οι παραμέτροι TS, VS, sCOD, tCOD. Ιδιαίτερα σημαντικό για την διεργασία θεωρήθηκε να είναι υψηλή η αναλογία sCOD/tCOD στην τελική εκροή. Ο λόγος αυτός θεωρείται χαρακτηριστικός για την απόδοση της διεργασίας υδρόλυσης/βιοαποδόμησης καθώς εκφράζει πόση από την συνολική οργανική ύλη (tCOD) είναι διαλυτή φάση (sCOD).

## 7.6 Πειραματική διάταξη αναερόβιας χώνευσης

Η AX πραγματοποιήθηκε σε εργαστηριακούς αντιδραστήρες διαλείποντος έργου, συνολικού όγκου 500 mL ο καθένας. Η διάταξη που χρησιμοποιήθηκε φαίνεται στο Σχήμα 7.3.



1: Δοχείο με υδατόλουτρο για ρύθμιση της θερμοκρασίας και ανάδευση των χωνευτήρων.

2: Δοχεία με καυστικό νάτριο για δέσμευση του παραγόμενου CO<sub>2</sub>

3: Προχοϊδες για καταγραφή του όγκου του παραγόμενου μεθανίου

4: Λάμπα για να φαίνεται η στάθμη των προχοϊδων τις βραδινές ώρες.

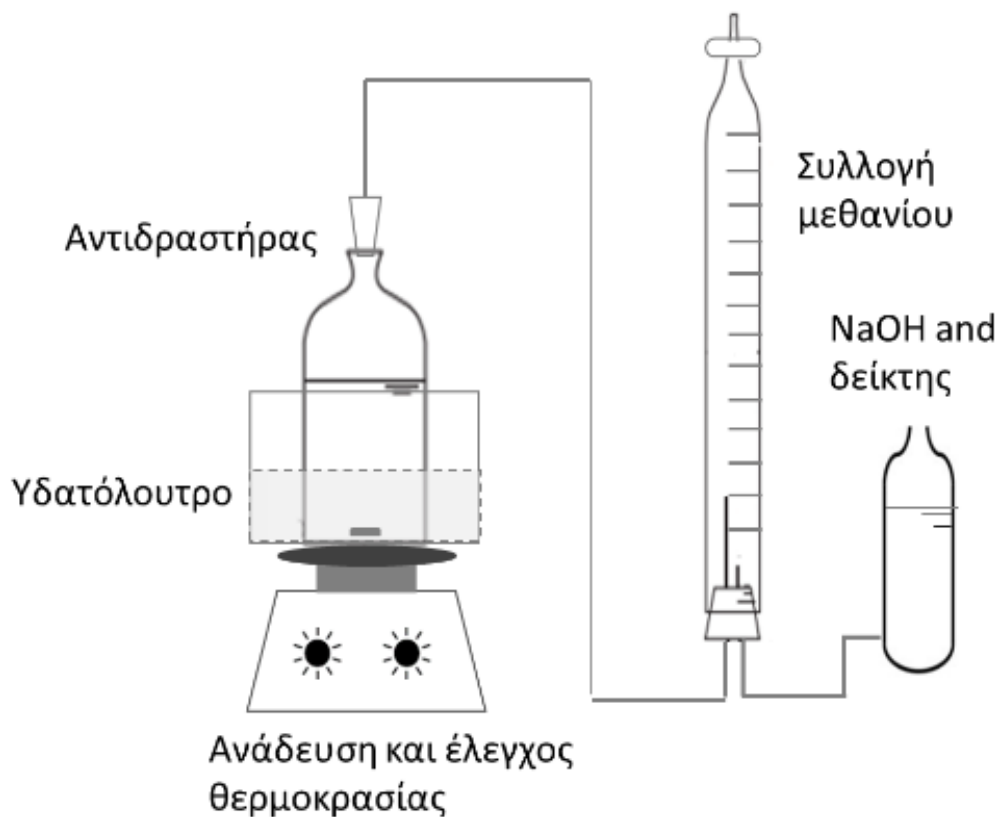
5: Κάμερα για καταγραφή του όγκου του παραγόμενου μεθανίου.

6: Η/Υ για αποθήκευση και ανάγνωση των φωτογραφιών.

Σχήμα 7.3: Πειραματική Διάταξη Αναερόβιας Χώνευσης

Για να διεξαχθεί ένας κύκλος πειραμάτων αναερόβιας χώνευσης, αρχικά ανοίγει το υδατόλουτρο (1) για να φτάσει την επιθυμητή θερμοκρασία και πληρώνονται οι αντιδραστήρες με λάσπη και

νερό. Σφραγίζονται με χρήση parafilm και σιλικόνης για να είναι σίγουρο ότι δεν θα μπορέσει να υπάρξει κάποια διαρροή, δηλαδή απώλεια μεθανίου. Για να εκκινήσει η αντίδραση, το υπόστρωμα τροφοδοτείται στον αντιδραστήρα από ειδικό σωληνάκι με χρήση σύριγγας. Μόλις παραχθεί αέριο, αυτό θα διοχετευθεί στα δοχεία με το καυστικό νάτριο (2). Το καυστικό νάτριο μπορεί να δεσμεύσει το διοξείδιο του άνθρακα καθώς αντιδρά με το ανθρακικό οξύ που παράγεται όταν το  $\text{CO}_2$  βρεθεί σε υδατική φάση. Ως αποτέλεσμα, στις προχοίδες (3) διοχετεύεται καθαρό μεθάνιο, το οποίο είναι και αυτό που μας ενδιαφέρει. Η κάμερα (5) καταγράφει μία φορά την ώρα την στάθμη του νερού όλο το 24 ώρο, για να μπορέσει να γίνει μία κινητική μελέτη της διεργασίας αναερόβιας χώνευσης. Για τις βραδινές ώρες, είναι απαραίτητο να είναι ανοιχτή η λάμπα (4), ώστε να μπορεί να διαβαστεί η στάθμη των προχοίδων. Οι φωτογραφίες που βγαίνουν κάθε ώρα, αποθηκεύονται στον Η/Υ (6), για να μπορέσουν να αναγνωστούν. Στο Σχήμα 7.4 παρουσιάζεται μία σχηματική επεξήγηση της λειτουργίας του συστήματος καταγραφής του παραγόμενου μεθανίου.



Σχήμα 7.4: Διάταξη για τη μέτρηση της δραστηριότητας της αναερόβιας λάσπης

Έτσι, με την διάταξη αυτή μπορεί να εξεταστεί εύκολα το **biochemical methane potential - βιοχημικό δυναμικό μεθανίου (BMP)** 5 διαφορετικών υποστρωμάτων ταυτόχρονα καθώς και ο ρυθμός παραγωγής μεθανίου σε αυτά ή η **sludge methanogenic activity - ειδική μεθανογόνος δραστηριότητα της λάσπης (SMA)** τους.

## 7.7 Πειραματικός κύκλος αναερόβιας χώνευσης

Μετά από βελτιστοποίηση της υδρόλυσης στην εργαστηριακή κλίμακα, αποφασίστηκε πως η θερμοκρασία  $40\text{ }^{\circ}\text{C}$  είναι πιο αποτελεσματική και ότι οι ποσότητες 1, 2 και 4 έχουν τα καλύτερα αποτελέσματα και αξίζει να διερευνηθούν περαιτέρω. Οπότε, οι 2 πρώτοι πειραματικοί κύκλοι αναερόβιας χώνευσης έγιναν με τα υδρολύματα αυτά για να εξεταστεί η ικανότητά τους να

παράξουν μεθάνιο. Έπειτα, έγινε και ένας τρίτος κύκλος στον οποίο εξετάστηκε η ικανότητα παραγωγής μεθανίου από τα υδρολύματα που προήλθαν από την πιλοτική υδρόλυση. Σε όλα τα πειράματα η θερμοκρασία ήταν ρυθμισμένη στους 37 °C και η ανάδευση στα 170 rpm.

Κατά τον πρώτο κύκλο πειραμάτων, ο οποίος διεξήχθη με την Λάσπη 1, χρησιμοποιήθηκε εμβόλιο 125 g λάσπης (1.55 g VS/αντιδραστήρα) και πλήρωση του αντιδραστήρα με νερό. Αρχικά, η αναερόβια λάσπη ενεργοποιήθηκε με τροφοδοσία οξικού οξέος (100 mg), και στη συνέχεια, ακολούθησε η τροφοδοσία με τα υδρολύματα. Εκτός από τα υδρολύματα με 1, 2 και 4 mL **μιξ**/200 g **ΥΤ**, χρησιμοποιήθηκαν και τα δείγματα με 0 mL **μιξ**, το οποίο δείχνει την επίδραση μόνο της θερμοκρασίας, και με το ανεπεξέργαστο **ΥΤ**, για να διαπιστωθεί αν η αναερόβια χώνευση πραγματικά βελτιώνεται με την προσθήκη του **μιξ**. Η τροφοδοσία με υδρολύματα έγινε με 100 mg **sCOD**, δηλαδή μία αναλογία **υποστρώματος προς εμβόλιο (S/I)** 0.06 g COD/g VS. Η αναλογία αυτή είναι σχετικά μικρή σε σχέση με άλλες μελέτες <sup>32,76,97</sup>. Η επιλογή αυτή έγινε επειδή έτσι υπάρχει μία πιο άμεση απόκριση στα πειράματα και άρα μπορεί ο χρόνος διεξαγωγής τους να περιοριστεί σε περίπου μία βδομάδα, κάτι το οποίο επιτρέπει την εκτέλεση πολλών πειραματικών κύκλων. Επιπλέον, υπήρχε και ένας περιορισμός από την διάταξη, η οποία είχε προχοϊδες των 50 mL, οπότε αν η παραγωγή μεθανίου ήταν πολύ περισσότερη από αυτή την ποσότητα, θα ήταν δύσκολο να καταγραφεί.

Ο δεύτερος κύκλος πειραμάτων έγινε με παρόμοια λογική. Σκοπός ήταν να εξεταστεί αναερόβια λάσπη από διαφορετική πηγή (Λάσπη 2), για να διαπιστωθεί αν υπάρχει επαναληψιμότητα στα πειράματα. Στον κύκλο αυτό προστέθηκε μεγαλύτερο εμβόλιο λάσπης (250 g ή 4.2 g VS) ενώ η ποσότητα των υδρολυμάτων παρέμεινε ίδια (100 mg **sCOD**). Οπότε, η αναλογία **S/I** ήταν 0.02 g COD/g VS.

Στον τρίτο κύκλο χρησιμοποιήθηκαν τα υδρολύματα της πιλοτικής μονάδας. Συγκεκριμένα, χρησιμοποιήθηκαν τα πειράματα P1 και P3, τα οποία ήταν σε ποσότητα **μιξ** ισοδύναμα των πειραμάτων με 1 και 2 ml **μιξ** από την εργαστηριακή κλίμακα. Σκοπός του κύκλου αυτού ήταν να επιβεβαιωθεί η εφικτότητα της παραγωγής μεθανίου από τα υδρολύματα αυτά και οι διαφορές που έχουν από τα πειράματα σε εργαστηριακή κλίμακα. Εξετάστηκε η αναερόβια χώνευση τους με λάσπη από 2 διαφορετικές πηγές. Συγκεκριμένα, χρησιμοποιήθηκε η Λάσπη 2 για να συγκριθούν τα αποτελέσματα με την εργαστηριακή κλίμακα, αλλά χρησιμοποιήθηκε επίσης και η Λάσπη 3. Και στις 2 περιπτώσεις χρησιμοποιήθηκαν 250 g λάσπης.

Ως βασικές αποκρίσεις εδώ, χρησιμοποιήθηκαν η μέγιστη παραγωγή μεθανίου από κάθε δείγμα, καθώς και ο ρυθμός παραγωγής αυτού με βάση το τροποποιημένο μοντέλο Gompertz (**Ενότητα 6.4**) εφόσον υπήρχε η δυνατότητα 24ωρης καταγραφής του φαινομένου.

## 7.8 Αναλυτικές Μέθοδοι

Η μέτρηση pH έγινε με χρήση pH μέτρου (inoLab pH Level 1 pH Meter) σε ακολουθία με τις πρότυπες τεχνικές, ενότητα 4500-H<sup>+</sup> <sup>101</sup>. Η μέτρηση ηλεκτρικής αγωγιμότητας έγινε με τον ηλεκτροχημικό αναλυτή CONSORT C933.

Η μέτρηση των στερεών, έγινε σε ακολουθία με τις πρότυπες τεχνικές, ενότητα 2540 <sup>101</sup>. Συγκεκριμένα για τα **total solids - ολικά στερεά (TS)**, έγινε ζύγιση σε προ-ζυγισμένη κάψα μετά από ξήρανση σε φούρνο στους 75 °C για 1 μέρα, ενώ για να μετρηθούν τα **volatile solids - πτητικά στερεά (VS)**, έγινε ζύγιση μετά από ξήρανση σε φούρνο στους 550 °C για 2 ώρες. Για τα **suspended solids - αιωρούμενα στερεά (SS)**, έγινε αρχικά διήθηση του δείγματος με χρήση προ-ζυγισμένου φίλτρου Whatman GF/A. Έπειτα, ακολούθησε η ίδια διαδικασία με παραπάνω για την μέτρηση ολικών και πτητικών αιωρούμενων στερεών.

Η μέτρηση του **COD** έγινε σε ακολουθία με τις πρότυπες τεχνικές, ενότητα 5220 <sup>101</sup>. Για την μέτρηση αυτή, αρχικά γίνεται αραιώση του δείγματος ανάλογα με το αναμενόμενο **COD**, καθώς η μέθοδος είναι αξιόπιστη σε COD από 50 έως 1000 mg/L. Έπειτα, 2 ml του αραιωμένου δείγματος αναμιγνύονται με 2.8 ml πυκνού θειικού οξέος και 1.2 ml διχρωμικού καλίου και τοποθετούνται σε ειδικό φούρνο στους 150 °C για 2 ώρες (HACH COD Reactor 45600).

Το διχρωμικό κάλιο είναι ισχυρό οξειδωτικό, ενώ το θειικό οξύ και η θερμοκρασία δρουν ως καταλύτες της αντίδρασης. Ανάλογα με το COD, μεταβάλλεται η οξειδωτική κατάσταση του χρωμίου από +6 σε +3. Ταυτόχρονα, μεταβάλλεται το χρώμα του από πορτοκαλί σε γαλάζιο. Μετρώντας την απορρόφηση στα 600 nm μετά τις 2 ώρες, μπορεί να ποσοτικοποιηθεί η οξείδωση που διεξήχθη, και άρα το COD του δείγματος. Για να μετρηθεί το COD ενός δείγματος, απαιτείται μία πρότυπη καμπύλη η οποία αντιστοιχεί την απορρόφηση σε συγκέντρωση COD. Για την μέτρηση του tCOD το δείγμα λαμβανόταν ως είχε, ενώ για την μέτρηση του sCOD, το δείγμα αρχικά διηθούταν με χρήση φίλτρου Whatman. Για ορισμένα δείγματα με πολλά στερεά γινόταν πρώτα μία φυγοκέντριση (EBA 20, Hettich Zentrifugen) στις 6000 rpm για 10 λεπτά και έπειτα διήθηση, για να ολοκληρωθεί πιο γρήγορα ο διαχωρισμός των στερεών.

Για την αλκαλικότητα ακολουθήθηκε η μέθοδος της ογκομέτρησης. Συγκεκριμένα, 20 mL δείγματος ογκομετρήθηκαν με θειικό οξύ κανονικότητας 0.2 N μέχρι το pH να φτάσει 4.5. Ο όγκος που απαιτείται ( $V_{sulf}$ ) είναι ενδεικτικός της αλκαλικότητας. Συγκεκριμένα, ισχύει  $Alkalinity = \frac{50 \cdot 1000 \cdot 0.2 \cdot V_{sulf}}{20}$  με την αλκαλικότητα να μετριέται σε mg CaCO<sub>3</sub>/L.

Για την μέτρηση των σακχάρων και των πτητικών λιπαρών οξέων κατά την υδρόλυση, χρησιμοποιήθηκε high performance liquid chromatography - υγρή χρωματογραφία υψηλής απόδοσης (HPLC) (Agilent Technologies Infinity II). Πιο συγκεκριμένα, ακολουθήθηκε η μέθοδος lactic temp. Ο χρόνος έκλουσης της μεθόδου είναι 45 λεπτά. Η θερμοκρασία της στήλης είναι 50 °C. Η κινητή φάση είναι HPLC Grade νερό με διάλυμα θειικού οξέος συγκέντρωσης 5mM και η παροχή της είναι 0.6 mL/min. Το όργανο έχει αισθητήρα RID στον οποίο ανιχνεύθηκαν οι ενώσεις: γλυκόζη, φρουκτόζη, σακχαρόζη και αιθανόλη και DAD στον οποίο ανιχνεύθηκαν: γαλακτικό οξύ, οξικό οξύ και προπιονικό οξύ.



## Κεφάλαιο 8

# Επεξεργασία Αποτελεσμάτων

Όλα τα πειραματικά αποτελέσματα αναλύθηκαν με την βοήθεια της γλώσσας προγραμματισμού Julia <sup>102</sup>. Η Julia είναι μία ελεύθερα διαθέσιμη γλώσσα η οποία είναι ιδιαίτερα κατάλληλη για υπολογιστικά προβλήματα όπως αυτά που χρειάστηκε να αναλυθούν. Η είσοδος και έξοδος δεδομένων μπορεί να γίνει εύκολα μέσω αρχείων CSV με την χρήση βιβλιοθηκών όπως οι CSV.jl και DataFrames.jl <sup>103</sup>, κάτι το οποίο επιτρέπει την δια-λειτουργικότητα με εργαλεία όπως το Microsoft Office Excel το οποίο μπορεί να δημιουργήσει αλλά και να διαβάσει τα αρχεία αυτά. Ακόμη, έχει πολύ καλές δυνατότητες παρουσίασης αποτελεσμάτων λόγω των εξαιρετικών βιβλιοθηκών της για γραφήματα. Στην εργασία αυτή χρησιμοποιήθηκαν τα <sup>104,105</sup>. Η ανάλυση των αποτελεσμάτων έγινε με επαναλήψιμο τρόπο με την βοήθεια της βιβλιοθήκης DrWatson <sup>106</sup> και ανέβηκε στο [GitHub](#). Έτσι, κάνοντας clone το repository αυτό, μπορεί οποιοσδήποτε να αναπαράγει τα αποτελέσματα που θα παρουσιαστούν.

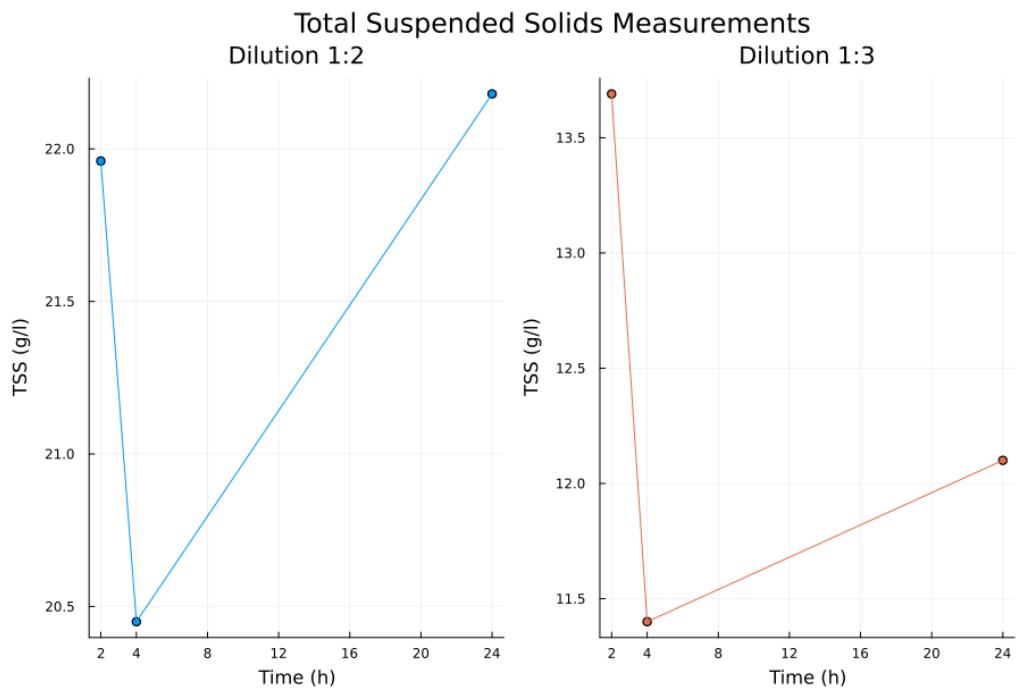
Σκοπός του κεφαλαίου αυτού είναι μία παρουσίαση του τρόπου επεξεργασίας των πειραματικών αποτελεσμάτων της εργασίας και παράθεση των βασικών αποτελεσμάτων ενώ στο επόμενο κεφάλαιο θα γίνει ο σχολιασμός αυτών καθώς και η παράθεση κάποιων συγκεντρωτικών αποτελεσμάτων από τα οποία προκύπτουν άμεσα τα τελικά συμπεράσματα.

### 8.1 Δοκιμαστικά πειράματα υδρόλυσης

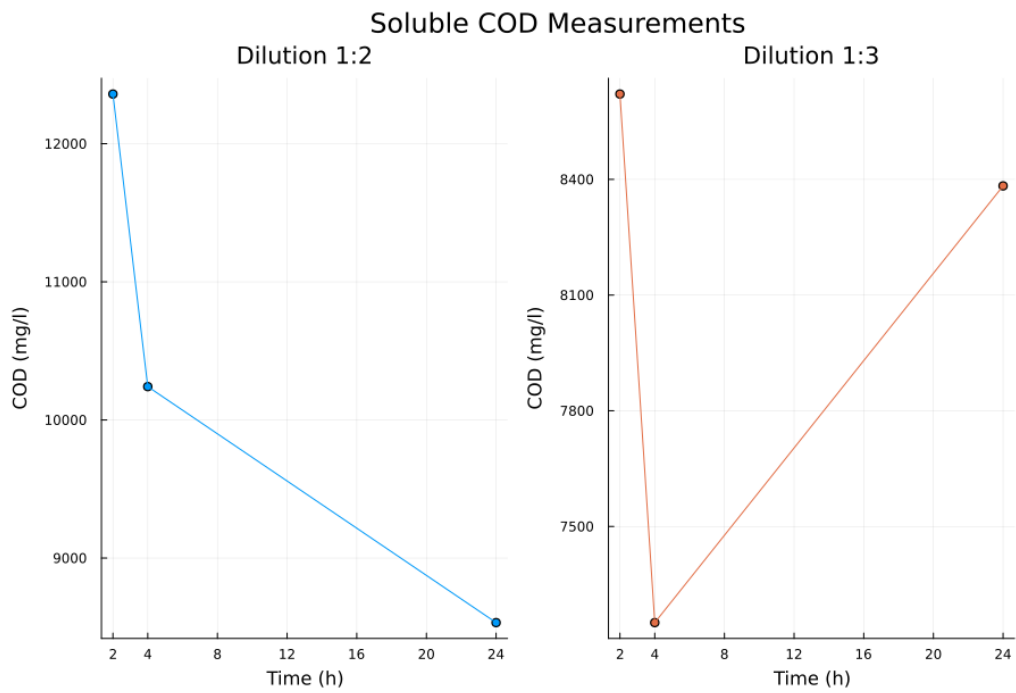
Τα πρώτα πειράματα που έγιναν ήταν τα δοκιμαστικά πειράματα για την υδρόλυση [Ενότητα 7.3](#). Αυτά επέτρεψαν την διαπίστωση των βέλτιστων συνθηκών λειτουργίας για τον κύριο πειραματικό κύκλο της υδρόλυσης.

1. Δοκιμή Διάφορων Αραιώσεων: Από το πρώτο πείραμα δεν προέκυψαν πολλά αποτελέσματα, πέρα από το γεγονός ότι υδρόλυση και ζύμωση διεξάγονται ταυτόχρονα. Από τις αραιώσεις που δοκιμάστηκαν, η αραιώση 1:3 ήταν η πιο εύκολα διαχειρίσιμη για αναλύσεις, οπότε και επιλέχθηκε για τα επόμενα πειράματα. Παρακάτω παρατίθενται τα διαγράμματα για τα **ολικά αιωρούμενα στερεά (TSS)** (8.1) και το **διαλυτό COD (sCOD)** (8.2) για το πρώτο δοκιμαστικό πείραμα. Τα **πηκτικά αιωρούμενα στερεά (VSS)** μετρήθηκαν αλλά δεν παρουσιάζονται καθώς ακολουθούν ακριβώς την ίδια τάση με τα **ολικά αιωρούμενα στερεά (TSS)**. Συγκεκριμένα, για το πείραμα με αραιώση 1:2 ο λόγος VSS/TSS ήταν  $96.65 \pm 0.50$  και για την αραιώση 1:3  $97.98 \pm 0.23$ .
2. Δοκιμαστικό πείραμα μελέτης κινητικής: Το επόμενο πείραμα ήταν το δοκιμαστικό πείραμα κινητικής το οποίο έγινε στους  $45\text{ }^{\circ}\text{C}$ . Από το πείραμα αυτό μετρήθηκαν πολλές διαφορετικές αποκρίσεις με συχνή δειγματοληψία για να διαπιστωθεί ποιες περιγράφουν την απόκριση του συστήματος ορθότερα.

Λόγω της πολύ μεγάλης διάρκειας του πειράματος και των συχνών δειγματοληψιών, παρατηρήθηκε πως η στάθμη του δοχείου στα 2 πειράματα μειώθηκε αρκετά (περίπου 550



Σχήμα 8.1: Μέτρηση TSS - Δοκιμαστικό Πείραμα 1

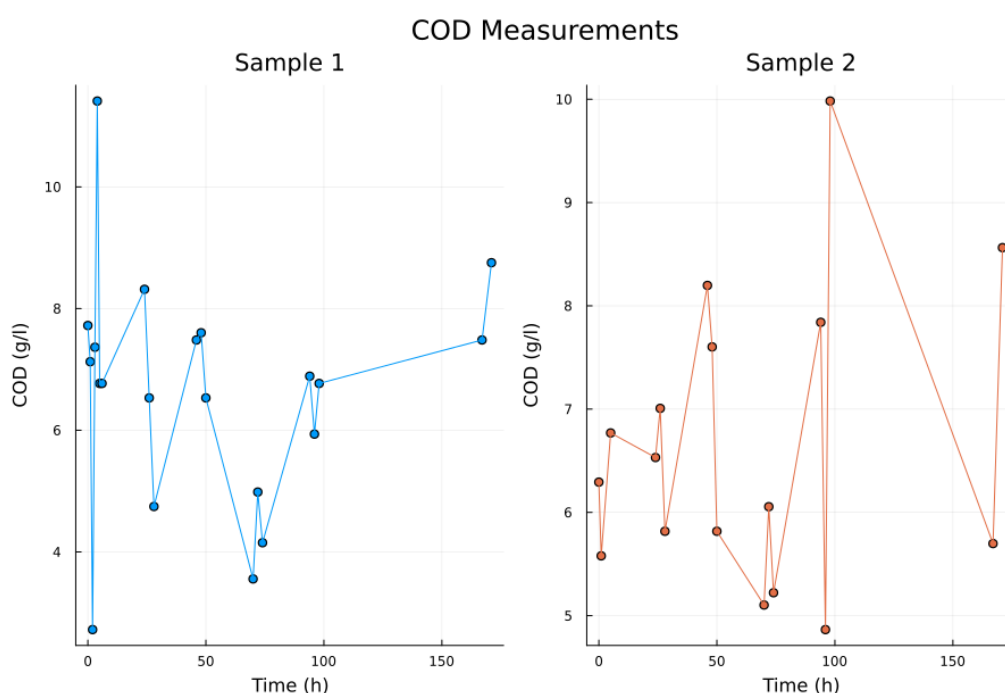


Σχήμα 8.2: Μέτρηση Διαλυτού COD - Δοκιμαστικό Πείραμα 1

ml ενώ ξεκίνησε από 800 ml). Η μεγάλη μεταβολή του όγκου, που οφείλεται σε μεγάλο βαθμό στην απώλεια νερού, είτε λόγω δειγματοληψίας, είτε λόγω εξάτμισης, επηρεάζει τις συγκεντρώσεις που μετρήθηκαν. Για αυτό και αποφασίστηκε η δειγματοληψία να γίνεται μία φορά την ημέρα για τα επόμενα πειράματα.

Συγκεκριμένα, η μέτρηση των ολικών και πτητικών αιωρούμενων στερεών θεωρείται πως δεν είναι αξιόπιστη καθώς παρουσιάζει έντονη παλινδρομική συμπεριφορά ενώ θεωρητικά δεν υπάρχει κάποια άλλη εξήγηση για την αύξηση των στερεών.

Μία αντίστοιχη παλινδρομική συμπεριφορά διαπιστώθηκε και στο COD. Στην περίπτωση αυτή, παρότι σίγουρα επηρεάζεται και αυτό από τα παραπάνω προβλήματα, είναι πολύ πιο εύκολο να εξηγηθεί η παρουσία των διακυμάνσεων αυτών. Εφόσον συμβαίνει ταυτόχρονα υδρόλυση και ζύμωση, η μία διεργασία (υδρόλυση) αυξάνει το COD ενώ η άλλη (ζύμωση) το μειώνει. Οι ρυθμοί αυτοί είναι δυναμικοί καθώς εξαρτώνται από πολλούς παράγοντες. Στο Σχήμα 8.3 φαίνονται τα αποτελέσματα της ανάλυσης αυτής.



Σχήμα 8.3: Μέτρηση COD - Αρχικό Κινητικό Πείραμα

Λόγω των προβλημάτων της ανάλυσης αυτής, αποφασίστηκε να γίνει μία πιο στοχευμένη ανάλυση. Από την βιβλιογραφία, είναι γνωστό πως η **high performance liquid chromatography - υψηλή χρωματογραφία υψηλής απόδοσης (HPLC)** είναι μία αναλυτική μέθοδος η οποία, μεταξύ άλλων, μπορεί να ανιχνεύσει σάκχαρα, αλκοόλες και πτητικά λιπαρά οξέα<sup>37,64,107</sup>. Οπότε, πραγματοποιήθηκε ανάλυση HPLC στα δείγματα των πειραμάτων αυτών για να βγει ένα καλύτερο συμπέρασμα για την διεργασία. Όπως αναφέρθηκε στην **Ενότητα 7.8**, στα δείγματα του πειράματος αυτού (καθώς και των επόμενων) ταυτοποιήθηκαν οι: γλυκόζη, φρουκτόζη, σακχαρόζη, γαλακτικό οξύ, οξικό οξύ, προπιονικό οξύ και αιθανόλη. Στα χρωματογραφήματα υπήρχαν και κάποιες άλλες κορυφές, αλλά ήταν πολύ μικρές και θεωρήθηκαν αμελητέες. Οι κορυφές που ταυτοποιήθηκαν δεν παρουσίασαν κάποια επικάλυψη και ήταν όλες αρκετά ψηλές για να είναι έμπιστη η μέτρηση τους. Οι ενώσεις αυτές χωρίζονται σε 2 κατηγορίες. Τα σάκχαρα (γλυκόζη, φρουκτόζη, σακχαρόζη) τα οποία παράγονται από την υδρόλυση και καταναλώνονται από την ζύμωση και τα προϊόντα της ζύμωσης (γαλακτικό οξύ, οξικό οξύ, προπιονικό οξύ και αιθανόλη). Παρότι η αιθανόλη δεν είναι οργανικό οξύ,

επειδή κατατάσσεται στα προϊόντα της οξεογένεσης, συνήθως λαμβάνεται υπόψιν όταν αναφέρονται τα συνολικά **volatile fatty acids - πτητικά λιπαρά οξέα (VFAs)** <sup>77</sup>.

Με την ανάλυση HPLC υπάρχει η δυνατότητα ποσοτικοποίησης των χημικών ενώσεων που αναφέρθηκαν παραπάνω, καθώς η επιφάνεια της κάθε κορυφής στο χρωματογράφημα που προκύπτει από την ανάλυση είναι ανάλογη της συγκέντρωσης της ένωσης. Οπότε, με μία καμπύλη βαθμονόμησης, για κάθε ένωση, μπορεί να υπολογιστεί η συγκέντρωση. Επειδή όμως οι επιφάνειες είναι πολύ μεγαλύτερες των συγκεντρώσεων, η καμπύλη πρέπει να γίνει με την μορφή  $Area = aC + b$  και όχι  $C = aArea + b$  ( $Area$  = επιφάνεια στο χρωματογράφημα,  $C$  = συγκέντρωση,  $a$ ,  $b$  = συντελεστές καμπύλης βαθμονόμησης) επειδή στην δεύτερη περίπτωση, οι συντελεστές της καμπύλης θα τείνουν στο 0, το οποίο θα δημιουργήσει σφάλματα. Στην εξίσωση 8.1 φαίνονται οι εξισώσεις βαθμονόμησης για κάθε ένωση.

$$C = \frac{Area - 5131.12}{130943.83} \quad \text{Σακχαρόζη} \quad (8.1a)$$

$$C = \frac{Area - 7899.51}{264251.52} \quad \text{Γλυκόζη} \quad (8.1b)$$

$$C = \frac{Area + 11335.7}{270115.2} \quad \text{Φρουκτόζη} \quad (8.1c)$$

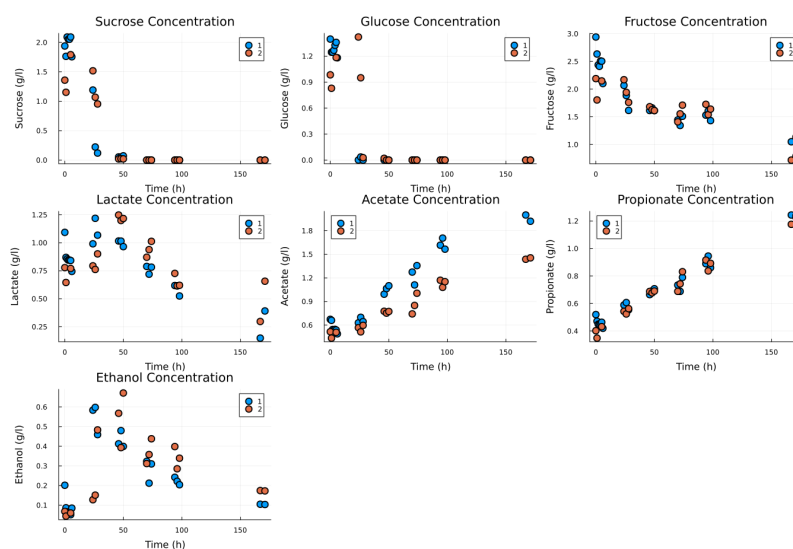
$$C = \frac{Area - 0.946}{1521.642} \quad \text{Γαλακτικό Οξύ} \quad (8.1d)$$

$$C = \frac{Area + 0.684}{1092.079} \quad \text{Οξικό Οξύ} \quad (8.1e)$$

$$C = \frac{Area + 25.17}{1060.057} \quad \text{Προπιονικό Οξύ} \quad (8.1f)$$

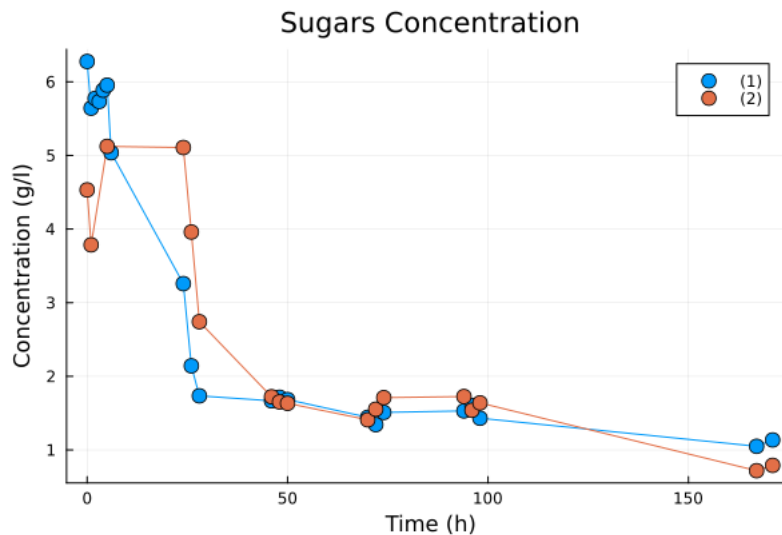
$$C = \frac{Area - 8775.42}{113284.075} \quad \text{Αιθανόλη} \quad (8.1g)$$

Τα συγκεντρωτικά αποτελέσματα της ανάλυσης αυτής φαίνονται στο Σχήμα 8.4.

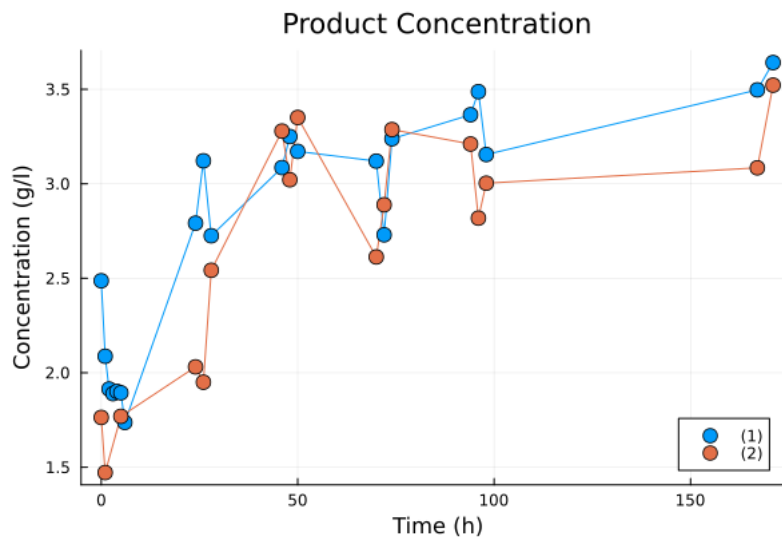


Σχήμα 8.4: Συνολικά Αποτελέσματα HPLC - Αρχικό Κινητικό Πείραμα. Οι συντελεστές 1, 2 αφορούν την 1η και 2η επανάληψη που έγιναν στο πείραμα

Δύο ακόμη διαγράμματα που θεωρήθηκαν χρήσιμα ήταν τα συγκεντρωτικά διαγράμματα της συγκέντρωσης σακχάρων (8.5) και προϊόντων (8.6), από τα οποία μπορούν να φανούν περισσότερο κάποιες τάσεις που υπάρχουν στην διεργασία.



Σχήμα 8.5: Συνολική Συγκέντρωση Σακχάρων - Αρχικό Κινητικό Πείραμα



Σχήμα 8.6: Συνολική Συγκέντρωση Προϊόντων - Αρχικό Κινητικό Πείραμα

Ως προς τα σάκχαρα (Σχήμα 8.5) φαίνεται πως αρχικά υπάρχει μία αύξηση, η οποία είναι λόγω υδρόλυσης και μετά από κάποιο χρονικό διάστημα (διάρκειας περίπου 24 ωρών) όπου λογικά ολοκληρώνεται η υδρόλυση αρχίζει να παρατηρείται μείωση λόγω του μεταβολισμού των σακχάρων από τους μικροοργανισμούς.

Ως προς τα προϊόντα (Σχήμα 8.6), υπάρχει μία αυξητική τάση, όμως σε ορισμένα σημεία παρατηρείται και μείωση των συνολικών προϊόντων. Από το Σχήμα 8.4 έχει παρατηρηθεί πως υπάρχει μείωση όλων των προϊόντων (και ιδιαίτερα σημαντική για το γαλακτικό οξύ και την αιθανόλη), είτε για μετατροπή τους σε άλλα προϊόντα είτε λόγω αερόβιου μεταβολισμού τους σε  $\text{CO}_2$ .

3. Ρυθμός Εξάτμισης Νερού: Το τελευταίο δοκιμαστικό πείραμα ήταν για την μέτρηση της εξάτμισης του νερού κατά τη διάρκεια των πειραμάτων της υδρόλυσης. Ο πίνακας 8.1 δείχνει τα αποτελέσματα της μείωσης της συνολικής υγρής μάζας καθώς και των TS, από τα οποία προκύπτει η μείωση της μάζας του νερού.

Από τα αποτελέσματα αυτά, παρατηρείται πως η υγρή μάζα αρχικά μειώνεται γρήγορα και μεταξύ 11 και 14 ημερών έχει φτάσει ένα πλατό. Ο ρυθμός εξάτμισης του νερού

Πίνακας 8.1: Ρυθμός Μεταβολής Υγρής και Ξηρής Μάζας

Ημέρα	Μείωση Υγρής Μάζας (g)	Μείωση TS (g)	Εξάτμιση Νερού (g)
1	6.97	1.68	5.28
2	12.88	2.35	10.53
3	15.68	-0.73	16.42
7	36.23	5.22	31.01
9	38.06	3.83	34.23
11	44.74	5.47	39.27
14	45.49	7.86	37.63

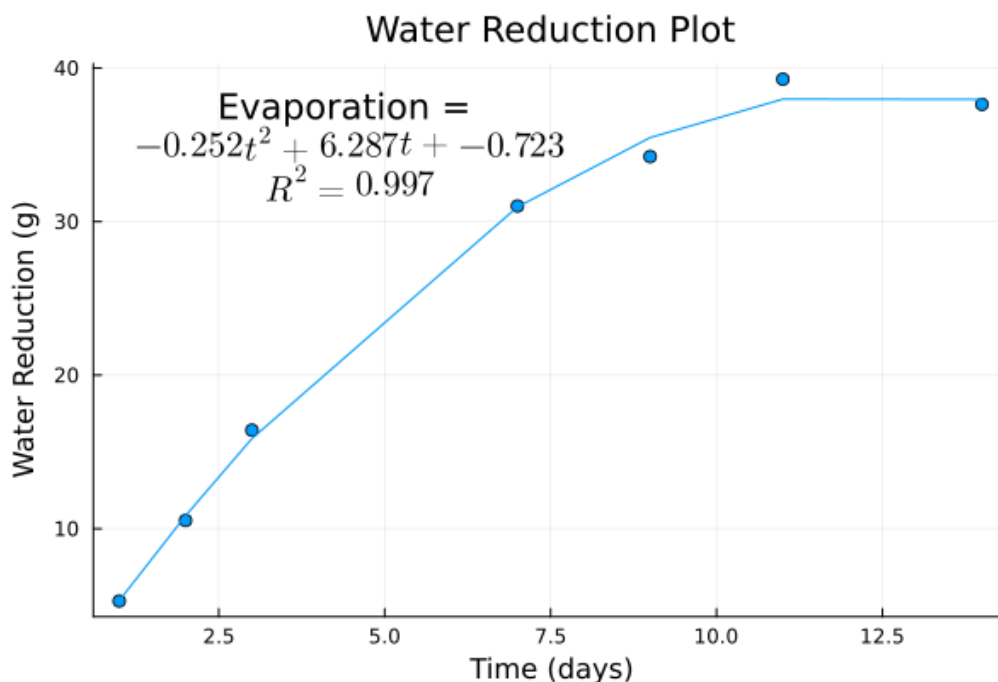
φαίνεται να έχει παρόμοια τάση, βέβαια την τελευταία ημέρα που έγινε δειγματοληψία, η εξάτμιση μειώθηκε. Τα ευρήματα αυτά οδηγούν στην θεώρηση ότι ο ρυθμός εξάτμισης μπορεί να περιγραφεί πολύ καλά με μία παραβολική εξίσωση. Κάνοντας την προσαρμογή, προκύπτει πως για το πείραμα αυτό, το οποίο διεξάχθηκε στους 35 °C, ο ρυθμός εξάτμισης δίνεται από την εξίσωση

$$\text{Evaporation Rate} = -0.252t^2 + 6.287t - 0.723 \quad R^2 = 0.997$$

με τον χρόνο να είναι εκφρασμένος σε ημέρες.

Στο Σχήμα 8.7 φαίνεται η προσαρμογή των δεδομένων της εξάτμισης

Για την μείωση των TS δεν μπορεί να προκύψει κάποιο ικανοποιητικό συμπέρασμα, το οποίο συνάδει με τις παρατηρήσεις των άλλων δοκιμαστικών πειραμάτων που έκριναν τα στερεά μη ικανοποιητικά για την παρακολούθηση της υδρόλυσης.

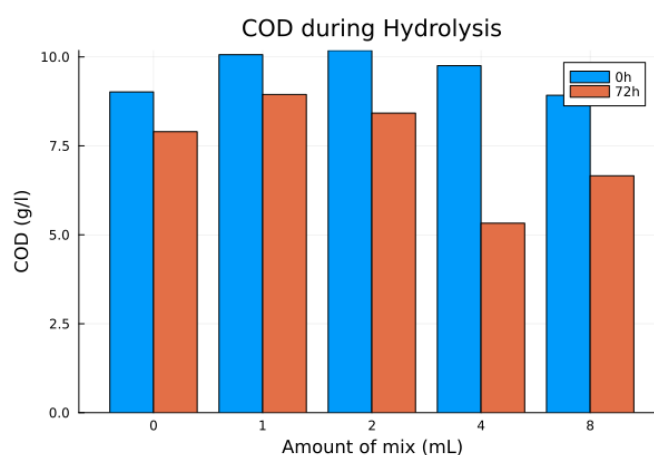


Σχήμα 8.7: Ρυθμός Εξάτμισης Νερού - 35 °C

## 8.2 Βασικός πειραματικός κύκλος υδρόλυσης εργαστηριακής κλίμακας

Για τον βασικό πειραματικό κύκλο της υδρόλυσης, έγιναν 2 πειράματα στα οποία εξετάστηκε η υδρόλυση 5 διαφορετικών αναλογιών **μιξ/ΥΤ**. Οι αναλογίες ήταν 0, 1, 2, 4 και 8 mL **μιξ** ανά 200 g **ΥΤ**. Η θερμοκρασία ρυθμίστηκε στους 35 °C για το πρώτο πείραμα και στους 40 °C για το δεύτερο, όπως αναφέρθηκε και στην **Ενότητα 7.4**. Τα πρωτογενή πειραματικά αποτελέσματα, όπως και για το αρχικό κινητικό πείραμα, ήταν αρχικό και τελικό **COD** καθώς και τα αποτελέσματα της HPLC ενώ τα δευτερογενή συγκριτικά αποτελέσματα μεταξύ των κύκλων θα παρουσιαστούν στο **Κεφάλαιο 9** στα πλαίσια της συζήτησης των αποτελεσμάτων για να αποφανθούν οι βέλτιστες λειτουργικές συνθήκες.

1. Πείραμα στους 35 °C: Η μεταβολή του **sCOD** κατά τις 72 ώρες ταυτόχρονης υδρόλυσης και ζύμωσης φαίνεται στο **Σχήμα 8.8**.

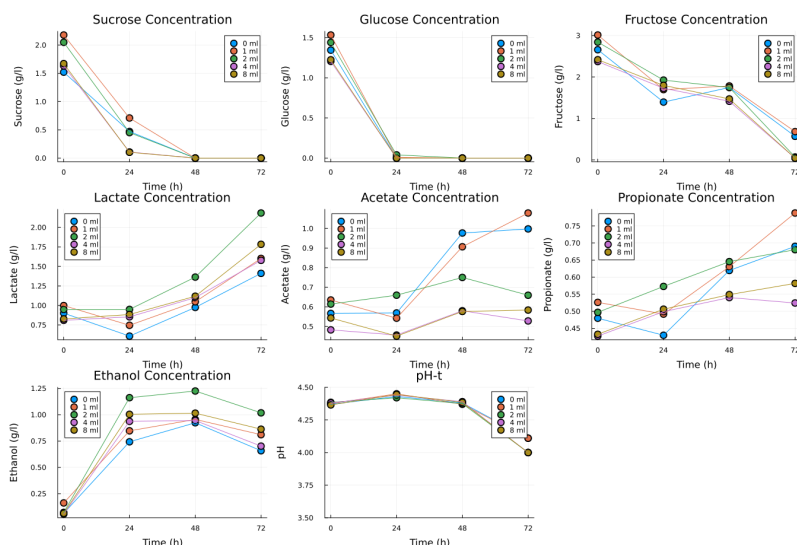


Σχήμα 8.8: Μεταβολή του **sCOD** κατά την υδρόλυση/ζύμωση - Πείραμα 35 °C

Από την μεταβολή του **sCOD** φαίνεται πως γενικά υπάρχει μία μείωση κατά την διεργασία, το οποίο συμφωνεί και με τα αποτελέσματα των δοκιμαστικών πειραμάτων. Επίσης, φαίνεται πως όσο περισσότερο **μιξ** προστίθεται, η μείωση του **sCOD** γίνεται όλο και περισσότερη. Αυτό εξηγείται, καθώς όσο προστίθεται το **μιξ** προστίθενται ενεργοί μικροοργανισμοί, οι οποίοι όχι μόνο υδρολύουν το υπόστρωμα, αλλά καταναλώνουν και κάποια ποσότητα από το **sCOD**.

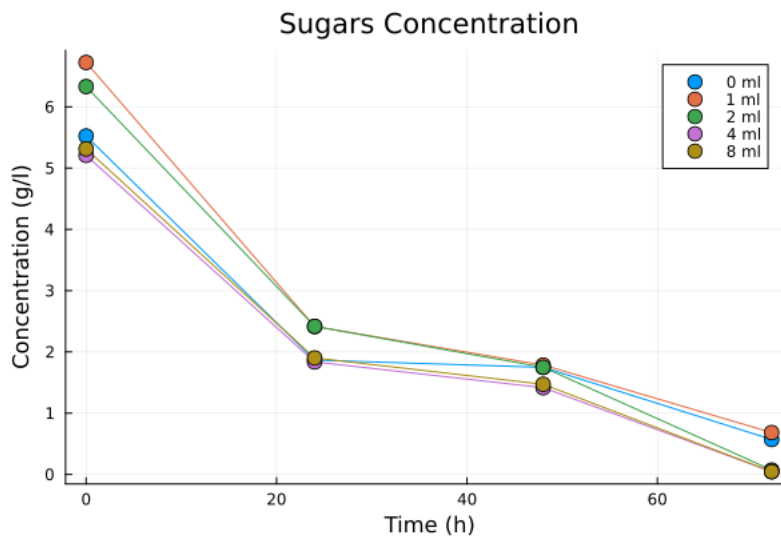
Τα συγκεντρωτικά αποτελέσματα της HPLC φαίνονται στο **Σχήμα 8.9**. Εκτός από τα αποτελέσματα αυτά, το διάγραμμα περιέχει και την μέτρηση του pH.

Παρατηρείται μία ταχεία βιοαποδόμηση της σακχαρόζης και της γλυκόζης ενώ η φρουκτόζη καταναλώνεται πλήρως στις 72 ώρες και μόνο για τα δείγματα με πάνω από 2 mL **μιξ**. Ως προς τα προϊόντα, στις πρώτες 24 ώρες παράγεται μεγάλη ποσότητα αιθανόλης και μικρή ποσότητα από τα άλλα προϊόντα, τα οποία παράγονται σε μεγάλο βαθμό τις 2 επόμενες μέρες. Ως προς το pH, παρατηρείται μία πτώση, η οποία είναι αναμενόμενη καθώς παράγονται οξέα.



Σχήμα 8.9: Αποτελέσματα ανάλυσης HPLC για διαφορετικές συγκεντρώσεις μιξ σε θερμοκρασία 35 °C.

Επίσης παρουσιάζονται τα συγκεντρωτικά διαγράμματα σακχάρων (Σχήμα 8.10) και προϊόντων (Σχήμα 8.11) όπως έγινε και για το αρχικό κινητικό πείραμα.

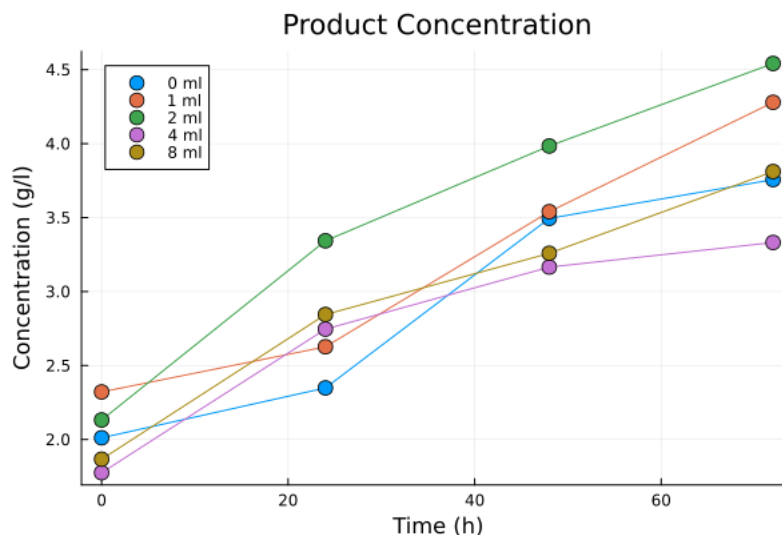


Σχήμα 8.10: Συνολική Συγκέντρωση Σακχάρων - Πείραμα 35 °C

Ως προς τα σάκχαρα (Σχήμα 8.10) φαίνεται μία ξεκάθαρη μείωση λόγω της κατανάλωσής τους, ενώ δεν παρατηρείται καμία αύξηση όπως στο Σχήμα 8.5 επειδή δεν έγινε δειγματοληψία την 1η ημέρα πέρα από την στιγμή 0.

Ως προς τα προϊόντα (Σχήμα 8.11), υπάρχει μία ξεκάθαρη αυξητική τάση, από την οποία φαίνεται κιόλας πως τα υδρολύματα με προσθήκη 1 και 2 mL μιξ παράγουν τα περισσότερα προϊόντα. Βέβαια, καθώς η αρχική τιμή των προϊόντων δεν ήταν μηδενική και διέφερε ανά δείγμα, αυτό δεν θεωρείται ένα από τα καλύτερα κριτήρια για να κριθεί ποιο υδρόλυμα ήταν καλύτερο. Δεν φαίνεται σε κανένα σημείο μείωση όπως στο Σχήμα 8.6. Μία πιθανή εξήγηση για την μείωση ήταν ο αερόβιος μεταβολισμός των προϊόντων παρουσία οξυγόνου. Με την λιγότερη συχνή δειγματοληψία υπήρχε λιγότερο οξυγόνο στον αντιδραστήρα οπότε αντιδράσεις αυτής της φύσεως έγιναν σε λιγότερο βαθμό.

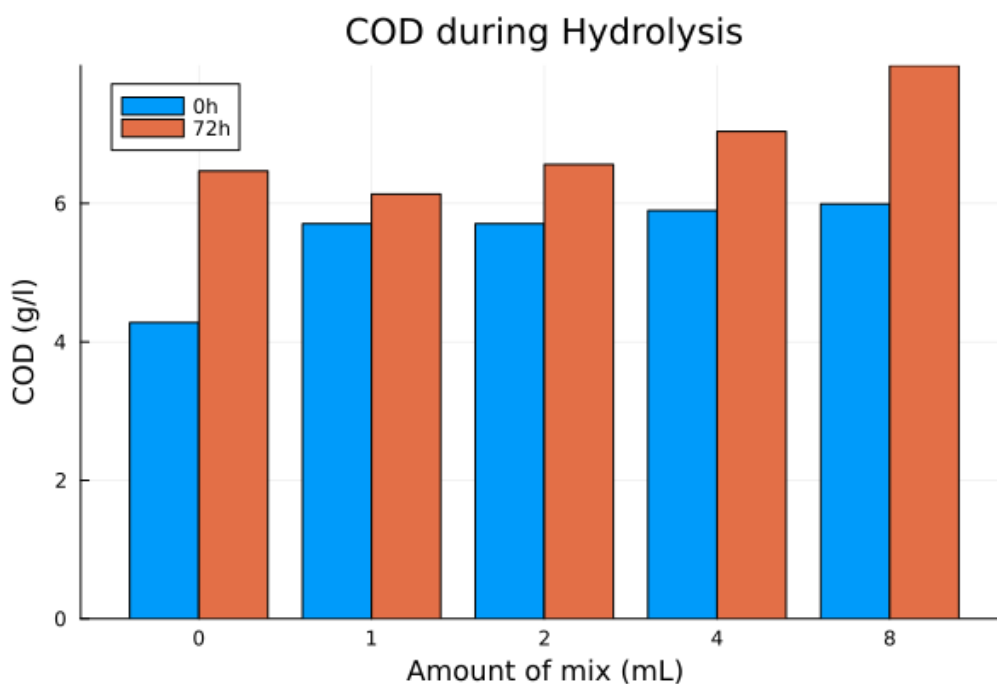




Σχήμα 8.11: Συνολική Συγκέντρωση Προϊόντων - Πείραμα 35 °C

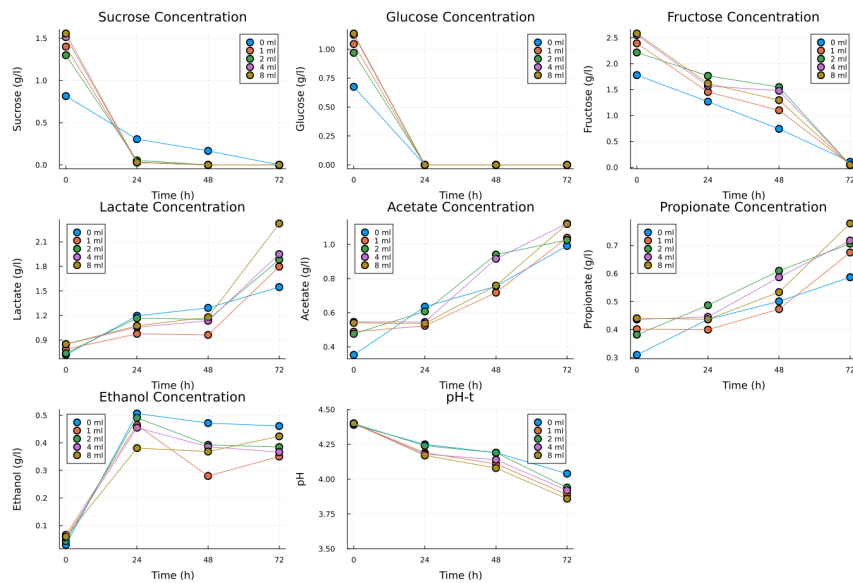
2. Πείραμα στους 40 °C Στο Σχήμα 8.12 φαίνεται η μεταβολή του sCOD κατά την διάρκεια της υδρόλυσης/ζύμωσης.

Στο πείραμα αυτό, παρατηρείται μία τάση σχετικά διαφορετική από τα προηγούμενα πειράματα, καθώς το sCOD γενικά αυξάνεται με την ζύμωση. Αυτό δείχνει πως στο σύνολο της διεργασίας, η υδρόλυση υπερίσχυσε της ζύμωσης. Υπάρχουν δύο πιθανές εξηγήσεις για αυτό. Αρχικά, φαίνεται πως το αρχικό sCOD ήταν πολύ χαμηλό, οπότε η υδρόλυση είχε γρηγορότερο ρυθμό από την ζύμωση (ο ρυθμός της οποίας εξαρτάται από το χαμηλό αυτό sCOD). Επίσης, είναι γνωστό από την βιβλιογραφία, πως τα υδρολυτικά ένζυμα λειτουργούν βέλτιστα σε υψηλότερες θερμοκρασίες από τους οξεογενείς μικροοργανισμούς, οπότε μπορεί και η θερμοκρασία να παίζει ρόλο στην διαφορά της ενεργότητας μεταξύ των δύο πειραμάτων <sup>11,25</sup>.



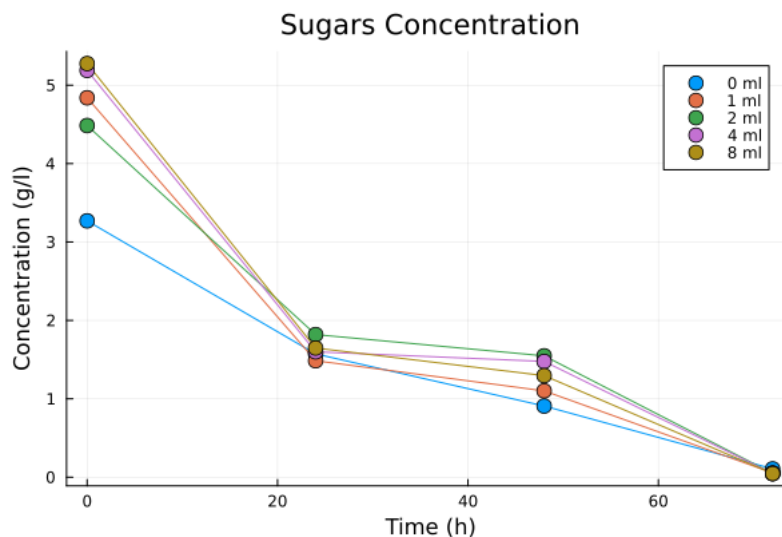
Σχήμα 8.12: Μεταβολή του sCOD κατά την υδρόλυση/ζύμωση - Πείραμα 40 °C

Τα αποτελέσματα της HPLC φαίνονται στα Σχήματα 8.13, 8.14 και 8.15.



Σχήμα 8.13: Αποτελέσματα ανάλυσης HPLC για διαφορετικές συγκεντρώσεις μιξ σε θερμοκρασία 40 °C.

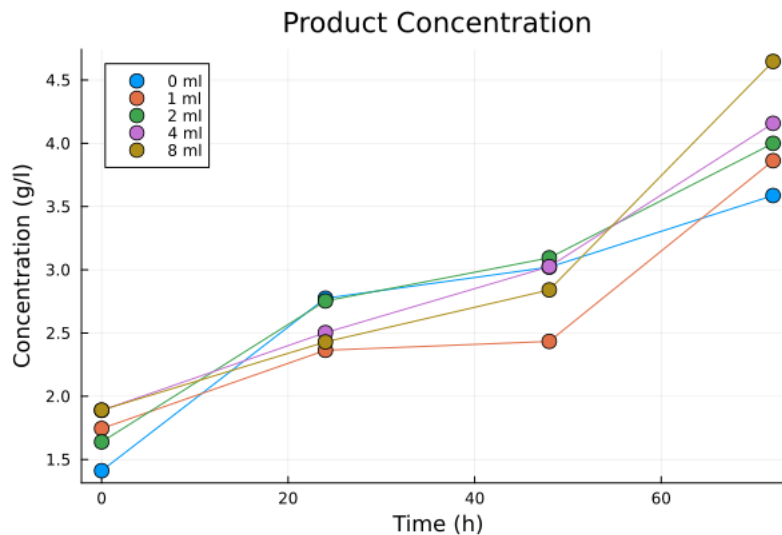
Με την αύξηση της θερμοκρασίας, φαίνεται πως η κατανάλωση των σακχάρων επιταχύνθηκε με όλα εκτός από ένα υδρόλυμα να έχει καταναλώσει 100% της γλυκόζης και σακχαρόζης μέσα σε 24 ώρες ενώ σε 72 ώρες καταναλώθηκε όλη η φρουκτόζη για όλα τα δείγματα. Επίσης, παρατηρείται πως παράγεται πολύ λιγότερη αιθανόλη στα πειράματα αυτά ενώ η αύξηση των οξέων (γαλακτικό, οξικό και προπιονικό) είναι πιο γρήγορη και παράγονται συνολικά περισσότερα, το οποίο οδηγεί και σε οξεία μεταβολή του pH.



Σχήμα 8.14: Συνολική Συγκέντρωση Σακχάρων - Πείραμα 40 °C

Στο Σχήμα 8.14 παρατηρείται και πάλι μία μείωση των σακχάρων με την βασική διαφορά σε σχέση με το Σχήμα 8.10 να είναι πως στις 72 ώρες τα σάκχαρα έχουν μηδενιστεί για κάθε ένωση, όπως αναφέρθηκε και παραπάνω.

Ως προς τα προϊόντα της οξεογένεσης (Σχήμα 8.15) παρατηρείται μία έντονη αύξηση, η οποία είναι λογική, αλλά επίσης φαίνεται πως τα τελικά προϊόντα αυξάνονται αναλογικά



Σχήμα 8.15: Συνολική Συγκέντρωση Προϊόντων - Πείραμα 40 °C

με την ποσότητα του  $\mu\text{ix}$ , κάτι το οποίο δεν ίσχυε στα προηγούμενα πειράματα, αλλά δείχνει πως πιθανόν στους 40 °C να μπορεί να βελτιωθεί η ζύμωση περαιτέρω με την προσθήκη του  $\mu\text{ix}$  σε σχέση με τους 35 °C.

### 8.3 Έλεγχος Υποθέσεων και Ανάλυση Ευαισθησίας

Καθώς όμως το προφίλ των παραγόμενων μεταβολικών προϊόντων σε κάθε συνθήκη αποτελεί την βασική απόκριση της διεργασίας, έγιναν και κάποιες πιο λεπτομερείς αναλύσεις. Η βασικότερη είναι μία ανάλυση ευαισθησίας η οποία έδειξε πως μεταβάλλονται τα προϊόντα με την μεταβολή των λειτουργικών συνθηκών. Επίσης όμως έγιναν έλεγχοι υποθέσεων για να εξεταστεί πόσο στατιστικά σημαντική είναι η μεταβολή της κάθε συνθήκης (ποιοτική ανάλυση), ώστε να διαπιστωθεί πως πράγματι έχει νόημα να εξεταστεί η ευαισθησία (ποσοτική ανάλυση). Τέλος, έγινε μία υπολογιστική ανάλυση η οποία προσπάθησε να συνδέσει τα παραγόμενα προϊόντα με τις αντιδράσεις από τις οποίες παράχθηκαν, με σκοπό μία πιο αναλυτική εικόνα των μεταβολικών μονοπατιών που ακολουθήθηκαν. Η ανάλυση αυτή είναι αρκετά ενδιαφέρουσα καθώς μπορεί να δώσει πολλές πληροφορίες για την διεργασία και πως να βελτιστοποιηθεί. Όμως, λόγω της φύσης της ανάλυσης, είναι πολύ δύσκολο να επαληθευτεί πειραματικά η εγκυρότητα της, χωρίς να γίνει κάποια μεταγενωμική ανάλυση, η οποία θα δείξει τα πραγματικά μεταβολικά μονοπάτια. Η ανάλυση αυτή παρουσιάζεται στο [Παράρτημα Α](#).

Για τους ελέγχους υποθέσεων χρησιμοποιήθηκε το πακέτο HypothesisTests.jl μέσω του οποίου μπορούν να γίνουν έλεγχοι όπως το t-test και η [analysis of variance - ανάλυση διακύμανσης \(ANOVA\)](#). Ένα πρόβλημα που υπάρχει στον έλεγχο αυτόν είναι πως για να επιβεβαιωθεί η στατιστική σημαντικότητα απαιτούνται πολλά δεδομένα και η επανάληψη του κάθε πειράματος πολλές φορές δεν θα ήταν πρακτικά εφικτή. Ένας τρόπος να παραχθούν αρκετά αποτελέσματα για να υπάρχει στατιστική σημαντικότητα χωρίς να γίνουν τόσες επαναλήψεις είναι να υποτεθεί πως τα αποτελέσματα θα ακολουθήσουν κανονική κατανομή. Έτσι, με έναν μέσο όρο και μία τυπική απόκλιση μπορούν να παραχθούν τα απαιτούμενα αποτελέσματα.

Όμως, τα πειράματα που έγιναν είναι λίγα ακόμη και για να προκύψει μία έγκυρη τυπική απόκλιση. Το πείραμα στο οποίο υπάρχουν αρκετά δείγματα για μία έγκυρη τυπική απόκλιση είναι το αρχικό πείραμα. Για καλύτερη ακρίβεια, έγινε η παραδοχή πως όλες οι δειγματοληψίες μέσα σε μία μέρα θα έπρεπε να έχουν την ίδια τιμή (το οποίο στην πράξη δεν ισχύει, αλλά οι αντιδράσεις είναι αργές, οπότε το σφάλμα της παραδοχής αυτής είναι μικρό). Έτσι, προέκυψε μία τυπική απόκλιση για κάθε μέρα του κύκλου αυτού και η απόκλιση που χρησι-

μοποιήθηκε ήταν ο μέσος όρος αυτών. Η διαδικασία αυτή είναι ένας αρκετά έμπιστος τρόπος να υπολογιστεί μία τυπική απόκλιση, η οποία είναι απαραίτητη για τον έλεγχο υποθέσεων.

Έπειτα, έγινε μία δειγματοληψία 20 "πειραμάτων" από τις κατανομές αυτές, οι οποίες ορίστηκαν με την βοήθεια του `Distributions.jl`<sup>108</sup>, με τυχαίο τρόπο (με χρήση του πακέτου `Random.jl` με χρήση του `seed` 1234 ώστε να υπάρχει τυχαιότητα αλλά τα αποτελέσματα να είναι επαναλήψιμα). Η τιμή 20 επιλέχθηκε ως μία τιμή στην οποία με βάση την στατιστική, ένας έλεγχος υποθέσεων έχει αρκετά καλή ισχύ.

Ο σκοπός της **ANOVA** ήταν να εξετάσει αν έχει επίδραση στα προϊόντα η προσθήκη του **μιξ**. Προέκυψε πως και για τις 2 θερμοκρασίες, η προσθήκη του **μιξ** είχε επίδραση σε κάθε προϊόν με στατιστική βεβαιότητα ( $p\text{-Value} < 0.001$ ). Έπειτα, έγινε ένας διαχωρισμός για να διαπιστωθεί αν η προσθήκη παραπάνω από 2 mL **μιξ** έχει επίδραση και αντίστοιχα αν η προσθήκη του **μιξ** έχει επίδραση αν προστεθούν έως 2 mL.

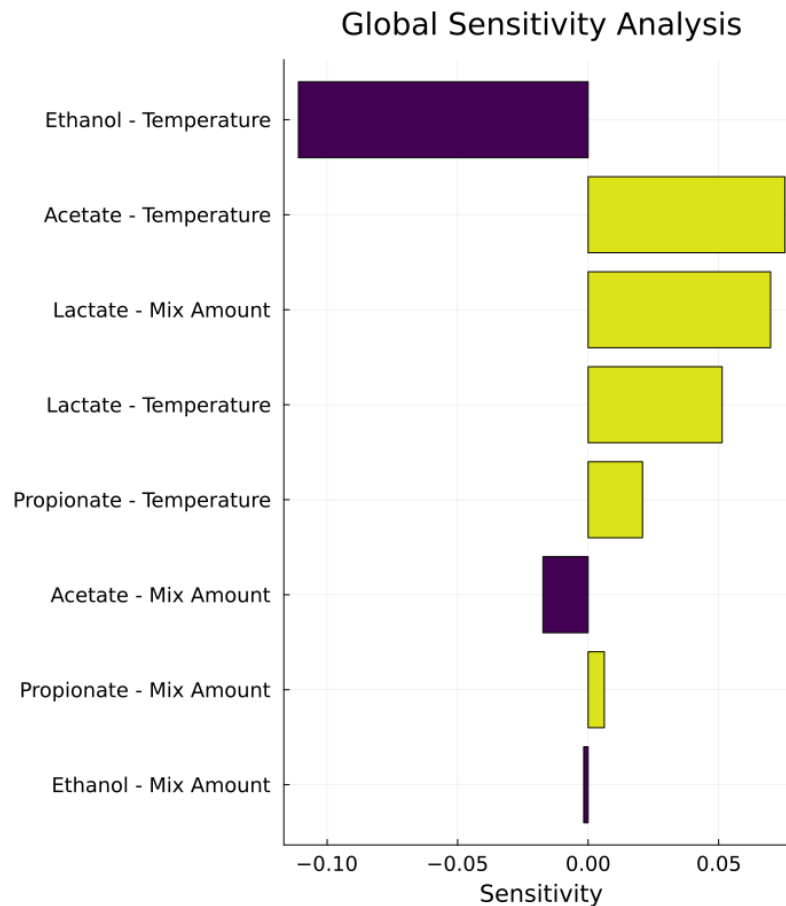
Προέκυψε πως η προσθήκη πάνω από 2 mL έχει επίδραση με στατιστική βεβαιότητα ( $p\text{-Value} < 0.001$ ). Στους 35 °C, η επίδραση αυτή είναι αρνητική, ενώ στους 40 °C είναι θετική. Για τους 40 °C, εξετάστηκε αν έχει κάποια επίδραση η προσθήκη 8 mL **μιξ** σε σχέση με τα 4. Από τον έλεγχο αυτόν, προέκυψε πως το οξικό δεν επηρεάζεται από την προσθήκη αυτή ( $p\text{-Value} = 0.9$ ) ενώ δεν υπάρχουν αρκετά δεδομένα για να απορριφθεί η υπόθεση πως η αιθανόλη μεταβάλλεται ( $p\text{-Value} = 0.03$ ).

Για τις ποσότητες από 2 mL και κάτω, προέκυψε πως στους 35 °C η προσθήκη επηρεάζει την ποσότητα κάθε προϊόντος με στατιστική σημαντικότητα ( $p\text{-Value} < 0.001$ ). Το γαλακτικό οξύ και η αιθανόλη επηρεάζονται θετικά ενώ το οξικό οξύ και το προπιονικό οξύ αρνητικά. Στους 40 °C, μόνο το γαλακτικό και το προπιονικό οξύ επηρεάζονται με στατιστικά σημαντικό τρόπο ( $p\text{-Value} < 0.001$ ) ενώ για το οξικό οξύ και την αιθανόλη δεν μπορεί να προκύψει ασφαλώς το συμπέρασμα αυτό (με  $p\text{-Value} = 0.14$  και 0.06 αντίστοιχα).

Τέλος, έγινε ένα t-test για να εξεταστεί ποια προϊόντα επηρεάζονται από την θερμοκρασία. Διαπιστώθηκε πως η θερμοκρασία επηρέασε την παραγωγή κάθε προϊόντος σε κάθε θερμοκρασία ( $p\text{-Value} < 0.001$ ) με μοναδική εξαίρεση το οξικό οξύ σε ποσότητες 0 και 1 mL **μιξ**, το οποίο ήταν ίδιο σε κάθε θερμοκρασία ( $p\text{-Value} = 0.92$  και 0.46 αντίστοιχα).

Έχοντας επιβεβαιώσει ποιες μεταβολές έχουν στατιστική σημαντικότητα, έγινε μία ανάλυση ευαισθησίας για να ποσοτικοποιηθούν τα παραπάνω αποτελέσματα. Η ανάλυση ευαισθησίας έγινε με το πακέτο `GlobalSensitivity.jl`<sup>109</sup> και συγκεκριμένα με την μέθοδο Morris. Ένα πρόβλημα στην εφαρμογή της ανάλυσης ευαισθησίας είναι πως δεν μπορεί να λειτουργήσει με διακριτά σημεία, αλλά χρειάζεται μία συνεχή συνάρτηση. Έγινε η παραδοχή πως από το ένα πειραματικό σημείο στο άλλο η συσχέτιση είναι γραμμική και άρα μπορεί να γίνει μία γραμμική παρεμβολή για να προκύψει η συνάρτηση. Για την παρεμβολή ως προς την ποσότητα του **μιξ**, υπάρχουν πολλά πειραματικά σημεία, οπότε η παρεμβολή θεωρείται έμπιστη. Για την θερμοκρασία, υπάρχουν μόνο 2 σημεία, όμως, έχουν μικρή απόσταση και είναι και οι δύο μεσόφιλες θερμοκρασίες (όπου αναμένεται μικρή διαφορά), οπότε είναι καλή υπόθεση πως στην περιοχή αυτή υπάρχει γραμμικότητα.

Η παρεμβολή έγινε με το πακέτο `Interpolations.jl`<sup>110</sup> το οποίο έχει την δυνατότητα παρεμβολής στα δεδομένα 2 διαστάσεων (θερμοκρασίας και ποσότητας **μιξ**) που έχουν προκύψει. Η ανάλυση ευαισθησίας έγινε ολικά αλλά και σε 2 ακόμη υποπεριοχές (2-8 mL **μιξ** και ξεχωριστά ανά θερμοκρασία). Τα αποτελέσματα τους παρουσιάζονται παρακάτω με χρήση διαγραμμάτων ανεμοστρόβιλου (tornado diagram), το οποίο συνηθίζεται για αποτελέσματα ευαισθησίας. Στο Σχήμα 8.16 φαίνεται η ολική ανάλυση ευαισθησίας.

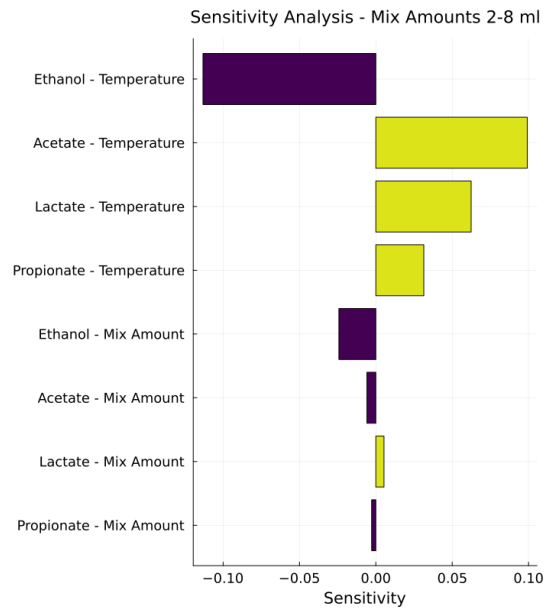


Σχήμα 8.16: Ολική Ανάλυση Ευαισθησίας

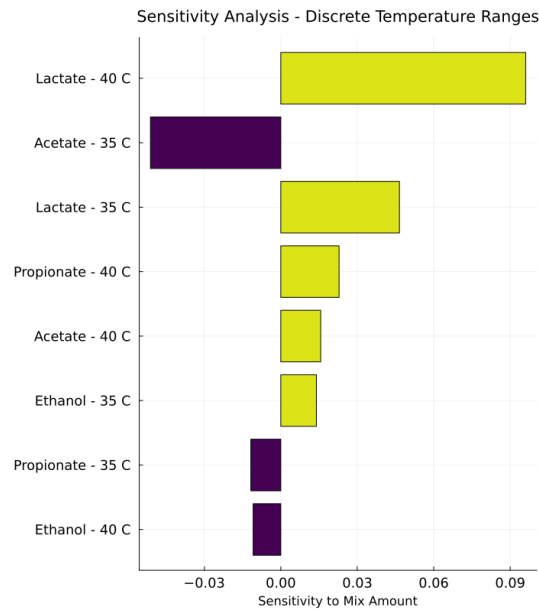
Το διάγραμμα αυτό είναι πολύ σημαντικό καθώς δείχνει τις μεταβλητές που επηρεάζουν την διεργασία το περισσότερο, σε όλο το εύρος της. Φαίνεται πως η θερμοκρασία παίζει τον σημαντικότερο ρόλο στην διεργασία καθώς η επίδραση της θερμοκρασίας στην συγκέντρωση αιθανόλης, οξικού και γαλακτικού οξέος είναι πολύ μεγάλη, ενώ άλλη πολύ σημαντική παράμετρος είναι η ποσότητα μιξ, η οποία επηρεάζει σε πολύ μεγάλο βαθμό την συγκέντρωση του γαλακτικού οξέος.

Όμως, κάποια συμπεράσματα μπορούν να προκύψουν μόνο κοιτάζοντας υποπεριοχές της ευαισθησίας. Για παράδειγμα, το συμπέρασμα ότι η διεργασία δεν βελτιώνεται μετά την προσθήκη πάνω από 2 mL μιξ μπορεί να προκύψει μόνο μελετώντας την υποπεριοχή αυτή, όπως στο Σχήμα 8.17 όπου φαίνεται πως καμία ευαισθησία σε ποσότητα μιξ δεν είναι θετική στην υποπεριοχή αυτή.

Ένα ακόμη χρήσιμο συμπέρασμα προκύπτει από το Σχήμα 8.18, στο οποίο εξετάζονται ξεχωριστά οι δύο θερμοκρασίες. Αυτό είναι πως το οξικό οξύ έχει μία μεγάλη αρνητική επίδραση στην ποσότητα του μιξ στους 35 °C αλλά θετική στους 40 °C. Από το Σχήμα 8.16 είχε διαπιστωθεί πως η θερμοκρασία βοηθάει πάρα πολύ την παραγωγή οξικού οξέος, αλλά αυτό το συμπέρασμα ενισχύεται περαιτέρω από εδώ. Αυτό συμβαίνει επειδή οι μικροοργανισμοί που παράγουν αιθανόλη (οι οποίοι είναι ιδιαίτερα ενεργοί στους 35 °C) δρουν ανταγωνιστικά με τους μικροοργανισμούς που παράγουν οξικό οξύ. Η αλληλεπίδραση αυτή μελετήθηκε σε βάθος στην ανάλυση που έγινε στο [Παράρτημα Α](#).



Σχήμα 8.17: Ανάλυση Ευαισθησίας στην περιοχή 2-8 mL μιξ



Σχήμα 8.18: Ανάλυση ευαισθησίας σε διακριτές θερμοκρασίες

## 8.4 Πειράματα υδρόλυσης πιλοτικής κλίμακας

Στην πιλοτική κλίμακα έγιναν 3 πειράματα υδρόλυσης, οι συνθήκες των οποίων περιγράφηκαν στην Ενότητα 7.5. Παρακάτω, φαίνονται πίνακες για κάθε πείραμα. Ο ένας έχει τα βασικά χαρακτηριστικά των εκροών τα οποία αναλύθηκαν (στερεά και COD), ενώ ο δεύτερος έχει την ημερήσια τροφοδοσία και κατανάλωση υπολειμμάτων τροφών σε κάθε πείραμα. Όπως φαίνεται και από τους πίνακες, η καθημερινή τροφοδοσία δεν είναι ίδια, καθώς τα υπολείμματα τροφών που συλλέγονται από ένα εστιατόριο έχουν εκ φύσεως ανομοιογένεια από μέρα σε μέρα. Οπότε, μπορούν να παρατηρηθούν αποκλίσεις που οφείλονται σε αυτό. Για τον λόγο αυτόν, ως υπόστρωμα στην αναερόβια χώνευση χρησιμοποιήθηκε μία υγρή απορροή που αποτελείται από μίγμα των απορροών των 4 ημερών και περιγράφεται από τον μέσο όρο και την τυπική απόκλιση που φαίνονται σε κάθε πίνακα. Η τυπική απόκλιση αυτή είναι και ένα μέτρο του σφάλματος που αναμένεται να υπάρξει λόγω της ανομοιογένειας στην τροφοδοσία.

Πίνακας 8.2: Υδρόλυση Πιλοτικής Κλίμακας - Αναλύσεις Πρώτου Κύκλου

Day	TS (%)	VS (%)	VS/TS (%)	sCOD (mg/L)	tCOD (mg/L)	sCOD/tCOD (%)
1	0.63	0.54	86.08	4561.5	8792.7	51.88
2	1.26	1.17	92.64	8135.1	13077.5	62.21
3	2.54	2.48	97.38	11134.4	37476.6	29.71
4	2.47	2.42	97.79	12991.1	32053.8	40.53
Mean	1.73	1.65	93.47	9205.5	22850.2	46.08
StDev	0.81	0.83	4.73	3192.3	12163.0	12.17

Πίνακας 8.3: Υδρόλυση Πιλοτικής Κλίμακας - Κατανάλωση ΥΤ Πρώτου Κύκλου

Day	Feed (kg)	Consumption (kg)
1	35	13.64
2	37.5	29.54
3	31.5	38.63
4	39.18	40.91
Mean	35.80	30.68
StDev	2.89	10.72

Στον πρώτο κύκλο παρατηρήθηκε πως τα στερεά του υδρολύματος ήταν αρκετά λίγα, το οποίο είναι λογικό λόγω της μεγάλης αραίωσης που γίνεται και σχεδόν όλα τα στερεά αυτά είναι πτητικά. Ως προς την οργανική ύλη, παρατηρήθηκαν αρκετά μεγάλες διακυμάνσεις από μέρα σε μέρα στο διαλυτό αλλά και ολικό COD της εκροής. Αυτό οφείλεται κυρίως στην τροφοδοσία με διαφορετικά τρόφιμα κάθε ημέρα. Όταν η τροφοδοσία είχε πολλά λαχανικά, παρατηρούνταν ένα χαμηλό COD και αρκετά υψηλός λόγος sCOD/tCOD, όπως έγινε για παράδειγμα τις 2 πρώτες μέρες. Τις επόμενες μέρες, η τροφοδοσία είχε περισσότερα κρεατικά, με αποτέλεσμα το ολικό COD (tCOD) να είναι αρκετά μεγάλο. Κατά μέσο όρο όμως, στο πείραμα αυτό παρατηρήθηκε καλή διαλυτοποίηση της οργανικής ύλης με ένα sCOD/tCOD 46.08%. Ως προς την κατανάλωση των ΥΤ, φάνηκε πως τις 2 πρώτες μέρες οι μικροοργανισμοί δεν μπορούσαν να καταναλώσουν όσα ΥΤ τροφοδοτήθηκαν, αλλά μετά από αυτό, άρχισαν να καταναλώνουν σε γρήγορο ρυθμό. Αυτό σημαίνει πως η δυναμικότητα της διεργασίας στην αναλογία αυτή του μιξ μπορεί να είναι χαμηλή και να απαιτούνται περισσότερα για να λειτουργήσει καλά το πείραμα.

Στον δεύτερο κύκλο αυξήθηκε η ποσότητα νερού που προστίθενται στον αντιδραστήρα, ενώ η μέση παροχή ΥΤ και η παροχή μικροοργανισμών δεν μεταβλήθηκαν. Λόγω του περισ-



Πίνακας 8.4: Υδρόλυση Πιλοτικής Κλίμακας - Αναλύσεις Δεύτερου Κύκλου

Day	TS (%)	VS (%)	VS/TS (%)	sCOD (mg/L)	tCOD (mg/L)	sCOD/tCOD (%)
1	1.07	0.97	91.05	6659.2	14029.6	47.47
2	0.62	0.51	82.13	4754.9	9387.8	50.65
3	0.59	0.50	85.67	3088.6	9149.8	33.76
4	1.54	1.48	96.28	5421.4	21699.1	24.98
Mean	0.95	0.87	88.78	4981.0	13566.6	39.21
StDev	0.39	0.40	0.40	1288.7	5082.4	10.38

Πίνακας 8.5: Υδρόλυση Πιλοτικής Κλίμακας - Κατανάλωση ΥΤ Πρώτου Κύκλου

Day	Feed (kg)	Consumption (kg)
1	39.7	40.91
2	41.5	6.82
3	32.8	34.09
4	36.2	43.18
Mean	37.55	31.25
StDev	3.34	14.5

σότερου νερού, έγινε αραίωση της εκροής με αποτέλεσμα να είχε λιγότερα στερεά αλλά και COD. Όμως, οι παρατηρήσεις που έγιναν παραπάνω υπήρξαν και εδώ. Τα περισσότερα στερεά ήταν πτητικά, ενώ η οργανική ύλη (COD) είχε διακυμάνσεις ανάλογα με την τροφοδοσία που έγινε κάθε ημέρα. Ο τελικός λόγος sCOD/tCOD είναι 39.21% το οποίο φαίνεται μικρότερο από αυτό του πρώτου πειράματος, αλλά λόγω της μεγάλης τυπικής απόκλισης και των δύο, είναι απαραίτητο να γίνει ένας στατιστικός έλεγχος για να εξεταστεί αν είναι σημαντικά μικρότερη τιμή. Αυτός παρουσιάζεται στο **Κεφάλαιο 9**. Ως προς την κατανάλωση των ΥΤ, την 2η μέρα υπήρχε πολύ χαμηλή κατανάλωση, το οποίο σημαίνει πως είναι πιθανόν να υπάρχουν και εδώ τα παραπάνω προβλήματα δυναμικότητας, το οποίο είναι λογικό εφόσον δεν άλλαξε η παροχή ΥΤ ή μικροοργανισμών.

Πίνακας 8.6: Υδρόλυση Πιλοτικής Κλίμακας - Αναλύσεις Τρίτου Κύκλου

Day	TS (%)	VS (%)	VS/TS (%)	sCOD (mg/L)	tCOD (mg/L)	sCOD/tCOD (%)
1	1.10	1.05	95.01	6326.0	13791.6	45.87
2	0.65	0.59	91.55	2326.9	7781.1	29.90
3	0.57	0.52	89.81	1184.3	6650.4	17.81
4	1.00	0.92	92.29	4600.2	12333.8	37.30
Mean	0.83	0.77	92.16	3609.3	10139.2	32.72
StDev	0.22	0.22	1.87	1993.0	2995.4	10.30

Στον τρίτο κύκλο αυξήθηκε η παροχή μικροοργανισμών για να εξεταστεί η επίδραση που θα έχει στην υδρόλυση. Επιπλέον, χρειάστηκε να μειωθεί και η παροχή ΥΤ για το πείραμα αυτό. Με την αύξηση των μικροοργανισμών, το πείραμα αυτό είχε κατανάλωση 100% των τροφοδοτούμενων ΥΤ. Όμως, παρατηρήθηκαν γενικά μικρότερες τιμές στο **διαλυτό COD (sCOD)** σε σχέση με τα προηγούμενα πειράματα και ένας μέσος λόγος sCOD/tCOD 32.72%. Μία πιθανή εξήγηση για αυτό είναι πως εκτός από υδρόλυση του υποστρώματος, οι μικροοργανισμοί αυτοί καταναλώνουν το διαλυτό υπόστρωμα που δημιουργείται με αποτέλεσμα παρότι γίνεται υδρόλυση, η κατανάλωση αυτή, να οδηγεί σε χαμηλότερες τελικές τιμές sCOD.

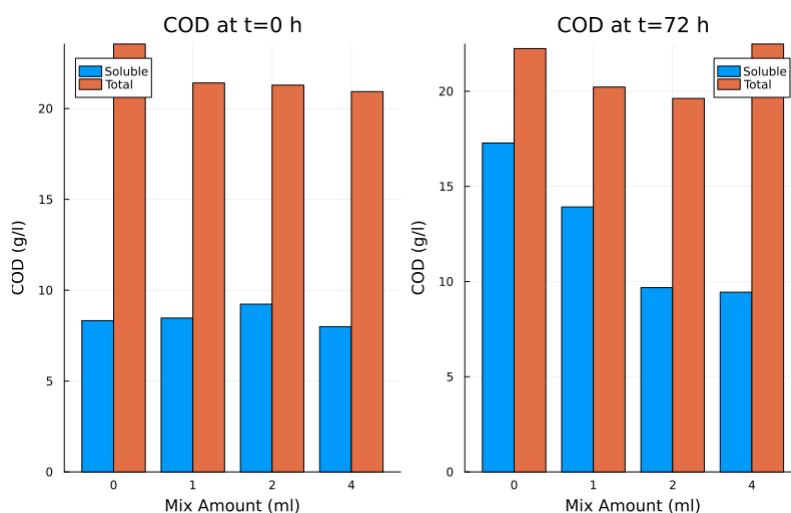


Πίνακας 8.7: Υδρόλυση Πιλοτικής Κλίμακας - Κατανάλωση ΥΤ Τρίτου Κύκλου

Day	Feed (kg)	Consumption (kg)
1	36.4	27.28
2	23.37	27.01
3	10	18.19
4	29.97	27.27
Mean	24.94	24.94
StDev	9.78	3.90

## 8.5 Πειράματα αναερόβιας χώνευσης

1. Προετοιμασία υποστρώματος για αναερόβια χώνευση: Προετοιμάστηκε υπόστρωμα για την αναερόβια χώνευση από τα υδρολύματα εργαστηριακής κλίμακας στους 40 °C. Σε αυτά έγινε μέτρηση μόνο του sCOD, αλλά αναλύθηκε και το ολικό COD (tCOD). Το διάγραμμα αυτό φαίνεται στο Σχήμα 8.19.



Σχήμα 8.19: COD Υδρολυμάτων για προετοιμασία Αναερόβιας Χώνευσης

Το ολικό COD έμεινε περίπου σταθερό, ενώ το διαλυτό αυξήθηκε στις περισσότερες περιπτώσεις. Η μεγάλη αύξηση στις ποσότητες 0 και 1 mL οφείλεται στο γεγονός ότι έγινε υδρόλυση, αλλά υπήρχαν λιγότεροι μικροοργανισμοί για να καταναλώσουν τα υδρολύματα.

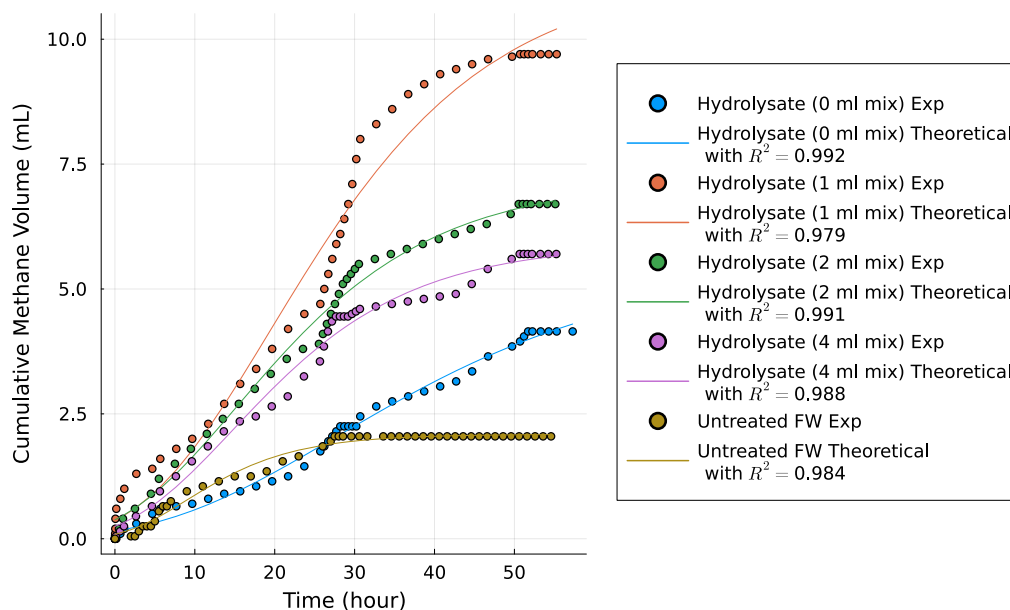
2. Μεθοδολογία επεξεργασίας αποτελεσμάτων: Εφόσον προετοιμάστηκαν αυτά, άρχισε ο πρώτος πειραματικός κύκλος AX. Η ανάλυση των αποτελεσμάτων ήταν αντίστοιχη για κάθε ένα από τα πειράματα. Από τα πειράματα, συλλέχθηκαν φωτογραφίες με τις στάθμες των προχοϊδων, από τις οποίες υπολογιζόταν ο παραγόμενος όγκος μεθανίου. Καθώς οι φωτογραφίες είχαν timestamps, ήταν εύκολο να υπολογιστεί η χρονική στιγμή κάθε φωτογραφίας, γνωρίζοντας ποιά είναι η στιγμή 0. Για την αυτοματοποίηση της ανάλυσης αυτής χρησιμοποιήθηκε η βιβλιοθήκη Dates.jl η οποία είναι built-in στην Julia <sup>102</sup>. Η βιβλιοθήκη αυτή αποθηκεύει την κάθε χρονική στιγμή, με βάση την τελευταία χρονική υποδιαίρεση που έχει (στην περίπτωση αυτή msec). Οπότε, έγινε μετατροπή αυτού σε πιο χρήσιμες μονάδες χρόνου όπως τα λεπτά και οι ώρες. Για τον παραγόμενο όγκο μεθανίου σε κάθε περίπτωση, είναι πιο χρήσιμος ο αθροιστικός όγκος και όχι ο στιγμιαίος, ο οποίος μπορεί να υπολογιστεί εύκολα με την συνάρτηση cumsum.

Έπειτα, έγινε μία προσαρμογή των δεδομένων του όγκου μεθανίου με τον χρόνο, χρησιμοποιώντας το τροποποιημένο μοντέλο Gompertz, όπως αναφέρθηκε στην [Ενότητα 6.4](#). Αυτή έγινε με την βοήθεια της βιβλιοθήκης LsqFit.jl, η οποία χρησιμοποιεί τον αλγόριθμο Levenberg-Marquardt, όπως αυτός έχει υλοποιηθεί στην βιβλιοθήκη Optim.jl <sup>111</sup> για την προσαρμογή σε μη γραμμικά μοντέλα. Εκτός από αυτήν την προσαρμογή, έγινε και μία προσαρμογή στα δεδομένα όγκου μεθανίου ανά g VS λάσπης στον αντιδραστήρα. Αυτό είναι σημαντικό καθώς ο ρυθμός παραγωγής μεθανίου ανά g VS λάσπης αποτελεί την **sludge methanogenic activity - ειδική μεθανογόνος δραστηριότητα της λάσπης (SMA)**, η οποία είναι ιδιαίτερα σημαντική για την σύγκριση των αποτελεσμάτων. Για κάθε μοντέλο υπολογίστηκε ο συντελεστής προσαρμογής  $R^2$ , για να διαπιστωθεί αν έγινε καλά η προσαρμογή.

Παρακάτω θα παρουσιαστούν κάποια διαγράμματα για την παραγωγή μεθανίου από κάθε υδρόλυμα σε κάθε κύκλο, καθώς και πίνακες με τις σταθερές του κάθε μοντέλου που προσαρμόστηκε.

3. ΑΧ εργαστηριακών υδρόλυμάτων με Λάσπη 1: Για τον κύκλο αυτόν, αρχικά εξετάστηκε η παραγωγή μεθανίου από οξικό οξύ, με προσθήκη ποσότητας 100 mg. Βρέθηκε, πως το οξικό οξύ μπορεί να παράγει  $34.2 \pm 12.0$  mL CH<sub>4</sub>. Θεωρητικά, 1 g COD-eq οξικού οξέος πρέπει να παράγει 350 mL μεθάνιο. Οπότε, αυτά τα πειραματικά αποτελέσματα είναι αρκετά λογικά. Η SMA σε αυτό το πείραμα ήταν  $261.48 \pm 74.36 \frac{\text{mL CH}_4}{\text{gVS hour}}$ .

Όταν οι αντιδραστήρες τροφοδοτήθηκαν με υδρόλυματα, προέκυψαν τα αποτελέσματα του Σχήματος [8.20](#) και του Πίνακα [8.8](#).



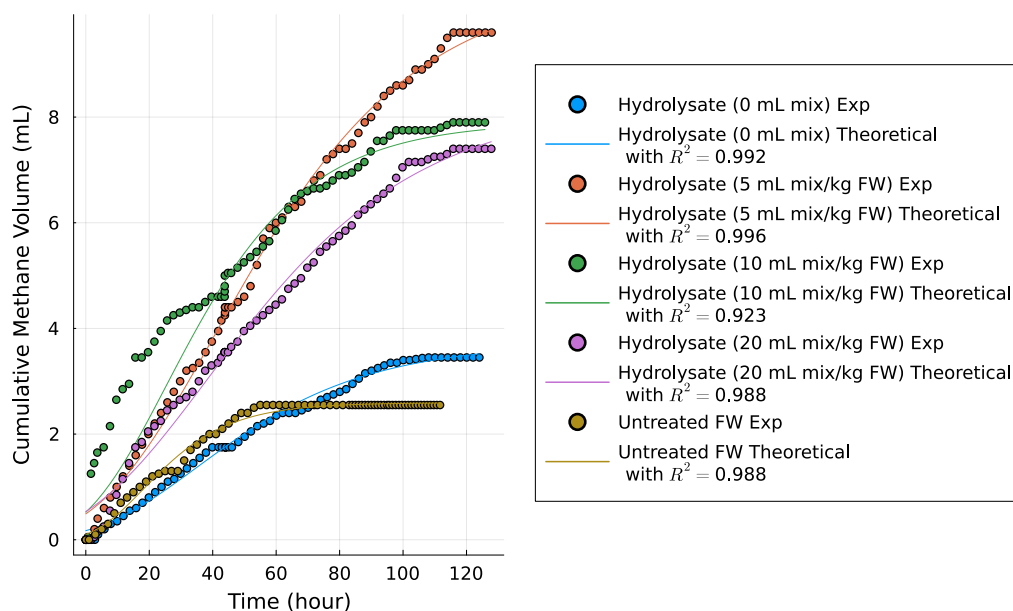
Σχήμα 8.20: Παραγωγή Μεθανίου από Εργαστηριακά Υδρόλυματα - Λάσπη 1

Η παραγωγή μεθανίου στα πειράματα αυτά ήταν αρκετά χαμηλή σε σχέση με αυτήν του οξικού. Για να διαπιστωθεί αν μπορεί να επαναληφθεί το αποτέλεσμα αυτό (για να κριθεί και η εγκυρότητα του), έγινε μία 2η τροφοδοσία στον κύκλο αυτόν. Τα αποτελέσματα του κύκλου αυτού φαίνονται στο Σχήμα [8.21](#) και στον Πίνακα [8.9](#).

Στον κύκλο αυτόν, φαίνεται γενικά μία καλή επαναληψιμότητα. Εμφανίζονται οι ίδιες τάσεις στην ποσότητα μεθανίου που παράγεται και παρόμοιοι χρόνοι καθυστέρησης. Οι SMA είναι χαμηλότερες, το οποίο εξηγείται καθώς το προηγούμενο πείραμα έγινε ακριβώς μετά την τροφοδοσία με οξικό οξύ, όπου η λάσπη ήταν πιο ενεργή. Η βασική

Πίνακας 8.8: Κινητικές Σταθερές Παραγωγής Μεθανίου για Εργαστηριακά Υδρολύματα με Λάσπη 1

Reactor	BMP (mL)	SMA (mL/gVS hour)	Lag Time (hour)	$R_{\text{squared}}$
Hydro 0	5.56	0.061	5.994	0.992
Hydro 1	11.309	0.17	3.652	0.979
Hydro 2	7.182	0.121	1.108	0.991
Hydro 4	5.902	0.11	1.948	0.988
FW	2.09	0.064	1.174	0.984



Σχήμα 8.21: Παραγωγή Μεθανίου από Υδρολύματα - Λάσπη 1 (Επανάληψη)

Πίνακας 8.9: Κινητικές Σταθερές Παραγωγής Μεθανίου για Υδρολύματα με Λάσπη 1 (Επανάληψη)

Reactor	BMP (mL)	SMA (mL/gVS hour)	Lag Time (hour)	$R_{\text{squared}}$
Hydro 0	3.726	0.028	3.854	0.992
Hydro 1	10.568	0.071	4.425	0.996
Hydro 2	7.774	0.074	0.0	0.923
Hydro 4	8.294	0.052	0.348	0.988
FW	2.593	0.04	2.666	0.988

διαφορά αυτού του πειράματος ήταν το πείραμα με το υδρόλυμα με 2 mL **μιξ** το οποίο είχε μηδενικό χρόνο υστέρησης επειδή είχε γρήγορη παραγωγή μεθανίου στη φάση αυτή. Όμως, αυτό που έμεινε περίπου ίδιο στις δύο επαναλήψεις ήταν ότι η παραγωγικότητα ήταν σχετικά χαμηλή. Αρχικά, μετρήθηκε το τελικό pH στον κάθε αντιδραστήρα για να εξεταστεί αν αυτό έπαιξε ρόλο στην χαμηλή παραγωγικότητα. Τα αποτελέσματα φαίνονται στον Πίνακα 8.10.

Πίνακας 8.10: Τελικό pH Αντιδραστήρων Αναερόβιας Χώνευσης με Λάσπη 1

Αριθμός	pH
0	8.93
1	7.76
2	7.19
4	6.76
FW	4.22

Οι αντιδραστήρες με ανεπεξέργαστο **ΥΤ** και υδρόλυμα χωρίς προσθήκη **μιξ** είχαν μία αρκετά όξινη τιμή pH για αναερόβια χώνευση τα οποία μπορεί να επηρέασαν την διεργασία, αλλά στις υπόλοιπες δοκιμές, οι τιμές του pH δεν φαίνονται να δημιουργούν πρόβλημα παρεμπόδισης.

Σε μία προσπάθεια να βρεθεί το πρόβλημα που οδήγησε στην χαμηλή σχετικά παραγωγικότητα, έγινε ένας δεύτερος κύκλος, χρησιμοποιώντας λάσπη διαφορετικής ενεργότητας και σε διπλάσια ποσότητα, όπως περιγράφηκε και στην **Ενότητα 7.7**.

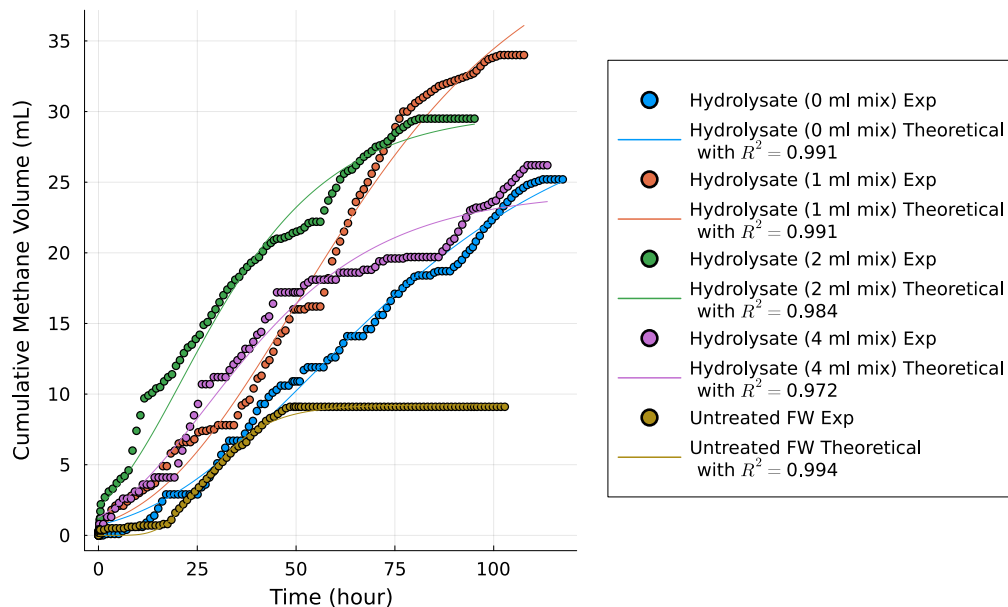
4. ΑΧ εργαστηριακών υδρολυμάτων με Λάσπη 2: Για τον κύκλο αυτόν, έγινε πάλι μία δοκιμή με οξικό οξύ με σκοπό την μέτρηση του μέγιστου ρυθμού παραγωγής μεθανίου. Με την προσθήκη του οξικού, παράχθηκε μία ποσότητα μεθανίου, η οποία ήταν της τάξης του  $11.0 \pm 2.9 \text{ mL CH}_4$  μέσα στα πρώτα 10-15 λεπτά. Η **SMA** στο διάστημα αυτό ήταν  $68.54 \pm 32.36 \frac{\text{mL CH}_4}{\text{gVS hour}}$ . Οπότε, φαίνεται πως η λάσπη αυτή είναι λιγότερο δραστική από την προηγούμενη.

Όμως, στο πείραμα αυτό, υπήρξε μία ιδιορρυθμία. Μετά την ταχεία παραγωγή αυτή, δεν παράχθηκε μεθάνιο για μερικές ώρες και μετά από 10 ώρες ξανά ξεκίνησε σε έναν αντιδραστήρα η παραγωγή μεθανίου, με αργότερο ρυθμό (ενώ μέσα σε 24 ώρες είχαν ξανά ξεκινήσει την παραγωγή όλοι οι αντιδραστήρες). Αυτή η παραγωγή αφέθηκε για 90 ώρες περίπου και βρέθηκε να είναι της τάξης των  $84.6 \pm 18.1 \text{ mL CH}_4$  και είχε **SMA**  $13.51 \pm 4.04 \frac{\text{mL CH}_4}{\text{gVS hour}}$ .

Οπότε, θεωρήθηκε πως η λάσπη είχε αποθηκευμένη κάποια άλλη τροφή, από την οποία παράχθηκε το μεθάνιο αυτό. Όμως, μέσα στην παραγωγή αυτή είναι πιθανόν να ήταν και κάποια ποσότητα μεθανίου που παράχθηκε από οξικό, μιας και η παραγωγή που έγινε στην αρχή του πειράματος ήταν πολύ χαμηλή.

Κατά την τροφοδοσία με τα υδρολύματα, παρατηρήθηκε πάλι πολύ μεγάλη παραγωγή μεθανίου. Όμως, όταν αφαιρέθηκε η ποσότητα μεθανίου η οποία είχε παραχθεί στην αργή φάση από το οξικό (η οποία οφειλόταν μάλλον σε άλλη τροφή), παρατηρήθηκε πως τα αποτελέσματα έβγαιναν αρκετά λογικά. Οπότε, τα αποτελέσματα που παρουσιάζονται είναι η παραγωγή μεθανίου από τα υδρολύματα, αφαιρώντας την παραγωγή εκείνης της φάσης, θεωρώντας ότι οφείλεται σε κάτι άλλο, το οποίο δεν μπορούμε να ελέγξουμε. Τα διορθωμένα αυτά αποτελέσματα παρουσιάζονται στο **Σχήμα 8.22** και στον **Πίνακα 8.11**.

Από το πείραμα αυτό διαπιστώθηκε πως παρόλο που η λάσπη αυτή είχε χαμηλότερη ενεργότητα, λόγω του μεγαλύτερου εμβολίου, παράχθηκε περισσότερο μεθάνιο. Οπότε,



Σχήμα 8.22: Παραγωγή Μεθανίου από Εργαστηριακά Υδρολύματα - Λάσπη 2

Πίνακας 8.11: Κινητικές Σταθερές Παραγωγής Μεθανίου για Εργαστηριακά Υδρολύματα με Λάσπη 2

Reactor	BMP (mL)	SMA (mL/gVS hour)	Lag Time (hour)	R <sub>squared</sub>
Hydro 0	31.008	0.066	13.348	0.991
Hydro 1	43.802	0.108	14.096	0.991
Hydro 2	30.014	0.125	0.0	0.984
Hydro 4	24.364	0.086	2.023	0.972
FW	9.242	0.086	15.935	0.994

λογικά η χαμηλή παραγωγή στο προηγούμενο πείραμα οφειλόταν μάλλον σε λιγότερη αρχική ποσότητα εμβολίου.

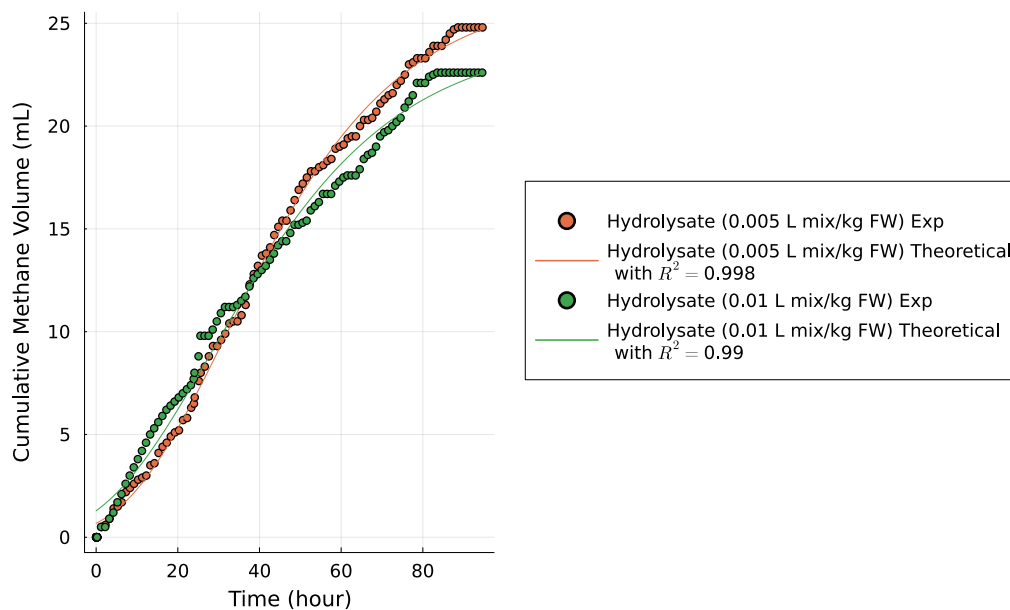
Τέλος, μετρήθηκε και το τελικό pH των αντιδραστήρων.

Πίνακας 8.12: Τελικό pH Αντιδραστήρων Αναερόβιας Χώνευσης με Λάσπη 2

Αριθμός	pH
0	7.93
1	7.75
2	7.86
4	7.96
FW	8.06

Στο πείραμα αυτό γενικά τα pH ήταν υψηλότερα και στο ανεπεξέργαστο ΥΤ δεν φάνηκε να οξινίζεται υπερβολικά ο αντιδραστήρας. Αυτό συνέβη αρχικά επειδή η λάσπη αυτή ήταν πιο αλκαλική (7.2), αλλά πιθανόν και επειδή έγινε μόνο ένας κύκλος, άρα λιγότερη όξινη τροφοδοσία.

5. ΑΧ πιλοτικών υδρολυμάτων: Για τον κύκλο αυτόν, όπως αναφέρθηκε στην Ενότητα 7.7 εξετάστηκαν 2 από τα πιλοτικά υδρολύματα με χρήση 2 διαφορετικών πηγών λάσπης. Η πρώτη ήταν η Λάσπη 2 που χρησιμοποιήθηκε παραπάνω. Τα αποτελέσματα αυτής φαίνονται στο Σχήμα 8.23 και στον πίνακα 8.13.



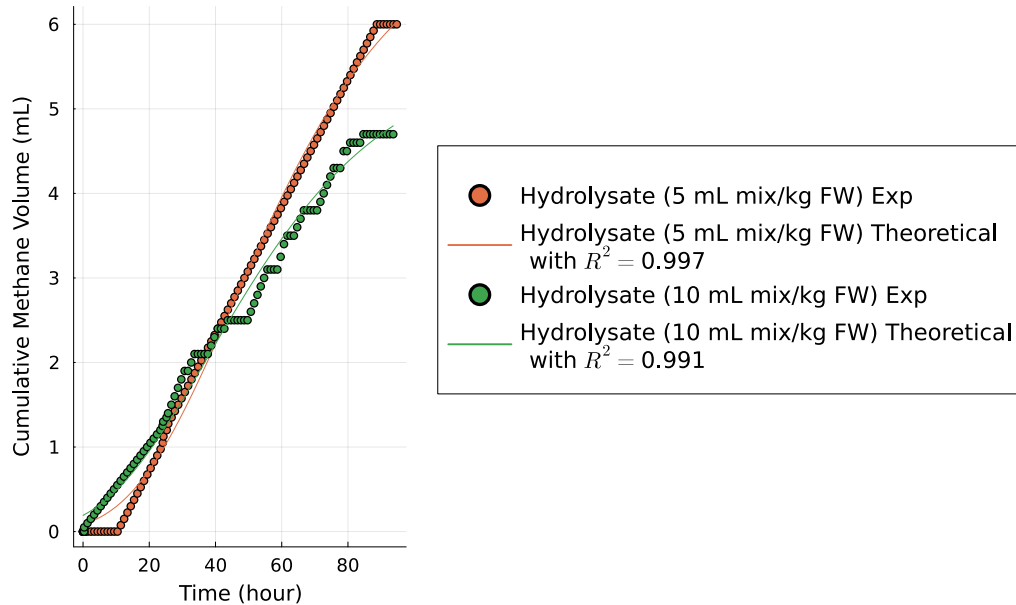
Σχήμα 8.23: Παραγωγή Μεθανίου από Πιλοτικά Υδρολύματα - Λάσπη 2

Πίνακας 8.13: Κινητικές Σταθερές Παραγωγής Μεθανίου για Πιλοτικά Υδρολύματα με Λάσπη 2

Reactor	BMP (mL)	SMA (mL/gVS hour)	Lag Time (hour)	R <sub>squared</sub>
Hydro P1	26.656	0.096	7.326	0.998
Hydro P3	25.629	0.081	4.545	0.994

Σε αντίστοιχη λογική έγινε και η ανάλυση για την Λάσπη 3, ενώ σε ξεχωριστό αντιδραστήρα, μετρήθηκε το BMP και η SMA της με οξικό. Παράχθηκαν 29.8 mL CH<sub>4</sub> από την λάσπη 3 κατά την τροφοδοσία με οξικό και η SMA ήταν 870.78  $\frac{\text{mL CH}_4}{\text{gVS hour}}$  η οποία

είναι αρκετά μεγαλύτερη από τις άλλες δύο λάσπες. Οπότε, βγήκε το συμπέρασμα πως η Λάσπη 3 είναι η πιο ενεργή από τις τρεις λάσπες που χρησιμοποιήθηκαν, παρότι έχει πολύ χαμηλά VS και αλκαλικότητα σε αντίθεση με τις άλλες λάσπες (7.2), το οποίο είναι και αναμενόμενο καθώς είναι κοκκώδης λάσπη. Τα αποτελέσματα της τροφοδοσίας με υδρολύματα για την λάσπη αυτή φαίνονται στο Σχήμα 8.24 και στον Πίνακα 8.14.



Σχήμα 8.24: Παραγωγή Μεθανίου από Πιλοτικά Υδρολύματα - Λάσπη 3

Πίνακας 8.14: Κινητικές Σταθερές Παραγωγής Μεθανίου για Πιλοτικά Υδρολύματα με Λάσπη 3

Reactor	BMP (mL)	SMA (mL/gVS hour)	Lag Time (hour)	R <sub>squared</sub>
Hydro P1	7.344	0.179	15.071	0.997
Hydro P3	5.674	0.133	6.863	0.991

Στα πειράματα αυτά παράχθηκε πολύ λιγότερο μεθάνιο σε σχέση με τα πειράματα με την Λάσπη 2, το οποίο είναι αναμενόμενο επειδή το εμβόλιο της Λάσπης 2 ήταν 8 φορές περισσότερο σε VS από ότι αυτό της Λάσπης 3. Η λάσπη όμως είναι αρκετά ενεργή καθώς η SMA είναι μεγαλύτερη στα πειράματα αυτά.



## Κεφάλαιο 9

# Συζήτηση Αποτελεσμάτων

Στο κεφάλαιο αυτό θα γίνει η συζήτηση των σημαντικότερων από τα πειραματικά αποτελέσματα καθώς και η παράθεση κάποιων συγκριτικών αποτελεσμάτων, με σκοπό να προκύψουν και τα βασικότερα συμπεράσματα της μελέτης αυτής.

### 9.1 Μεταβολικά Μονοπάτια Οξεογένεσης

Ένα από τα πιο ενδιαφέροντα συμπεράσματα της μελέτης είναι η διαπίστωση του μεταβολικού μονοπατιού που ακολουθείται στην διεργασία. Η γνώση αυτού μπορεί να βοηθήσει και στην βελτιστοποίηση της διεργασίας.

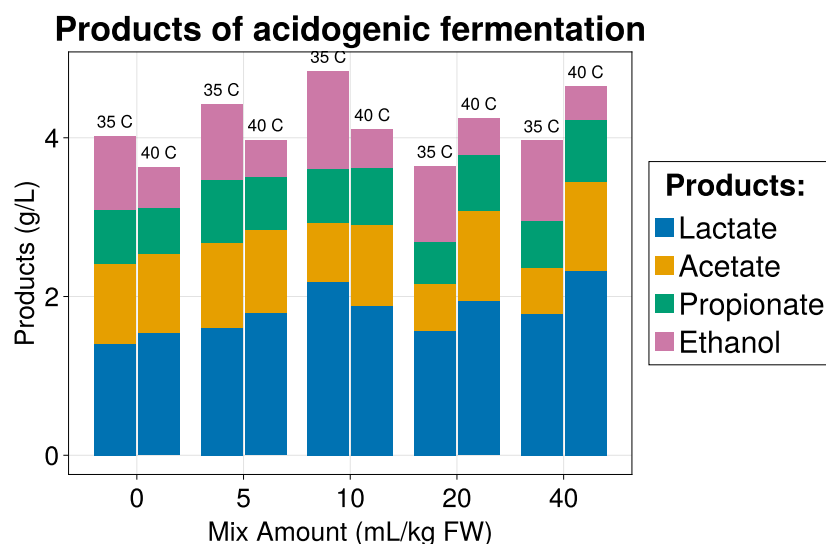
Η αποδόμηση των διαλυτών σακχάρων έγινε αποτελεσματικά σε κάθε πείραμα. Η σακχαρόζη και η γλυκόζη καταναλώθηκαν σε κάθε περίπτωση μέσα στην πρώτη μέρα με το πείραμα στους 40 °C να έχει τον γρηγορότερο ρυθμό αποικοδόμησης. Για την φρουκτόζη, το δοκιμαστικό πείραμα το οποίο έγινε στους 45 °C είχε συσσώρευση φρουκτόζης ακόμη και μετά από 1 εβδομάδα πειράματος, το οποίο δείχνει πως υπάρχει μία δυσκολία στον μεταβολισμό της. Παρότι και στις άλλες θερμοκρασίες ο μεταβολισμός της είναι αργός, στα πειράματα εκείνα μεταβολίζεται πλήρως. Ως προς την παραγωγή τους, από το κινητικό πείραμα διαπιστώθηκε πως την πρώτη μέρα υπάρχει αύξηση σακχάρων, το οποίο επιβεβαιώνει ότι συμβαίνει μία υδρόλυση κατά την διάρκεια της διεργασίας αυτής.

Τα μεταβολικά προϊόντα που παρατηρούνται είναι το γαλακτικό οξύ, το οξικό οξύ, το προπιονικό οξύ και η αιθανόλη. Τα προϊόντα αυτά είναι συνήθη προϊόντα της οξεογένεσης (Κεφάλαιο 5). Συγκεκριμένα, το γαλακτικό οξύ έχει παρατηρηθεί να παράγεται σε μεγάλες ποσότητες σε όξινα περιβάλλοντα και ιδιαίτερα με υπόστρωμα **YT**, στα οποία έχει παρατηρηθεί συχνά η ύπαρξη ενδογενών μικροοργανισμών του γένους *Lactobacillus*<sup>70,71</sup>. Τα μονοπάτια που παράγουν γαλακτικό οξύ είναι το **μεταβολικό μονοπάτι Phosphoketolase (PK)** γνωστό και ως ετερογαλακτική ζύμωση καθώς και η αναγωγή του πυροσταφυλικού που παράγεται από την γλυκόλυση, γνωστό ως ομογαλακτική ζύμωση. Είναι πιθανό πως στο σύστημα που εξετάζεται υπάρχουν και τα δύο, καθώς η παραγωγή μεγάλης ποσότητας αιθανόλης μπορεί να σημαίνει ότι παράχθηκε μαζί με το γαλακτικό οξύ κατά την ετερογαλακτική ζύμωση ενώ το προπιονικό οξύ παράγεται από την περαιτέρω αναγωγή του γαλακτικού οξέος κατά την ομογαλακτική ζύμωση<sup>61,62</sup>. Το οξικό οξύ είναι επίσης λογικό να παραχθεί καθώς παράγεται σχεδόν σε κάθε οξεογένεση και ειδικά στην περίπτωση που τα υπόλοιπα προϊόντα είναι αναγωγικά, είναι ένα απαραίτητο προϊόν για να ρυθμίσει το **οξειδωαναγωγικό δυναμικό (redox)** της αντίδρασης. Τέλος, εφόσον παράγεται το **Acetyl-CoA** για τον σκοπό αυτόν, είναι πιθανό πως αιθανόλη παράγεται και από το αναγωγικό μονοπάτι αυτού<sup>70,74</sup>.

Από τα αποτελέσματα του δοκιμαστικού πειράματος, παρατηρήθηκε πως η αιθανόλη και το γαλακτικό οξύ παράγονται σε μεγάλο βαθμό τις πρώτες μέρες, ενώ μετά τις 3 μέρες, αρχίζουν να συσσωρεύονται οξικό και προπιονικό οξύ, καταναλώνοντας τα προϊόντα αυτά για την παραγωγή τους. Η κατανάλωση της αιθανόλης σημαίνει λογικά πως έχει ενεργοποιηθεί

η οξεικογενετική αντίδραση της (Ενότητα 6.2) ενώ για το γαλακτικό οξύ, λογικά υπάρχει μία μικτή κατανάλωση προς οξικό και προπιονικό οξύ ανάλογα με το redox (Ενότητα 6.2). Η μείωση της αιθανόλης υπήρχε σε κάθε πείραμα, κάτι λογικό καθώς είναι εύκολο να υπάρξουν οι συνθήκες για αυθόρμητη μετατροπή αιθανόλης σε οξικό, ενώ η μείωση του γαλακτικού δεν παρατηρήθηκε εκ νέου. Η αναγωγή του σε προπιονικό σίγουρα έγινε - καθώς παράχθηκε προπιονικό - ενώ η οξείδωση του σε οξικό δεν είναι σίγουρο αν έγινε καθώς υπάρχουν αρκετές άλλες αντιδράσεις από τις οποίες μπορεί να παράχθηκε το οξικό οξύ. Ακόμη και αν έγινε όμως, ο ρυθμός της ήταν χαμηλός καθώς ο συνολικός ρυθμός παραγωγής γαλακτικού οξέος ήταν μεγαλύτερος από τον ρυθμό κατανάλωσης του. Όμως, στο πείραμα αυτό σε κάποιες στιγμές παρατηρούνταν και κατανάλωση οξικού και προπιονικού οξέος. Από τα μεταβολικά μονοπάτια που έχουν μελετηθεί, το μόνο που καταναλώνει οξικό οξύ είναι η παραγωγή μεθανίου, η οποία δεν μπορεί να γίνει καθώς ο αντιδραστήρας δεν είχε αρχαία, και η οξεικογένεση του προπιονικού οξέος, η οποία είναι μία δύσκολη αντίδραση θερμοδυναμικά και δεν είναι ιδιαίτερα πιθανό να έγινε. Η εξήγηση σε αυτό μπορεί να είναι η παρουσία οξυγόνου στον αντιδραστήρα, όπως αναφέρθηκε στο Ενότητα 7.2. Παρουσία οξυγόνου, η μετατροπή του οξικού οξέος σε CO<sub>2</sub> μέσω του κύκλου του Krebs είναι αρκετά πιθανή, ενώ η οξείδωση του προπιονικού σε οξικό, με οξειδωτικό μέσο το οξυγόνο είναι πολύ πιο εφικτή. Οπότε, η μικρή μείωση των προϊόντων αυτών, και πιθανόν σε ένα βαθμό και των άλλων δύο, μπορεί να οφείλεται και στην παρουσία του οξυγόνου στον αντιδραστήρα.

Το προπιονικό οξύ φαίνεται να παράγεται σε παρόμοια ποσότητα ανεξαρτήτως ποσότητας μιξ και θερμοκρασίας, ενώ η αιθανόλη φαίνεται να παράγεται σε πολύ περισσότερη ποσότητα στους 35 °C σε σχέση με τα άλλα πειράματα. Οπότε, είναι πιθανό πως οι μικροοργανισμοί που καταλύουν την αντίδραση παραγωγής αιθανόλης αναστέλλονται σε υψηλότερη θερμοκρασία. Η παρατήρηση αυτή έρχεται σε συμφωνία και με άλλες μελέτες καθώς η παραγωγή αιθανόλης γίνεται τυπικά σε χαμηλές θερμοκρασίες για να είναι ενεργοί οι μικροοργανισμοί<sup>13,40</sup>. Επίσης, έγινε και ένα διάγραμμα των προϊόντων που παράγονται σε κάθε συνθήκη (Σχήμα 9.1), από το οποίο είναι πιο εύκολο να φανούν τα συγκριτικά συμπεράσματα σε σχέση με τα προηγούμενα.



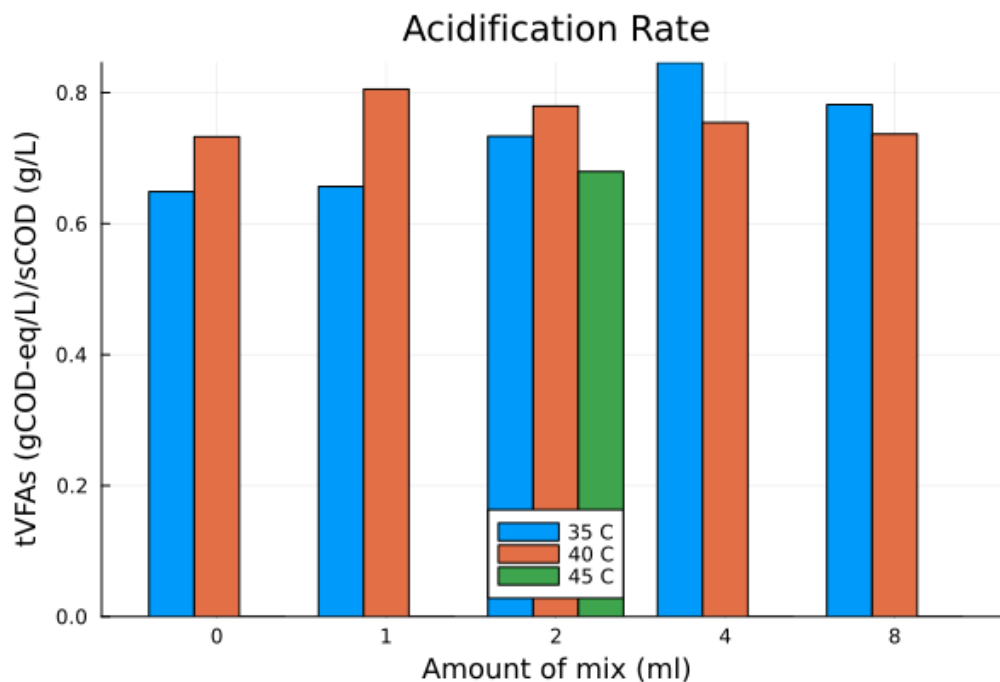
Σχήμα 9.1: Προϊόντα της οξεικογενούς ζύμωσης

Από το διάγραμμα αυτό, φαίνεται η συνολική συγκέντρωση προϊόντων σε κάθε πείραμα, η οποία είναι χρήσιμη κατ'απόλυτη τιμή, αλλά ακόμη πιο χρήσιμο είναι πως φαίνεται η αναλογία

των προϊόντων σε κάθε περίπτωση. Κάποια βασικά σχόλια είναι πως φαίνεται ότι στους 40 °C παράγεται περισσότερο οξικό και γαλακτικό οξύ, αλλά λιγότερη αιθανόλη.

## 9.2 Συγκεντρωτικά Κριτήρια Απόδοσης

Εκτός από το είδος των προϊόντων που παράγονται σε κάθε πείραμα - το οποίο είναι σημαντικό καθώς δεν είναι όλα το ίδιο χρήσιμα για την **AX** - είναι πολύ σημαντικό να εξεταστούν και κάποια συγκεντρωτικά κριτήρια, τα οποία εξετάζουν πόσα προϊόντα παράχθηκαν σε κάθε πείραμα, ανεξαρτήτως της αναλογίας μεταξύ των διάφορων προϊόντων. Στην μελέτη αυτή, αξιολογήθηκαν 2 τέτοια κριτήρια. Το πρώτο είναι ο λόγος  $\frac{tVFAs \text{ in COD-eq}}{sCOD}$  ο οποίος λέγεται και οξίνιση του αντιδραστήρα και δείχνει πόσο από το τελικό **sCOD** είναι οξεογενή προϊόντα. Ο λόγος αυτός χρησιμοποιείται ευρέως ως απόδοση της οξεογένεσης <sup>45,77</sup>. Στο Σχήμα 9.2 παρουσιάζεται ο λόγος αυτός για κάθε ένα από τα πειράματα.



Σχήμα 9.2: Οξίνιση των Αντιδραστήρων

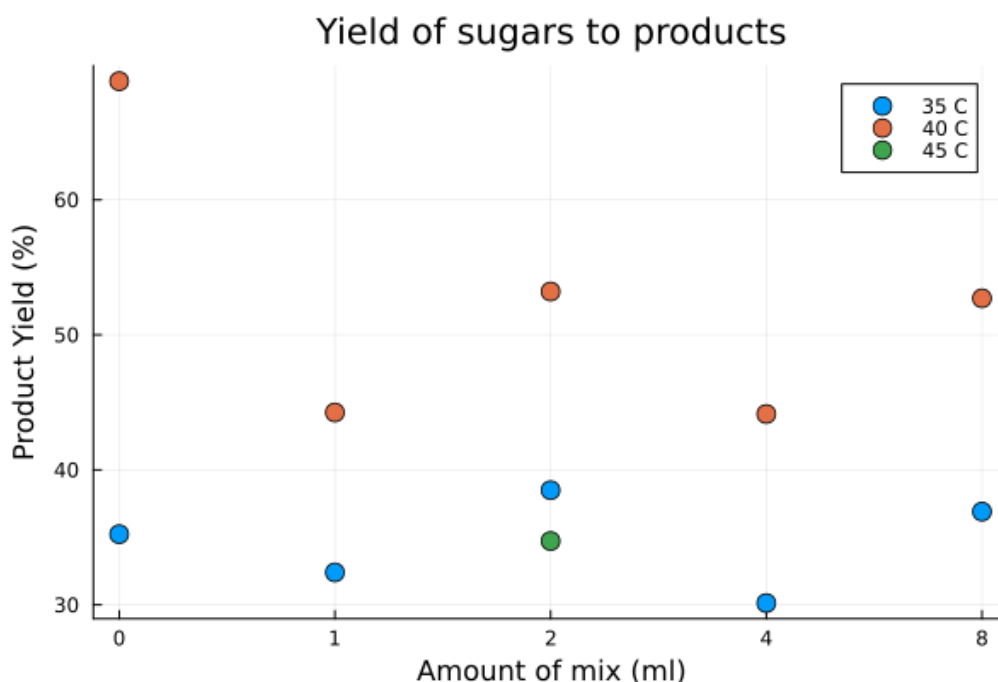
Από το διάγραμμα αυτό παρατηρείται πως το πείραμα στους 40 °C έχει καλύτερη οξίνιση σε χαμηλές ποσότητες **μιξ**, ενώ το πείραμα στους 35 °C είναι καλύτερο στις υψηλότερες ποσότητες. Το δοκιμαστικό πείραμα στους 45 °C δεν έχει πάρα πολύ υψηλό βαθμό οξίνισης.

Το δεύτερο συγκεντρωτικό κριτήριο το οποίο εξετάστηκε είναι ο λόγος

$$\frac{tVFAs_{final} - tVFAs_{initial}}{tSugars_{final} - tSugars_{initial}}$$

ο οποίος λόγος εξετάζει την απόδοση μετατροπής των σακχάρων σε προϊόντα και θεωρείται ένα ακόμη χρήσιμο κριτήριο. Τα σχετικά αποτελέσματα παρουσιάζονται στο Σχήμα 9.3.

Από το διάγραμμα αυτό, παρατηρείται πως το πείραμα στους 40 °C έχει σε κάθε περίπτωση την καλύτερη απόδοση μετατροπής, ενώ οι 45 °C έχουν μάλλον την χειρότερη (καθώς η μία ποσότητα που εξετάστηκε έχει χαμηλότερη απόδοση από την αντίστοιχη στους 35 °C). Αξίζει να σημειωθεί πως ακολουθείται μία παρόμοια τάση στις δύο θερμοκρασίες, όπου τα πειράματα με προσθήκη 1 ή 4 mL **μιξ** έχουν χειρότερο αποτέλεσμα από τα 0, 2 και 8 mL **μιξ**, ενώ τα 2 και 8 mL **μιξ** φαίνεται να έχουν το ίδιο yield. Αξιοσημείωτο αποτέλεσμα είναι η απόδοση μετατροπής του πειράματος με 0 mL **μιξ** στους 40 °C. Το πείραμα αυτό είχε



Σχήμα 9.3: Απόδοση μετατροπής σακχάρων σε οξειγενή προϊόντα

πολύ χαμηλό αρχικό COD, αλλά κατά την ζύμωση, είχε καλύτερη απόδοση μετατροπής από τα άλλα πειράματα. Μία εξήγηση για αυτό είναι ότι παράχθηκαν περισσότερα προϊόντα, αλλά υπήρχαν πολύ λίγοι μικροοργανισμοί στο σύστημα, με αποτέλεσμα να μην καταναλωθεί κάποια ποσότητα τους, το οποίο θα μείωνε την μετατροπή.

Επίσης, αξίζει να σημειωθεί πως οι μετατροπές αυτές είναι κάτω από 70% σε κάθε περίπτωση. Αυτό συμβαίνει επειδή τα σάκχαρα δεν παράγουν μόνο αυτά τα προϊόντα, αλλά και άλλες ενώσεις, όπως το διοξείδιο του άνθρακα και το υδρογόνο, ενώ κάποια ποσότητα τους χρησιμοποιείται και για την ανάπτυξη της βιομάζας των μικροοργανισμών<sup>70,74</sup>. Οπότε, δεν θεωρείται το καλύτερο κριτήριο για την διεργασία αυτή, παρότι είναι μία ενδιαφέρουσα μέτρηση.

### 9.3 Ανάλυση Ευαισθησίας

Από το Σχήμα 8.16, υπάρχει η ένδειξη πως η θερμοκρασία παίζει ένα πάρα πολύ σημαντικό ρόλο στη ζύμωση καθώς οι 2 σημαντικότερες επιδράσεις είναι η επίδραση της θερμοκρασίας στην παραγωγή οξικού οξέος (η οποία είναι θετική) και η επίδραση της θερμοκρασίας στην αιθανόλη, (η οποία είναι αρνητική) ενώ η επίδραση της θερμοκρασίας στο γαλακτικό οξύ είναι και αυτή σημαντική.

Ως προς την ποσότητα **μιξ**, φαίνεται πως η ποσότητα 2 mL είναι η μέγιστη ευνοϊκή καθώς από το Σχήμα 8.17 διαπιστώθηκε πως καμία ένωση δεν ευνοείται από την προσθήκη του **μιξ** στην περιοχή 2-8 mL. Όμως, το γαλακτικό οξύ και το οξικό οξύ, τα οποία είναι τα πιο επιθυμητά προϊόντα της διεργασίας, έχουν μία θετική ευαισθησία στην προσθήκη του **μιξ** στους 40 °C, οπότε θεωρείται πως η βέλτιστη ζύμωση γίνεται στην ποσότητα αυτή.

### 9.4 Υδρόλυση σε Πιλοτική Κλίμακα

Ως αποκρίσεις του πειράματος θεωρήθηκαν ο λόγος sCOD/tCOD, ο οποίος εκφράζει την βιοαποδομησιμότητα του υποστρώματος και ο λόγος κατανάλωσης/τροφοδοσίας υπολειμμάτων, ο οποίος εκφράζει την δυναμικότητα του οργάνου.

Για τον πρώτο πειραματικό κύκλο, ο λόγος sCOD/tCOD ήταν  $46.1 \pm 12.2\%$  ενώ η συνολική κατανάλωση τροφίμων  $85.7\%$ .

Επειτα, εξετάστηκε η μεταβολή της ποσότητας νερού που προστίθεται στον αντιδραστήρα. Ο λόγος sCOD/tCOD στην περίπτωση αυτή ήταν  $39.2 \pm 10.4\%$  το οποίο φαινομενικά φαίνεται χειρότερο από το προηγούμενο, αλλά συγκρίνοντας τα με ένα t-test, φαίνεται πως δεν μπορεί να προκύψει ασφαλές συμπέρασμα για την επίδραση της αραιώσης στην υδρόλυση/βιοαποδόμηση (p-Value = 0.14). Ως προς την δυναμικότητα του αντιδραστήρα, η συνολική κατανάλωση τροφίμων ήταν  $83.22\%$  οπότε και σε αυτή την περίπτωση δεν φαίνεται σημαντική διαφορά.

Τέλος, στο τρίτο πείραμα διπλασιάστηκε η ποσότητα του **μξ** που προστίθεται και βρέθηκε πως ο λόγος sCOD/tCOD ήταν  $32.7 \pm 10.3\%$ , μείωση η οποία είναι στατιστικά σημαντική σε σχέση με τις προηγούμενες τιμές (p-Value = 0.0002 και 0.0011 σε t-test με το 1ο και 2ο πείραμα αντίστοιχα). Οπότε, είναι ασφαλές να προκύψει το συμπέρασμα ότι η προσθήκη παραπάνω από 5 mL **μξ**/kg **ΥΤ** δεν βοηθάει την υδρόλυση. Όμως, το πείραμα αυτό είχε 100% κατανάλωση τροφίμων, το οποίο σημαίνει πως η δυναμικότητα του αντιδραστήρα βελτιώθηκε. Οπότε, παρότι έχει αρνητική επίδραση στο **COD** της εκροής το οποίο πιθανόν να επηρεάζει αρνητικά την αναερόβια χώνευση, η αυξημένη δυναμικότητα μπορεί να είναι σημαντική αν απαιτείται επεξεργασία μεγάλης ποσότητας **ΥΤ**.

Ένα πιθανό αίτιο για την μείωση του COD είναι πως προστίθενται περισσότεροι μικροοργανισμοί, οι οποίοι καταναλώνουν διαλυτό **COD** για να τραφούν. Ένα μεγάλο ποσοστό της τροφής αυτής μετατρέπεται στα οξεογενή προϊόντα, αλλά αν οι μικροοργανισμοί αυξηθούν πολύ, αρχίζει να παρατηρείται και η μείωση στο **COD**. Αντίθετα, η υδρόλυση μπορεί να γίνεται κορεσμένη σε ένζυμα (δηλαδή να μην περιορίζεται πλέον από την ποσότητα αυτών) σε ποσότητα κοντά στα 5 mL **μξ**/kg **ΥΤ**. Αυτό δείχνει μία ένδειξη πως παρότι στα εργαστηριακά πειράματα φάνηκε πιο αποτελεσματική η ποσότητα 10 mL **μξ**/kg **ΥΤ** λόγω της βέλτιστης οξεογένεσης, αυτό μπορεί να μην συνάδει με το βέλτιστο της υδρόλυσης. Συνολικά, φαίνεται πως η καλύτερη υδρόλυση γίνεται στην ποσότητα 5 mL **μξ**/kg **ΥΤ**, αλλά η καλύτερη ζύμωση στα 10 mL **μξ**/kg **ΥΤ**, όπου ο αντιδραστήρας μπορεί να έχει και μεγαλύτερη δυναμικότητα.

## 9.5 Αναερόβια Χώνευση

Από τα πειράματα αναερόβιας χώνευσης, είναι εμφανές πως τα υδρολύματα τα οποία παρασκευάστηκαν με προσθήκη 1 ή 2 mL **μξ** είχαν την καλύτερη απόδοση. Μία σημαντική παρατήρηση ήταν ότι τα αποτελέσματα των 3 κύκλων που έγιναν με τα εργαστηριακά υδρολύματα ήταν σε πλήρη αντιστοιχία.

Γενικά, τα πειράματα με υδρόλυμα με 2 mL **μξ** είχαν τον χαμηλότερο χρόνο υστέρησης από κάθε πείραμα, ο οποίος σε κάποιες περιπτώσεις ήταν και μηδενικός, καθώς και την μεγαλύτερη **SMA**. Αυτό δείχνει πως τα υδρολύματα αυτά είχαν την καλύτερη οξεογενετική ζύμωση και μπορούσε να ξεκινήσει ταχύτατα η μεθανογένεση, κάτι το οποίο έρχεται σε συμφωνία με τα αποτελέσματα των πειραμάτων υδρόλυσης.

Όμως, παρότι ισχύει αυτό, το υδρόλυμα με 1 mL **μξ**, παράγει σε κάθε περίπτωση περισσότερο μεθάνιο αν οι χωνεύσεις λειτουργήσουν μέχρι την στιγμή που ο ρυθμός γίνεται σχεδόν 0. Και αυτό έρχεται σε συμφωνία με τα παραπάνω αποτελέσματα, καθώς είχε παρατηρηθεί καλύτερη υδρόλυση (περισσότερο **sCOD**) στα πειράματα αυτά. Οπότε, αν δοθεί ο χρόνος που χρειάζεται για να ξεκινήσει η μεθανογένεση στα πειράματα αυτά, θα είναι πιο αποτελεσματικά.

Αξιοσημείωτη είναι και η πάρα πολύ χαμηλή παραγωγή μεθανίου από το ανεπεξέργαστο **ΥΤ**, η οποία είναι περίπου 4-5 φορές χαμηλότερη από αυτή του υδρολύματος στο οποίο προστέθηκε 1 mL **μξ**. Ως συμπέρασμα, διαπιστώθηκε ότι το ανεπεξέργαστο **ΥΤ** δεν είναι ένα καλό υπόστρωμα για την παραγωγή μεθανίου, καθώς η παραγωγή είναι ασταθείς και το συνολικό μεθάνιο λίγο. Συγκεκριμένα, παρατηρήθηκε υπερβολική οξίνιση του αντιδραστήρα σε έναν από τους κύκλους, στον οποίο χρησιμοποιήθηκε αρκετά αλκαλική λάσπη **7.2**.

Τέλος, έγιναν και οι δοκιμές με τα πιλοτικά υδρολύματα, οι οποίες έδειξαν ότι τα αποτελέσ-

ματα που προέκυψαν στην πιλοτική κλίμακα είναι σε συμφωνία με τα εργαστηριακά, καθώς και σε αυτά το υδρόλυμα το οποίο είχε τροφοδοσία 10 mL  $\mu\text{ξ}/\text{kg}$  ΥΤ, αναλογία η οποία αντιστοιχεί στα 2 mL της εργαστηριακής κλίμακας, ήταν πιο γρήγορο στην αρχή αλλά εν τέλει παρήγαγε λιγότερο μεθάνιο από το υδρόλυμα με 5 mL  $\mu\text{ξ}/\text{kg}$  ΥΤ, το οποίο είναι αντίστοιχο του 1 mL της εργαστηριακής κλίμακας.

Για την σύγκριση των αποτελεσμάτων με την βιβλιογραφία, επιλέχθηκαν κάποιες δημοσιεύσεις οι οποίες ασχολούνται με αναερόβια χώνευση υπολειμμάτων τροφών και έκαναν μοντελοποίηση με το μοντέλο Gompertz, για να είναι συγκρίσιμα τα αποτελέσματα. Όμως, βρέθηκαν δημοσιεύσεις με διαφορετική προεπεξεργασία, όπως ενζυμική υδρόλυση<sup>32</sup>, αναερόβια χώνευση σε 2 στάδια<sup>76</sup>, υπέρηχοι και μικροκύματα<sup>112</sup> ή ακόμη και καμία προεπεξεργασία<sup>97,113</sup>, για να μπορέσει να εξεταστεί η επίδραση της προεπεξεργασίας στα αποτελέσματα. Μία από τις σημαντικότερες λειτουργικές συνθήκες στην αναερόβια χώνευση είναι ο λόγος υποστρώματος προς εμβόλιο (S/I). Μάλιστα, βρέθηκαν και κάποιες μελέτες που σύγκριναν διαφορετικά επίπεδα<sup>97,100</sup>, το οποίο δείχνει την σημασία του λόγου αυτού.

Στην εργασία αυτή, εξετάστηκε η αναερόβια χώνευση σε 2 στάδια με το πρώτο στάδιο να έχει ενεργά ένζυμα για την βελτιστοποίηση της υδρόλυσης. Στο δεύτερο στάδιο χρησιμοποιήθηκαν χαμηλές αναλογίες S/I (0.06 και 0.02 gCOD/gVS), το οποίο προσφέρει κάποια πλεονεκτήματα, όπως αναφέρθηκε στο πειραματικό μέρος (Ενότητα 7.7). Ως αποτέλεσμα, η άμεση σύγκριση ήταν σχετικά δύσκολη. Όπως και αναμενόταν μετά την επιλογή των λόγων S/I αυτών, τα πειράματα που έγιναν είχαν χαμηλή συνολική παραγωγή μεθανίου και πιο αργούς ρυθμούς παραγωγής από τα περισσότερα άρθρα στη βιβλιογραφία, όμως, οι χρόνοι υστέρησης, και γενικότερα η διάρκεια των πειραματικών κύκλων ήταν μικρότερη.

Ένα από τα καλύτερα πειράματα που διεξάχθηκαν στην μελέτη αυτή ήταν το υδρόλυμα εργαστηριακής κλίμακας με προσθήκη 2 mL  $\mu\text{ξ}$ , με χρήση της λάσπης 2. Αυτό είχε παραγωγή 30 mL CH<sub>4</sub>, με ρυθμό  $3 \frac{\text{mL}}{\text{gVS}\cdot\text{day}}$  ή  $12.5 \frac{\text{mL}}{\text{day}}$  ή  $125 \frac{\text{mL}}{\text{gCOD}\cdot\text{day}}$  (είναι απαραίτητα και τα 3 καθώς κάθε δεν χρησιμοποιείται η ίδια έκφραση σε κάθε άρθρο) και μηδενικό χρόνο υστέρησης. Στην βιβλιογραφία, οι ρυθμοί παραγωγής είναι συχνά στην τάξη των 15-45  $\frac{\text{mL}}{\text{gVS}\cdot\text{day}}$ <sup>32,87,100</sup>, όμως κάποιες μελέτες, οι οποίες είχαν και κοντινότερες λειτουργικές συνθήκες σε αυτές που εξετάστηκαν στην εργασία αυτή, είχαν αντίστοιχους ρυθμούς. Για παράδειγμα, μία μελέτη που ακολούθησε αρκετά παρόμοια διαδικασία για την μέτρηση της παραγωγής μεθανίου, αλλά σε ανεπεξέργαστο ΥΤ, βρήκε έναν ρυθμό  $2.8 \frac{\text{mL}}{\text{gVS}\cdot\text{day}}$ <sup>113</sup>. Μία άλλη, η οποία εξέτασε διαφορετικούς τύπους οξεογενούς ζύμωσης (ανάλογα με το pH), βρήκε ως μέγιστο ρυθμό τα  $110 \frac{\text{mL}}{\text{gCOD}\cdot\text{day}}$  σε pH 4.7, το οποίο είναι χαμηλότερο από τον ρυθμό της προτεινόμενης επεξεργασίας. Ακόμη, σε pH 4.0, το οποίο είναι αντίστοιχο με αυτό που εξετάστηκε στη μελέτη αυτή, ο ρυθμός ήταν ακόμη χαμηλότερος, στα  $90.1 \frac{\text{mL}}{\text{gCOD}\cdot\text{day}}$ . Ακόμη, ως προς τους χρόνους υστέρησης, αυτοί κυμαίνονται από μερικές ώρες<sup>32,76</sup> έως και κάποιες μέρες<sup>87,97</sup>. Αναμένεται πως τα πειράματα με τόσο χαμηλό S/I θα έχουν χαμηλότερους χρόνους υστέρησης, αλλά ειδικά επειδή η τιμή 0 είναι πολύ χαμηλότερη από άλλες συνθήκες του ίδιου πειραματικού κύκλου, θεωρείται πως η βελτιστοποιημένες συνθήκες υδρόλυσης με την προτεινόμενη διεργασία, μπορούν να οδηγήσουν σε ένα πολύ πιο αποτελεσματικό υπόστρωμα για AX σε σχέση με άλλες αντίστοιχες διεργασίες.



## Κεφάλαιο 10

# Συμπεράσματα και Προτάσεις

Τα υπολείμματα τροφών (ΥΤ) αποτελούν ένα πολύ σοβαρό πρόβλημα της σημερινής κοινωνίας και η διαχείριση τους είναι πολύ σημαντική, λόγω του υψηλού οργανικού φορτίου που έχουν. Η διαχείριση τους με συμβατικές μεθόδους όπως η διάθεση τους σε ΧΥΤΑ δεν θεωρείται βιώσιμη καθώς δεν εκμεταλλεύεται το φορτίο αυτό, και μάλιστα οδηγεί και σε ανεξέλεγκτες εκπομπές μεθανίου. Για τον λόγο αυτόν, είναι επιτακτική η ανάγκη ανάπτυξης τεχνολογιών διαχείρισης ΥΤ, η οποίες να είναι εύκολες στην εφαρμογή και την κλιμάκωση. Στην εργασία αυτή επιλέχθηκε η **αναερόβια χώνευση (ΑΧ)**, λόγω του υψηλού **TRL** της και της παραγωγής ενός πολύ χρησιμού ενεργειακού φορέα, του μεθανίου, το οποίο παράγεται ελεγχόμενα και μπορεί να αποθηκευτεί. Μέσω μίας βιβλιογραφικής ανασκόπησης, βρέθηκαν τα προβλήματα της διεργασίας αυτής, όπως η μειωμένη απόδοση υδρόλυσης κατά την χώνευση και η αστάθεια της όταν λειτουργεί σε μεγάλο ρυθμό φόρτισης. Η διεξαγωγή της **ΑΧ** σε 2 στάδια λύνει τα προβλήματα αυτά.

Επιλέχθηκε η χρήση ενός εμπορικού σκευάσματος ενζύμων και μικροοργανισμών (μιξ) χαμηλής τιμής (PROGEN L 100) για το πρώτο στάδιο, καθώς επιτρέπει την αποτελεσματική ενζυμική υδρόλυση του υποστρώματος, σε ένα χαμηλό σχετικά κόστος, ενώ ταυτόχρονα μπορεί να γίνει και η οξεογενή ζύμωση. Η διεργασία αυτή βελτιστοποιήθηκε σε εργαστηριακή κλίμακα με αντιδραστήρες 1 L, ενώ οι καλύτερες συνθήκες εξετάστηκαν και σε πιλοτικό αντιδραστήρα όγκου 300 L για να εξεταστεί η εφικτότητα της κλιμάκωσης της διεργασίας αυτής. Διαπιστώθηκε πως η βέλτιστη διάρκεια των πειράματων ήταν 72 ώρες, ενώ η διεργασία ήταν πιο αποτελεσματική στους 40 °C, καθώς στους 35 °C παραγόταν πολύ αιθανόλη εις βάρος του οξικού οξέος, το οποίο είναι το θεωρητικά ιδανικό υπόστρωμα για την διεργασία. Ως προς την ποσότητα του μιξ που προστέθηκε σε κάθε πείραμα, βρέθηκε πως η προσθήκη 10 mL μιξ/kg ΥΤ είχε την καλύτερη απόδοση παραγωγής οξεογενών προϊόντων όπως το οξικό και το γαλακτικό οξύ μετά από μία ανάλυση ευαισθησίας και την υψηλότερη δυναμικότητα επεξεργασίας ΥΤ στην πιλοτική κλίμακα. Όμως, αν προστεθούν μόνο 5 mL μιξ/kg ΥΤ, η υδρόλυση/βιοαποδόμηση είναι πιο αποτελεσματική. Συγκεκριμένα, βρέθηκε πως ο λόγος sCOD/tCOD ήταν  $46.08 \pm 12.17$ , ενώ στην περίπτωση των 10 mL μιξ/kg ΥΤ ήταν  $32.72 \pm 10.30$  τιμή η οποία είναι χαμηλότερη με στατιστική βεβαιότητα (p-Value = 0.0002). Αυτό συμβαίνει επειδή στην περίπτωση των 10 mL/kg ΥΤ, υπάρχουν περισσότεροι μικροοργανισμοί και καταναλώνεται κάποιο από το παραγόμενο COD, ενώ η ποσότητα ενζύμων που απαιτείται για την αποτελεσματική υδρόλυση/βιοαποδόμηση μπορεί να επιτευχθεί ακόμη και στα 5 mL μιξ/kg ΥΤ.

Το δεύτερο στάδιο της **ΑΧ**, το οποίο περιέχει την μεθανογένεση έγινε μόνο σε εργαστηριακή κλίμακα σε αντιδραστήρες 0.5 L. Τα συμπεράσματα της υδρόλυσης/βιοαποδόμησης επαληθεύτηκαν κατά το στάδιο αυτό, καθώς τα υδρόλυματα με 5 mL μιξ/kg ΥΤ είχαν την μεγαλύτερη παραγωγή μεθανίου, όμως αυτά με 10 mL μιξ/kg ΥΤ είχαν υψηλότερους ρυθμούς και μικρότερο χρόνο καθυστέρησης, επειδή είχαν πιο αποτελεσματική ζύμωση, και το υπόστρωμα ήταν πιο εύκολο στην μεθανογένεση. Τα αποτελέσματα αυτά επαληθεύτηκαν με λάσπη



από 3 διαφορετικές πηγές και χρησιμοποιώντας υδρολύματα από πειράματα εργαστηριακής αλλά και πιλοτικής κλίμακας. Ακόμη, η παραγωγή αυτή συγκρίθηκε με αυτήν των ανεπεξέργαστων **ΥΤ**, όπου παρατηρήθηκε αστάθεια της διεργασίας και οξίνιση σε κάποιες περιπτώσεις, αλλά και ακόμη όταν δεν έγινε αυτό, η παραγωγή ήταν περίπου 4-5 φορές μικρότερη από την μέγιστη παραγωγή μεθανίου μετά το στάδιο υδρόλυσης που χρησιμοποιήθηκε.

Έτσι, διαπιστώθηκε πως η διεργασία υδρόλυσης/βιοαποδόμησης με το εμπορικό σκεύασμα PROGEN L 100 είναι μία πολύ αποτελεσματική διεργασία για την βελτίωση της απόδοσης και της σταθερότητας της **ΑΧ** σε εργαστηριακή αλλά και σε πιλοτική κλίμακα, ενώ είναι μία προεπεξεργασία χαμηλού κόστους. Για την δοσολογία του σκευάσματος προτείνονται 2 επιλογές: Η προσθήκη 10 mL **μιξ/kg ΥΤ** οδηγεί σε υψηλή δυναμικότητα επεξεργασίας **ΥΤ** και παραγωγή μίας εκροής η οποία παράγει μεθάνιο ταχύτατα. Όμως, η προσθήκη 5 mL **μιξ/kg ΥΤ** οδηγεί σε μία εκροή υδρόλυσης πιο πλούσια σε **COD**, η οποία παράγει περισσότερο μεθάνιο, σε αργότερο ρυθμό. Οπότε, ανάλογα με τις ανάγκες κάθε συστήματος προτείνετε μία από τις δοσολογίες αυτές.

Η παρούσα μελέτη θα μπορούσε να αποτελέσει αφορμή για περαιτέρω έρευνα σε μελλοντικές εργασίες πάνω στο θέμα αυτό. Ένα από τα σημαντικότερα αντικείμενα προς μελέτη είναι η επίδραση του pH στην διεργασία υδρόλυσης/βιοαποδόμησης. Με βάση την βιβλιογραφία, το pH είναι από τους σημαντικότερους παράγοντες που επηρεάζουν την διεργασία και η εύρεση μίας βέλτιστης τιμής αυτού μπορεί να συνεισφέρει σημαντικά στην απόδοση της. Στην παρούσα μελέτη δεν εξετάστηκε η επίδραση αυτή, αλλά η επίδραση της θερμοκρασίας, η οποία είναι η άλλη πάρα πολύ σημαντική παράμετρος της διεργασίας. Ακόμη, λόγω της σημασίας της θερμοκρασίας, θα ήταν ενδιαφέρουσα η εξέταση ψυχρόφιλων ή θερμοφίλων θερμοκρασιών πέρα από την μεσοφιλή περιοχή που εξετάστηκε στην εργασία αυτή (παρόλο που αναμένεται πως η μεσόφιλη περιοχή είναι ιδανική). Ως προς άλλες λειτουργικές συνθήκες της υδρόλυσης, θα είχε αρκετό ενδιαφέρον η μελέτη της διεργασίας σε πιο ελεγχόμενες συνθήκες αερισμού ή σε πλήρως αναερόβιες συνθήκες για να παρατηρηθεί αν όντως ο μικροαερισμός που επιβλήθηκε βοήθησε την διεργασία και αν υπάρχει περιθώριο για περαιτέρω βελτίωση από αυτό. Ως προς το δεύτερο στάδιο της διεργασίας, υπάρχει αρκετό ενδιαφέρον στο να γίνει μία αναλυτική μελέτη της αναερόβιας χώνευσης των υδρολυμάτων αυτών σε πιλοτική μονάδα συνεχούς λειτουργίας.

Τέλος, ένα αντικείμενο αρκετού ερευνητικού ενδιαφέροντος γύρω από την διεργασία αυτή είναι η χρήση του παραγόμενου υδρολύματος, το οποίο είναι πλούσιο σε **volatile fatty acids - πτητικά λιπαρά οξέα (VFAs)** ως πλατφόρμα για παραγωγή βιο-προϊόντων στη λογική ενός βιοδιυλιστηρίου. Η ενέργεια είναι ένα πολύ σημαντικό ζήτημα και η μετάβαση σε πιο πράσινες πηγές ενέργειας όπως το βιοαέριο είναι αρκετά σημαντική. Όμως, ακόμη μεγαλύτερο πρόβλημα στην πράσινη μετάβαση αποτελούν τα προϊόντα τα οποία παράγονται από το πετρέλαιο. Το υδρόλυμα αυτό αποτελεί ένα φθινό υπόστρωμα, το οποίο έχει παραχθεί με πράσινο τρόπο από ένα απόβλητο. Περιέχει χρήσιμες ενώσεις (οξικό οξύ, προπιονικό οξύ, γαλακτικό οξύ και αιθανόλη, ενώ με αλλαγή των λειτουργικών συνθηκών θεωρείται πως θα μπορέσουν να παραχθούν και άλλες) οι οποίες μπορούν να ανακτηθούν ως έχουν, καθώς όλα τα προϊόντα αυτά παράγονται συμβατικά από το πετρέλαιο και έχουν μία σημαντική αγορά είτε για άμεση χρήση ή ως χημικά ενδιάμεσα για την παραγωγή άλλων ενώσεων. Εναλλακτικά, μπορούν να χρησιμοποιηθούν χωρίς διαχωρισμό για παραγωγή προϊόντων όπως τα **λιπαρά οξέα μέτριας ανθρακικής αλυσίδας - medium chain fatty acids (MCFAs)**, για παραγωγή βιοπλαστικών όπως οι **polyhydroxyalkanoates - πολυ-υδρόξυαλκανοϊκοί εστέρες (PHAs)**, ή σε διατάξεις όπως τα μικροβιακά ηλεκτρολυτικά κελιά (MEC) κάτι που θα είχε ιδιαίτερο ενδιαφέρον για την αντικατάσταση των πετρελαϊκών πρώτων υλών.

## Βιβλιογραφία

- (1) Ishangulyyev, R.; Kim, S.; Lee, S. H. Understanding Food Loss and Waste—Why Are We Losing and Wasting Food? *Foods* **2019**, *8* (8), 297. <https://doi.org/10.3390/foods8080297>.
- (2) Taheri, M. E.; Salimi, E.; Saragas, K.; Novakovic, J.; Barampouti, E. M.; Mai, S.; Malamis, D.; Moustakas, K.; Loizidou, M. Effect of Pretreatment Techniques on Enzymatic Hydrolysis of Food Waste. *Biomass conversion and biorefinery* **2021**, *11* (2), 219–226. <https://doi.org/10.1007/s13399-020-00729-7>.
- (3) Statista - The Statistics Portal. <https://www.statista.com/> November 2023.
- (4) Pardo, R.; Taboada-Ruiz, L.; Fuente, E.; Ruiz, B.; Díaz-Somoano, M.; Calvo, L. F.; Paniagua, S. Exploring the Potential of Conventional and Flash Pyrolysis Methods for the Valorisation of Grape Seed and Chestnut Shell Biomass from Agri-Food Industry Waste. *Biomass and bioenergy* **2023**, *177*, 106942. <https://doi.org/10.1016/j.biombioe.2023.106942>.
- (5) Usmani, Z.; Sharma, M.; Awasthi, A. K.; Sharma, G. D.; Cysneiros, D.; Nayak, S. C.; Thakur, V. K.; Naidu, R.; Pandey, A.; Gupta, V. K. Minimizing Hazardous Impact of Food Waste in a Circular Economy – Advances in Resource Recovery through Green Strategies. *Journal of hazardous materials* **2021**, *416*, 126154. <https://doi.org/10.1016/j.jhazmat.2021.126154>.
- (6) Xu, S.; Zhu, S.; Li, C.; Bu, J.; Wei Tiong, Y.; Sharma, P.; Kong, W.; Shao, C.; Xie, H.; Wah Tong, Y. Succession of Biochar in Integrated Pyrolysis, Anaerobic Digestion, and Solid–State Fermentation towards Closed Loop Valorization of Food Waste. *Fuel* **2024**, *369*, 131719. <https://doi.org/10.1016/j.fuel.2024.131719>.
- (7) Infurna, G.; Caruso, G.; Dintcheva, N. T. Sustainable Materials Containing Biochar Particles: A Review. *Polymers* **2023**, *15* (2), 343. <https://doi.org/10.3390/polym15020343>.
- (8) Murugesan, P.; Raja, V.; Dutta, S.; Moses, J. A.; Anandharamakrishnan, C. Food Waste Valorisation via Gasification – A Review on Emerging Concepts, Prospects and Challenges. *Science of the total environment* **2022**, *851*, 157955. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2022.157955>.
- (9) Udaeta, M.; Burani, G.; Arzabe Maure, J. O.; Oliva, C. Economics of Secondary Energy from GTL Regarding Natural Gas Reserves of Bolivia. *Energy policy* **2007**, *35*, 4095–4106. <https://doi.org/10.1016/j.enpol.2007.02.014>.
- (10) Cerda, A.; Artola, A.; Font, X.; Barrena, R.; Gea, T.; Sánchez, A. Composting of Food Wastes: Status and Challenges. *Bioresour. Technol.* **2018**, *248*, 57–67. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2017.06.133>.
- (11) Ma, C.; Liu, J.; Ye, M.; Zou, L.; Qian, G.; Li, Y.-Y. Towards Utmost Bioenergy Conversion Efficiency of Food Waste: Pretreatment, Co-Digestion, and Reactor Type. *Renewable and sustainable energy reviews* **2018**, *90*, 700–709. <https://doi.org/10.1016/j.rser.2018.03.110>.
- (12) Xu, F.; Li, Y.; Ge, X.; Yang, L.; Li, Y. Anaerobic Digestion of Food Waste – Challenges and Opportunities. *Bioresour. Technol.* **2018**, *247*, 1047–1058. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2017.09.020>.
- (13) Anwar Saeed, M.; Ma, H.; Yue, S.; Wang, Q.; Tu, M. Concise Review on Ethanol Production from Food Waste: Development and Sustainability. *Environmental science and pollution research* **2018**, *25* (29), 28851–28863. <https://doi.org/10.1007/s11356-018-2972-4>.
- (14) Roukas, T.; Kotzekidou, P. From Food Industry Wastes to Second Generation Bioethanol: A Review. *Reviews in environmental science and bio/technology* **2022**, *21* (1), 299–329. <https://doi.org/10.1007/s11157-021-09606-9>.
- (15) Yasin, N.; Mumtaz, T.; Hassan, M.; Abd Rahman, N. Food Waste and Food Processing Waste for Biohydrogen Production: A Review. *Journal of environmental management* **2013**, *130*, 375–385. <https://doi.org/10.1016/j.jenvman.2013.09.009>.
- (16) Mohanakrishna, G.; Sneha, N. P.; Rafi, S. M.; Sarkar, O. Dark Fermentative

Hydrogen Production: Potential of Food Waste as Future Energy Needs. *Science of the total environment* **2023**, 888, 163801. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2023.163801>.

(17) Rajesh Banu, J.; Godvin Sharmila, V. Review on Food Waste Valorisation for Bioplastic Production towards a Circular Economy: Sustainable Approaches and Biodegradability Assessment. *Sustainable energy & fuels* **2023**, 7 (14), 3165–3184. <https://doi.org/10.1039/D3SE00500C>.

(18) Pleissner, D.; Demichelis, F.; Mariano, S.; Fiore, S.; Navarro Gutiérrez, I.; Schneider, R.; Venus, J. Direct Production of Lactic Acid Based on Simultaneous Saccharification and Fermentation of Mixed Restaurant Food Waste. *Journal of cleaner production* **2017**, 143, 615–623. <https://doi.org/10.1016/j.jclepro.2016.12.065>.

(19) Mankins, J. C. TECHNOLOGY READINESS LEVELS. **1995**.

(20) Franchetti, M. Economic and Environmental Analysis of Four Different Configurations of Anaerobic Digestion for Food Waste to Energy Conversion Using LCA for: A Food Service Provider Case Study. *Journal of environmental management* **2013**, 123, 42–48. <https://doi.org/10.1016/j.jenvman.2013.03.003>.

(21) Grippi, D.; Clemente, R.; Bernal, M. Chemical and Bioenergetic Characterization of Biofuels from Plant Biomass: Perspectives for Southern Europe. *Applied sciences* **2020**, 10, 3571. <https://doi.org/10.3390/app10103571>.

(22) Azbar, N.; Ursillo, P.; Speece, R. E. Effect of Process Configuration and Substrate Complexity on the Performance of Anaerobic Processes. *Water research* **2001**, 35 (3), 817–829. [https://doi.org/10.1016/S0043-1354\(00\)00318-3](https://doi.org/10.1016/S0043-1354(00)00318-3).

(23) Zoetemeyer, R. J.; Matthijsen, A. J. C. M.; Cohen, A.; Boelhouwer, C. Product Inhibition in the Acid Forming Stage of the Anaerobic Digestion Process. *Water research* **1982**, 16 (5), 633–639. [https://doi.org/10.1016/0043-1354\(82\)90084-7](https://doi.org/10.1016/0043-1354(82)90084-7).

(24) Pohland, F. G.; Ghosh, S. Developments in Anaerobic Stabilization of Organic Wastes - The Two-Phase Concept. *Environmental letters* **1971**. <https://doi.org/10.1080/00139307109434990>.

(25) Zhang, J.; Loh, K.-C.; Li, W.; Lim, J. W.; Dai, Y.; Tong, Y. W. Three-Stage Anaerobic Digester for Food Waste. *Applied energy* **2017**, 194, 287–295. <https://doi.org/10.1016/j.apenergy.2016.10.116>.

(26) Wu, L.; Wei, W.; Liu, X.; Wang, D.; Ni, B.-J. Potentiality of Recovering Bioresource from Food Waste through Multi-Stage Co-digestion with Enzymatic Pretreatment. *Journal of environmental management* **2022**, 319, 115777. <https://doi.org/10.1016/j.jenvman.2022.115777>.

(27) Srisowmeya, G.; Chakravarthy, M.; Nandhini Devi, G. Critical Considerations in Two-Stage Anaerobic Digestion of Food Waste – A Review. *Renewable and sustainable energy reviews* **2020**, 119, 109587. <https://doi.org/10.1016/j.rser.2019.109587>.

(28) Kavitha, S.; Banu, J. R.; Priya, A. A.; Uan, D. K.; Yeom, I. T. Liquefaction of Food Waste and Its Impacts on Anaerobic Biodegradability, Energy Ratio and Economic Feasibility. *Applied energy* **2017**, 208, 228–238. <https://doi.org/10.1016/j.apenergy.2017.10.049>.

(29) Zhang, C.; Kang, X.; Wang, F.; Tian, Y.; Liu, T.; Su, Y.; Qian, T.; Zhang, Y. Valorization of Food Waste for Cost-Effective Reducing Sugar Recovery in a Two-Stage Enzymatic Hydrolysis Platform. *Energy* **2020**, 208, 118379. <https://doi.org/10.1016/j.energy.2020.118379>.

(30) Han, W.; Yan, Y.; Shi, Y.; Gu, J.; Tang, J.; Zhao, H. Biohydrogen Production from Enzymatic Hydrolysis of Food Waste in Batch and Continuous Systems. *Scientific reports* **2016**, 6 (1), 38395. <https://doi.org/10.1038/srep38395>.

(31) Zou, L.; Wan, Y.; Zhang, S.; Luo, J.; Li, Y.-Y.; Liu, J. Valorization of Food Waste to Multiple Bio-Energies Based on Enzymatic Pretreatment: A Critical Review

and Blueprint for the Future. *Journal of cleaner production* **2020**, *277*, 124091. <https://doi.org/10.1016/j.jclepro.2020.124091>.

(32) Uçkun Kiran, E.; Trzcinski, A. P.; Liu, Y. Enhancing the Hydrolysis and Methane Production Potential of Mixed Food Waste by an Effective Enzymatic Pretreatment. *Biore-source technology* **2015**, *183*, 47–52. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2015.02.033>.

(33) dos Santos Ferreira, J.; de Oliveira, D.; Maldonado, R. R.; Kamimura, E. S.; Furigo, A. Enzymatic Pretreatment and Anaerobic Co-Digestion as a New Technology to High-Methane Production. *Applied microbiology and biotechnology* **2020**, *104* (10), 4235–4246. <https://doi.org/10.1007/s00253-020-10526-x>.

(34) Zhang, L.; Loh, K.-C.; Zhang, J.; Mao, L.; Tong, Y. W.; Wang, C.-H.; Dai, Y. Three-Stage Anaerobic Co-Digestion of Food Waste and Waste Activated Sludge: Identifying Bacterial and Methanogenic Archaeal Communities and Their Correlations with Performance Parameters. *Bioresource technology* **2019**, *285*, 121333. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2019.121333>.

(35) Cekmecelioglu, D.; Uncu, O. N. Kinetic Modeling of Enzymatic Hydrolysis of Pretreated Kitchen Wastes for Enhancing Bioethanol Production. *Waste management* **2013**, *33* (3), 735–739. <https://doi.org/10.1016/j.wasman.2012.08.003>.

(36) Cesaro, A.; Belgiorno, V. Pretreatment Methods to Improve Anaerobic Biodegradability of Organic Municipal Solid Waste Fractions. *Chemical engineering journal* **2014**, *240*, 24–37. <https://doi.org/10.1016/j.cej.2013.11.055>.

(37) Graunke, R. E.; Wilkie, A. C. Examining the Mechanisms of Short-Term Solubilization of Ground Food Waste for High-Rate Anaerobic Digestion. *International biodeterioration & biodegradation* **2014**, *86*, 327–333. <https://doi.org/10.1016/j.ibiod.2013.10.007>.

(38) Wu, Y.; Wang, C.; Liu, X.; Ma, H.; Wu, J.; Zuo, J.; Wang, K. A New Method of Two-Phase Anaerobic Digestion for Fruit and Vegetable Waste Treatment. *Bioresource technology* **2016**, *211*, 16–23. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2016.03.050>.

(39) Kim, D.-H.; Kim, M.-S. Development of a Novel Three-Stage Fermentation System Converting Food Waste to Hydrogen and Methane. *Bioresource technology* **2013**, *127*, 267–274. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2012.09.088>.

(40) Chen, X.; Zheng, X.; Pei, Y.; Chen, W.; Lin, Q.; Huang, J.; Hou, P.; Tang, J.; Han, W. Process Design and Techno-Economic Analysis of Fuel Ethanol Production from Food Waste by Enzymatic Hydrolysis and Fermentation. *Bioresource technology* **2022**, *363*, 127882. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2022.127882>.

(41) Moon, H. C.; Song, I. S. Enzymatic Hydrolysis of Food Waste and Methane Production Using UASB Bioreactor. *International journal of green energy* **2011**, *8* (3), 361–371. <https://doi.org/10.1080/15435075.2011.557845>.

(42) Jing, Y.; Li, F.; Li, Y.; Jin, P.; Zhu, S.; He, C.; Zhao, J.; Zhang, Z.; Zhang, Q. Statistical Optimization of Simultaneous Saccharification Fermentative Hydrogen Production from Corn Stover. *Bioengineered* **2020**, *11* (1), 428–438. <https://doi.org/10.1080/21655979.2020.1739405>.

(43) Chen, Q.; Wu, W.; Qi, D.; Ding, Y.; Zhao, Z. Review on Microaeration-Based Anaerobic Digestion: State of the Art, Challenges, and Perspectives. *Science of the total environment* **2020**, *710*, 136388. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2019.136388>.

(44) Suresh, T.; Sivrajasekar, N.; Balasubramani, K.; Ahamad, T.; Alam, M.; Naushad, M. Process Intensification and Comparison of Bioethanol Production from Food Industry Waste (Potatoes) by Ultrasonic Assisted Acid Hydrolysis and Enzymatic Hydrolysis: Statistical Modelling and Optimization. *Biomass and bioenergy* **2020**, *142*, 105752. <https://doi.org/10.1016/j.biombioe.2020.105752>.

(45) Fang, H.; Shi, Y.; Li, D.; Song, L.; Li, Y.-Y.; Liu, R.; Yuan, D.; Niu, Q. Synergistic



Co-Digestion of Waste Commercial Yeast and Chicken Manure: Kinetic Simulation, DOM Variation and Microbial Community Assessment. *Renewable energy* **2020**, *162*, 2272–2284. <https://doi.org/10.1016/j.renene.2020.10.038>.

(46) Moon, H. C.; Song, I. S.; Kim, J. C.; Shirai, Y.; Lee, D. H.; Kim, J. K.; Chung, S. O.; Kim, D. H.; Oh, K. K.; Cho, Y. S. Enzymatic Hydrolysis of Food Waste and Ethanol Fermentation. *International journal of energy research* **2009**, *33* (2), 164–172. <https://doi.org/10.1002/er.1432>.

(47) Zhang, C.; Ling, Z.; Huo, S. Anaerobic Fermentation of Pretreated Food Waste for Butanol Production by Co-Cultures Assisted with in-Situ Extraction. *Bioresource technology reports* **2021**, *16*, 100852. <https://doi.org/10.1016/j.biteb.2021.100852>.

(48) Li, X.; Mettu, S.; Martin, G.; Ashokkumar, M.; Lin, C. Ultrasonic Pretreatment of Food Waste to Accelerate Enzymatic Hydrolysis for Glucose Production. *Ultrasonics sonochemistry* **2019**, *53*, 77–82. <https://doi.org/10.1016/j.ultsonch.2018.12.035>.

(49) Uçkun Kiran, E.; Trzcinski, A. P.; Ng, W. J.; Liu, Y. Enzyme Production from Food Wastes Using a Biorefinery Concept. *Waste and biomass valorization* **2014**, *5* (6), 903–917. <https://doi.org/10.1007/s12649-014-9311-x>.

(50) Soares, J. L.; Cammarota, M. C.; Gutarra, M. L. E.; Volschan, I. Jr. Reduction of Scum Accumulation through the Addition of Low-Cost Enzymatic Extract in the Feeding of High-Rate Anaerobic Reactor. *Water science and technology* **2019**, *80* (1), 67–74. <https://doi.org/10.2166/wst.2019.247>.

(51) Arora, S.; Rani, R.; Ghosh, S. Bioreactors in Solid State Fermentation Technology: Design, Applications and Engineering Aspects. *Journal of biotechnology* **2018**, *269*, 16–34. <https://doi.org/10.1016/j.jbiotec.2018.01.010>.

(52) Xiao, B.; Qin, Y.; Zhang, W.; Wu, J.; Qiang, H.; Liu, J.; Li, Y.-Y. Temperature-Phased Anaerobic Digestion of Food Waste: A Comparison with Single-Stage Digestions Based on Performance and Energy Balance. *Bioresource technology* **2018**, *249*, 826–834. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2017.10.084>.

(53) Tang, Y.; Shigematsu, T.; Ikbali, Morimura, S.; Kida, K. The Effects of Micro-Aeration on the Phylogenetic Diversity of Microorganisms in a Thermophilic Anaerobic Municipal Solid-Waste Digester. *Water research* **2004**, *38* (10), 2537–2550. <https://doi.org/10.1016/j.watres.2004.03.012>.

(54) Ramos, I.; Pérez, R.; Reinoso, M.; Torio, R.; Fdz-Polanco, M. Microaerobic Digestion of Sewage Sludge on an Industrial-Pilot Scale: The Efficiency of Biogas Desulphurisation under Different Configurations and the Impact of O<sub>2</sub> on the Microbial Communities. *Bioresource technology* **2014**, *164*, 338–346. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2014.04.109>.

(55) Lim, J. W.; Chen, C. -L.; Ho, I. J. R.; Wang, J. -Y. Study of Microbial Community and Biodegradation Efficiency for Single- and Two-Phase Anaerobic Co-Digestion of Brown Water and Food Waste. *Bioresource technology* **2013**, *147*, 193–201. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2013.08.038>.

(56) Xu, S.; Selvam, A.; Wong, J. W. C. Optimization of Micro-Aeration Intensity in Acidogenic Reactor of a Two-Phase Anaerobic Digester Treating Food Waste. *Waste management* **2014**, *34* (2), 363–369. <https://doi.org/10.1016/j.wasman.2013.10.038>.

(57) Nguyen, D.; Khanal, S. A Little Breath of Fresh Air into an Anaerobic System: How Microaeration Facilitates Anaerobic Digestion Process. *Biotechnology advances* **2018**, *36* (7), 1971–1983. <https://doi.org/10.1016/j.biotechadv.2018.08.007>.

(58) Canul Bacab, F.; España Gamboa, E.; Ruiz Espinoza, J. E.; Leal-Bautista, R. M.; Tapia Tussell, R.; Domínguez Maldonado, J.; Canto Canché, B.; Alzate-Gaviria, L. Two Phase Anaerobic Digestion System of Municipal Solid Waste by Utilizing Microaeration and Granular Activated Carbon. *Energies* **2020**, *13* (4), 933. <https://doi.org/10.3390/en13040933>.

- (59) Lim, J. W.; Wang, J.-Y. Enhanced Hydrolysis and Methane Yield by Applying Microaeration Pretreatment to the Anaerobic Co-Digestion of Brown Water and Food Waste. *Waste management* **2013**, *33* (4), 813–819. <https://doi.org/10.1016/j.wasman.2012.11.013>.
- (60) Lim, J. W.; Chiam, J. A.; Wang, J.-Y. Microbial Community Structure Reveals How Microaeration Improves Fermentation during Anaerobic Co-Digestion of Brown Water and Food Waste. *Bioresource technology* **2014**, *171*, 132–138. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2014.08.050>.
- (61) Qiao, W.; Li, H.; Feng, K.; Liu, J. Oriented Fermentation of Food Waste towards High-Value Products: A Review. *Energies* **2020**, *13*, 5638. <https://doi.org/10.3390/en13215638>.
- (62) Feng, K.; Li, H.; Zheng, C. Shifting Product Spectrum by pH Adjustment during Long-Term Continuous Anaerobic Fermentation of Food Waste. *Bioresource technology* **2018**, *270*, 180–188. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2018.09.035>.
- (63) Jiang, J.; Zhang, Y.; Li, K.; Wang, Q.; Gong, C.; Li, M. Volatile Fatty Acids Production from Food Waste: Effects of pH, Temperature, and Organic Loading Rate. *Bioresource technology* **2013**, *143*, 525–530. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2013.06.025>.
- (64) Temudo, M. F.; Kleerebezem, R.; van Loosdrecht, M. Influence of the pH on (Open) Mixed Culture Fermentation of Glucose: A Chemostat Study. *Biotechnology and bioengineering* **2007**, *98* (1), 69–79. <https://doi.org/10.1002/bit.21412>.
- (65) Sekoai, P. T.; Yoro, K. O.; Bodunrin, M. O.; Ayeni, A. O.; Daramola, M. O. Integrated System Approach to Dark Fermentative Biohydrogen Production for Enhanced Yield, Energy Efficiency and Substrate Recovery. *Reviews in environmental science and bio/technology* **2018**, *17* (3), 501–529. <https://doi.org/10.1007/s11157-018-9474-1>.
- (66) Ryan, D. G.; Murphy, M. P.; Frezza, C.; Prag, H. A.; Chouchani, E. T.; O'Neill, L. A.; Mills, E. L. Coupling Krebs Cycle Metabolites to Signalling in Immunity and Cancer. *Nature metabolism* **2019**, *1* (1), 16–33. <https://doi.org/10.1038/s42255-018-0014-7>.
- (67) Wang, L.; Hao, J.; Wang, C.; Li, Y.; Yang, Q. Carbohydrate-to-Protein Ratio Regulates Hydrolysis and Acidogenesis Processes during Volatile Fatty Acids Production. *Bioresource technology* **2022**, *355*, 127266. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2022.127266>.
- (68) Ye, M.; Liu, J.; Ma, C.; Li, Y.-Y.; Zou, L.; Qian, G.; Xu, Z. P. Improving the Stability and Efficiency of Anaerobic Digestion of Food Waste Using Additives: A Critical Review. *Journal of cleaner production* **2018**, *192*, 316–326. <https://doi.org/10.1016/j.jclepro.2018.04.244>.
- (69) Oh, S. T.; Martin, A. D. Long Chain Fatty Acids Degradation in Anaerobic Digester: Thermodynamic Equilibrium Consideration. *Process biochemistry* **2010**, *45* (3), 335–345. <https://doi.org/10.1016/j.procbio.2009.10.006>.
- (70) Zhou, M.; Yan, B.; Wong, J. W. C.; Zhang, Y. Enhanced Volatile Fatty Acids Production from Anaerobic Fermentation of Food Waste: A Mini-Review Focusing on Acidogenic Metabolic Pathways. *Bioresource technology* **2018**, *248*, 68–78. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2017.06.121>.
- (71) Wu, Y.; Ma, H.; Zheng, M.; Wang, K. Lactic Acid Production from Acidogenic Fermentation of Fruit and Vegetable Wastes. *Bioresource technology* **2015**, *191*, 53–58. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2015.04.100>.
- (72) Mu, L.; Wang, Y.; Xu, F.; Li, J.; Tao, J.; Sun, Y.; Song, Y.; Duan, Z.; Li, S.; Chen, G. Emerging Strategies for Enhancing Propionate Conversion in Anaerobic Digestion: A Review. *Molecules* **2023**, *28* (9), 3883. <https://doi.org/10.3390/molecules28093883>.
- (73) Wang, Y.; Chen, X.; Spengler, K.; Terberger, K.; Boehm, M.; Appel, J.; Barske, T.; Timm, S.; Battchikova, N.; Hagemann, M.; Gutekunst, K. Pyruvate:Ferredoxin Oxi-



doreductase and Low Abundant Ferredoxins Support Aerobic Photomixotrophic Growth in Cyanobacteria. *Elife* **2022**, *11*, e71339. <https://doi.org/10.7554/eLife.71339>.

(74) Dai, K.; Wen, J.-L.; Zhang, F.; Zeng, R. Valuable Biochemical Production in Mixed Culture Fermentation: Fundamentals and Process Coupling. *Applied microbiology and biotechnology* **2017**, *101*. <https://doi.org/10.1007/s00253-017-8441-z>.

(75) Wu, Y.; Wang, C.; Zheng, M.; Zuo, J.; Wu, J.; Wang, K.; Yang, B. Effect of pH on Ethanol-Type Acidogenic Fermentation of Fruit and Vegetable Waste. *Waste management* **2017**, *60*, 158–163. <https://doi.org/10.1016/j.wasman.2016.09.033>.

(76) Feng, K.; Li, H.; Deng, Z.; Wang, Q.; Zhang, Y.; Zheng, C. Effect of Pre-Fermentation Types on the Potential of Methane Production and Energy Recovery from Food Waste. *Renewable energy* **2020**, *146*, 1588–1595. <https://doi.org/10.1016/j.renene.2019.07.127>.

(77) Chen, X.; Yuan, H.; Zou, D.; Liu, Y.; Zhu, B.; Chufo, A.; Jaffar, M.; Li, X. Improving Biomethane Yield by Controlling Fermentation Type of Acidogenic Phase in Two-Phase Anaerobic Co-Digestion of Food Waste and Rice Straw. *Chemical engineering journal* **2015**, *273*, 254–260. <https://doi.org/10.1016/j.cej.2015.03.067>.

(78) Li, L.; He, Q.; Ma, Y.; Wang, X.; Peng, X. Dynamics of Microbial Community in a Mesophilic Anaerobic Digester Treating Food Waste: Relationship between Community Structure and Process Stability. *Bioresource technology* **2015**, *189*, 113–120. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2015.04.015>.

(79) Pipyn, P.; Verstraete, W. Lactate and Ethanol as Intermediates in Two-Phase Anaerobic Digestion. *Biotechnology and bioengineering* **1981**, *23* (5), 1145–1154. <https://doi.org/10.1002/bit.260230521>.

(80) Supaphol, S.; Jenkins, S. N.; Intomo, P.; Waite, I. S.; O'Donnell, A. G. Microbial Community Dynamics in Mesophilic Anaerobic Co-Digestion of Mixed Waste. *Bioresource technology* **2011**, *102* (5), 4021–4027. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2010.11.124>.

(81) Kohn, R.; Boston, R. The Role of Thermodynamics in Controlling Rumen Metabolism. **2000**.

(82) Patón, M.; Hernández, H.; Rodríguez, J. Comprehensive Bioenergetic Evaluation of Microbial Pathway Variants in Syntrophic Propionate Oxidation. *Msystems* **2020**, *5* (6). <https://doi.org/10.1128/mSystems.00814-20>.

(83) Wang, Y.; Zhang, Y.; Wang, J.; Meng, L. Effects of Volatile Fatty Acid Concentrations on Methane Yield and Methanogenic Bacteria. *Biomass and bioenergy* **2009**, *33* (5), 848–853. <https://doi.org/10.1016/j.biombioe.2009.01.007>.

(84) Cheng, J.; Hua, J.; Kang, T.; Meng, B.; Yue, L.; Dong, H.; Li, H.; Zhou, J. Nanoscale Zero-Valent Iron Improved Lactic Acid Degradation to Produce Methane through Anaerobic Digestion. *Bioresource technology* **2020**, *317*, 124013. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2020.124013>.

(85) Saady, N. M. C. Homoacetogenesis during Hydrogen Production by Mixed Cultures Dark Fermentation: Unresolved Challenge. *International journal of hydrogen energy* **2013**, *38* (30), 13172–13191. <https://doi.org/10.1016/j.ijhydene.2013.07.122>.

(86) Zhu, Y.; Zhao, Z.; Zhang, Y. Using Straw as a Bio-Ethanol Source to Promote Anaerobic Digestion of Waste Activated Sludge. *Bioresource technology* **2019**, *286*, 121388. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2019.121388>.

(87) Yu, M.; Wu, C.; Wang, Q.; Sun, X.; Ren, Y.; Li, Y.-Y. Ethanol Prefermentation of Food Waste in Sequencing Batch Methane Fermentation for Improved Buffering Capacity and Microbial Community Analysis. *Bioresource technology* **2018**, *248*, 187–193. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2017.07.013>.

(88) Zhu, Y.; Jin, Z.; Yu, Q.; Zhao, Z.; Zhang, Y. Alleviating Acid Inhibition in Anaerobic Digestion of Food Waste: Coupling Ethanol-Type Fermentation with Biochar

Addition. *Environmental research* **2022**, *212*, 113355. <https://doi.org/10.1016/j.envres.2022.113355>.

(89) Zhao, Z.; Zhang, Y. Application of Ethanol-Type Fermentation in Establishment of Direct Interspecies Electron Transfer: A Practical Engineering Case Study. *Renewable energy* **2019**, *136*, 846–855. <https://doi.org/10.1016/j.renene.2019.01.055>.

(90) Rotaru, A.-E.; Shrestha, P. M.; Liu, F.; Shrestha, M.; Shrestha, D.; Embree, M.; Zengler, K.; Wardman, C.; Nevin, K. P.; Lovley, D. R. A New Model for Electron Flow during Anaerobic Digestion: Direct Interspecies Electron Transfer to Methanosaeta for the Reduction of Carbon Dioxide to Methane. *Energy & environmental science* **2013**, *7* (1), 408–415. <https://doi.org/10.1039/C3EE42189A>.

(91) Rotaru, A.-E.; Shrestha, P.; Liu, F.; Markovaite, B.; Chen, S.; Nevin, K.; Lovley, D. Direct Interspecies Electron Transfer between Geobacter Metallireducens and Methanosarcina Barkeri. *Applied and environmental microbiology* **2014**, *80* (15), 4599–4605. <https://doi.org/10.1128/AEM.00895-14>.

(92) Zhao, Z.; Zhang, Y.; Yu, Q.; Dang, Y.; Li, Y.; Quan, X. Communities Stimulated with Ethanol to Perform Direct Interspecies Electron Transfer for Syntrophic Metabolism of Propionate and Butyrate. *Water research* **2016**, *102*, 475–484. <https://doi.org/10.1016/j.watres.2016.07.005>.

(93) Zhao, Z.; Li, Y.; Quan, X.; Zhang, Y. New Application of Ethanol-Type Fermentation: Stimulating Methanogenic Communities with Ethanol to Perform Direct Interspecies Electron Transfer. *Acs sustainable chemistry & engineering* **2017**, *5* (10), 9441–9453. <https://doi.org/10.1021/acssuschemeng.7b02581>.

(94) Jiang, X.; Zhao, Z.; Zhang, Y. Towards Engineering Application: Integrating Current Strategies of Promoting Direct Interspecies Electron Transfer to Enhance Anaerobic Digestion. *Chemical engineering journal advances* **2022**, *12*. <https://doi.org/10.1016/j.cej.2022.100405>.

(95) Zhao, Z.; Zhang, Y.; Holmes, D. E.; Dang, Y.; Woodard, T. L.; Nevin, K. P.; Lovley, D. R. Potential Enhancement of Direct Interspecies Electron Transfer for Syntrophic Metabolism of Propionate and Butyrate with Biochar in up-Flow Anaerobic Sludge Blanket Reactors. *Bioresour. technology* **2016**, *209*, 148–156. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2016.03.005>.

(96) Dhar, B. R.; Nakhla, G.; Ray, M. B. Techno-Economic Evaluation of Ultrasound and Thermal Pretreatments for Enhanced Anaerobic Digestion of Municipal Waste Activated Sludge. *Waste management* **2012**, *32* (3), 542–549. <https://doi.org/10.1016/j.wasman.2011.10.007>.

(97) Hobbs, S.; Landis, A.; Rittmann, B.; Young, M.; Parameswaran, P. Enhancing Anaerobic Digestion of Food Waste through Biochemical Methane Potential Assays at Different Substrate: Inoculum Ratios. *Waste management* **2018**, *71*, 612–617. <https://doi.org/10.1016/j.wasman.2017.06.029>.

(98) Zwietering, M. H.; Jongenburger, I.; Rombouts, F. M.; van 't Riet, K. Modeling of the Bacterial Growth Curve. *Applied and environmental microbiology* **1990**, *56* (6), 1875–1881. <https://doi.org/10.1128/aem.56.6.1875-1881.1990>.

(99) Sunyoto, N. M. S.; Zhu, M.; Zhang, Z.; Zhang, D. Effect of Biochar Addition on Hydrogen and Methane Production in Two-Phase Anaerobic Digestion of Aqueous Carbohydrates Food Waste. *Bioresour. technology* **2016**, *219*, 29–36. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2016.07.089>.

(100) Khadka, A.; Parajuli, A.; Dangol, S.; Thapa, B.; Sapkota, L.; Carmona-Martínez, A.; Ghimire, A. Effect of the Substrate to Inoculum Ratios on the Kinetics of Biogas Production during the Mesophilic Anaerobic Digestion of Food Waste. *Energies* **2022**, *15* (3). <https://doi.org/10.3390/en15030834>.

(101) APHA; AWWA; WEF. *Standard Methods for the Examination of Water and*

*Wastewater*, 24th ed.; APHA, AWWA, WEF, 2005.

(102) Bezanson, J.; Edelman, A.; Karpinski, S.; Shah, V. B. Julia: A Fresh Approach to Numerical Computing. *Siam Review* **2017**, *59* (1), 65–98. <https://doi.org/10.1137/141000671>.

(103) Bouchet-Valat, M.; Kamiński, B. Dataframes.Jl: Flexible and Fast Tabular Data in Julia. *Journal of statistical software* **2023**, *107* (4), 1–32. <https://doi.org/10.18637/jss.v107.i04>.

(104) Danisch, S.; Krumbiegel, J. Makie.jl: Flexible High-Performance Data Visualization for Julia. *Journal of open source software* **2021**, *6* (65), 3349. <https://doi.org/10.21105/joss.03349>.

(105) Christ, S.; Schwabeneder, D.; Rackauckas, C.; Borregaard, M. K.; Breloff, T. Plots.Jl – a User Extendable Plotting Api for the Julia Programming Language. **2023**. <https://doi.org/https://doi.org/10.5334/jors.431>.

(106) Datseris, G.; Isensee, J.; Pech, S.; Gál, T. Drwatson: The Perfect Sidekick for Your Scientific Inquiries. *Journal of open source software* **2020**, *5* (54), 2673. <https://doi.org/10.21105/joss.02673>.

(107) Zaky, A. S.; Pensupa, N.; Andrade-Eiroa, Á.; Tucker, G. A.; Du, C. A New HPLC Method for Simultaneously Measuring Chloride, Sugars, Organic Acids and Alcohols in Food Samples. *Journal of food composition and analysis* **2017**, *56*, 25–33. <https://doi.org/10.1016/j.jfca.2016.12.010>.

(108) Besançon, M.; Papamarkou, T.; Anthoff, D.; Arslan, A.; Byrne, S.; Lin, D.; Pearson, J. Distributions.Jl: Definition and Modeling of Probability Distributions in the Juliastats Ecosystem. *Journal of statistical software* **2021**, *98* (16), 1–30. <https://doi.org/10.18637/jss.v098.i16>.

(109) Dixit, V. K.; Rackauckas, C. Globalsensitivity. Jl: Performant and Parallel Global Sensitivity Analysis with Julia. *Journal of open source software* **2022**, *7* (76), 4561.

(110) Kittisopikul, M. JuliaMath/Interpolations.Jl: V0.14.7. Zenodo June 2023. <https://doi.org/10.5281/zenodo.8066550>.

(111) Mogensen, P. K.; Riseth, A. N. Optim: A Mathematical Optimization Package for Julia. *Journal of open source software* **2018**, *3* (24), 615. <https://doi.org/10.21105/joss.00615>.

(112) Deepanraj, B.; Sivasubramanian, V.; Jayaraj, S. Effect of Substrate Pretreatment on Biogas Production through Anaerobic Digestion of Food Waste. *International journal of hydrogen energy* **2017**, *42* (42), 26522–26528. <https://doi.org/10.1016/j.ijhydene.2017.06.178>.

(113) Navarro, B. L.; Challiol, A. Z.; Bortoloti, M. A.; Kuroda, E. K.; Fernandes, F. Methane Production Potential from Anaerobic Digestion of Plant Biomass Residues and Food Waste as Substrates. *Journal of material cycles and waste management* **2022**, *24* (6), 2470–2482. <https://doi.org/10.1007/s10163-022-01496-5>.

(114) Dixit, V. K.; Rackauckas, C. Optimization.Jl: A Unified Optimization Package, 2023. <https://doi.org/10.5281/zenodo.7738525>.

(115) Revels, J.; Lubin, M.; Papamarkou, T. Forward-Mode Automatic Differentiation in Julia. *Arxiv:1607.07892 [cs.ms]* **2016**.

(116) Fairbanks, J.; Besançon, M.; Simon, S.; Hoffiman, J.; Eubank, N.; Karpinski, S. Juliagraphs/Graphs.Jl: An Optimized Graphs Package for the Julia Programming Language. 2021. <https://github.com/JuliaGraphs/Graphs.jl/>.

Μέρος ΙΙΙ  
Παραρτήματα

## Παράρτημα Α

# Υπολογιστική Ανάλυση Μεταβολικού Μονοπατιού

Στο παράρτημα αυτό θα αναφερθεί η βασική μεθοδολογία που ακολουθήθηκε για να γίνει μία υπολογιστική ανάλυση για τον προσδιορισμό του μεταβολικού μονοπατιού της οξειογενετικής ζύμωσης. Η κεντρική ιδέα της ανάλυσης αυτής ήταν πως εφόσον είναι γνωστές όλες οι οξειογενετικές αντιδράσεις από την βιβλιογραφία, γνωρίζοντας τις αρχικές και τελικές συνθήκες ενός αντιδραστήρα, μπορεί να προβλεφθεί σε τι ποσοστό έγινε η κάθε αντίδραση. Το πρόβλημα αυτό είναι ένα σχετικά περίπλοκο πρόβλημα βελτιστοποίησης. Είναι πιθανό πως ακόμη και να βρεθεί ένας συνδυασμός αντιδράσεων ο οποίος να δίνει σωστά αποτελέσματα, αυτός να μην είναι μοναδικός. Ως αποτέλεσμα, είναι πρακτικά αδύνατον να επαληθευθεί η πραγματική εγκυρότητα των αποτελεσμάτων μίας τέτοιας ανάλυσης. Όμως, αν τα αποτελέσματα συμφωνούν με την βιβλιογραφία και δεν είναι παράλογα, είναι πιθανόν να ισχύουν. Στην περίπτωση αυτή, μία τέτοια ανάλυση μπορεί να δώσει πολλές πληροφορίες για το πως μεταβάλλεται το μεταβολικό μονοπάτι της διεργασίας ανάλογα με τις συνθήκες, το οποίο μπορεί να είναι ιδιαίτερα ενδιαφέρον για την βελτιστοποίηση της.

Για τους λόγους αυτούς, παρουσιάζεται η ανάλυση αυτή στα πλαίσια της διπλωματικής εργασίας, όμως είναι σε παράρτημα και όχι στα βασικά αποτελέσματα. Μία αναλυτική επεξήγηση της διαδικασίας που ακολουθήθηκε για την ανάλυση αυτή φαίνεται στο αντίστοιχο [notebook στο Github](#) ενώ στο παράρτημα αυτό θα αναφερθεί πολύ συνοπτικά η διαδικασία και κυρίως θα αναλυθούν τα αποτελέσματα.

### A.1 Backend της ανάλυσης

Όπως αναφέρθηκε παραπάνω, η ιδέα είναι η επίλυση ενός προβλήματος βελτιστοποίησης το οποίο ψάχνει σε τι ποσοστό διεξάχθηκε η κάθε δυνατή οξειογενετική αντίδραση γνωρίζοντας τις αρχικές και τελικές συνθήκες του αντιδραστήρα. Για να γίνει αυτό, πρέπει πρώτα το λογισμικό να "ξέρει" όλες τις δυνατές αντιδράσεις.

Οπότε, το backend της ανάλυσης αυτής είναι ένα σύστημα το οποίο ορίζει όλες τις πιθανές αντιδράσεις υδρόλυσης, οξειογένεσης και οξικογένεσης οι οποίες μπορούν να διεξαχθούν στον αντιδραστήρα αυτόν. Το σύστημα αυτό δημιουργήθηκε με την λογική του functional programming. Δηλαδή, όλο το σύστημα βασίζεται σε συναρτήσεις οι οποίες έχουν μία αρχική κατάσταση ως input και μία τελική ως output, οι οποίες έχουν οριστεί ως named tuples στην Julia για να είναι αμετάβλητες. Επίσης, καμία συνάρτηση δεν έχει side effects. Ο μοναδικός σκοπός της είναι να πάρει την αρχική κατάσταση και να δώσει την τελική κατάσταση.

Οπότε, αρχικά ορίζεται η μοριακή μάζα της κάθε ένωσης που παρατηρείται στον μεταβολισμό και μετά οι αντιδράσεις. Για την δομή μίας αντίδρασης, έχει πάντα ένα (ή περισσότερα) optional argument `goal` τα οποία εκφράζουν την κατανάλωση των αντιδρώντων. Έπειτα, ορίζεται η στοιχειομετρία και με βάση αυτήν, υπολογίζονται τα `mol` που αντιδρούν. Με βάση αυτά, τους

στοιχειομετρικούς συντελεστές και τις μοριακές μάζες, προκύπτει η μεταβολή της μάζας κάθε ένωσης, που είναι και η τελική κατάσταση του αντιδραστήρα. Επίσης, κάθε αντίδραση έχει έναν έλεγχο ότι η μεταβλητή `goal` δεν έχει τιμή μεγαλύτερη από την αρχική μάζα αντιδρώντων, καθώς στην περίπτωση αυτή, δεν μπορεί να διεξαχθεί αντίδραση, άρα δεν μπορεί να τρέξει επιτυχώς η συνάρτηση.

Έχοντας ορίσει τις βασικές αντιδράσεις, έπειτα ορίστηκαν `complex` αντιδράσεις, οι οποίες αποτελούν ουσιαστικά ολόκληρα μεταβολικά μονοπάτια (πχ η παραγωγή του προπιονικού γίνεται με βάση έναν από 2 μηχανισμούς με βασικό ενδιάμεσο είτε το ηλεκτρικό ή το γαλακτικό οξύ). Έχοντας ορίσει όλες τις αντιδράσεις αυτές, έχει δημιουργηθεί ένα σύστημα γενικής χρήσης το οποίο μπορεί να κάνει αυτόματα ισοζύγια μάζας για οποιαδήποτε από αυτές τις αντιδράσεις ή ακόμη και για συνδυασμό τους. Θεωρείται πως αυτό μπορεί να είναι χρήσιμο και για άλλες σχετικές μελέτες.

Επίσης, αξίζει να αναφερθεί πως λόγω των συνθηκών μικροαερισμού που επικρατούσαν στο σύστημα, ορίστηκε και η αερόβια κατανάλωση του πυροσταφυλικού οξέος μέσω του κύκλου του Krebs με περιοριστικό αντιδραστήριο το οξυγόνο, εκφράζοντας ότι κάποια ποσότητα σακχάρων καταναλώνεται αερόβια.

## A.2 Ορισμός του μεταβολικού μονοπατιού

Έχοντας ορίσει όλες τις πιθανές αντιδράσεις που συμβαίνουν σε μία οξειογενετική ζύμωση, έπρεπε να οριστεί μία σύνθετη συνάρτηση, η λογική της οποίας θα ήταν να γίνει σε κάποιο βαθμό κάθε μία από τις πιθανές αντιδράσεις που έχουν παρατηρηθεί στα πειράματα που έγιναν, ώστε μετά ο αλγόριθμος βελτιστοποίησης να βρεί σε τι ποσοστό έγινε η κάθε αντίδραση ώστε η προβλεπόμενη συγκέντρωση να είναι αυτή που μετρήθηκε.

Οπότε, ορίστηκε μία συνάρτηση όπου συμβαίνουν οι παρακάτω αντιδράσεις σε ξεχωριστές φάσεις: 1. Υδρόλυση σακχαρόζης σε γλυκόζη και φρουκτόζη, 2. κατανάλωση της γλυκόζης είτε σε ετερογαλακτική ζύμωση ή σε γλυκόλυση, κατανάλωση της φρουκτόζης σε φρουκτόλυση, 3. αερόβια οξείδωση του πυροσταφυλικού οξέος, 4. κατανάλωση του πυροσταφυλικού οξέος για παραγωγή οξικού οξέος, γαλακτικού οξέος, αιθανόλης ή μίγματος οξικού οξέος και αιθανόλης με αναλογία 1:1, 5. αναγωγή του γαλακτικού οξέος σε προπιονικό οξύ.

Στην πράξη, όλες αυτές οι αντιδράσεις συμβαίνουν ταυτόχρονα, όμως για το `implementation` αυτού στον υπολογιστή, έπρεπε να ακολουθηθεί αυτή η σειρά για να μπορούν να γίνουν οι αντιδράσεις. Με βάση τα αποτελέσματα της διεργασίας, θεωρείται πως η αιθανόλη καταναλώνεται ως προς οξικό οξύ κατά την οξειογένεση εκτός από τις αντιδράσεις αυτές. Αν αυτή οριστεί ταυτόχρονα με τις υπόλοιπες, ο αλγόριθμος μπορεί να υποθέσει ότι δεν παράχθηκε πολύ αιθανόλη και έπειτα δεν καταναλώθηκε. Οπότε, η αντίδραση αυτή πρέπει να οριστεί σε επόμενο βήμα, για να προκύψει το σωστό αποτέλεσμα.

## A.3 Αλγόριθμος βελτιστοποίησης

Για να γίνει η βελτιστοποίηση, ορίστηκε μία συνάρτηση με 4 arguments. Το πρώτο ήταν η αρχική κατάσταση, το δεύτερο το `dataframe` των δεδομένων των συγκεντρώσεων (για την μέγιστη συγκέντρωση αιθανόλης και την τελική κατάσταση), οι παραμέτροι ως προς την βελτιστοποίηση και ο όγκος του διαλύματος (καθώς πρέπει οι υπολογισμένες συγκεντρώσεις να γίνουν μάζες για τα ισοζύγια μάζας) Με βάση τα αποτελέσματα της διεργασίας, θεωρείται πως η αιθανόλη καταναλώνεται ως προς οξικό οξύ κατά την οξειογένεση εκτός από τις αντιδράσεις αυτές. Για να οριστεί η αντίδραση αυτή Αν αυτή οριστεί ταυτόχρονα με τις υπόλοιπες, ο αλγόριθμος μπορεί να υποθέσει ότι δεν παράχθηκε πολύ αιθανόλη και έπειτα δεν καταναλώθηκε. Οπότε, η αντίδραση αυτή πρέπει να οριστεί σε επόμενο βήμα, για να προκύψει το σωστό αποτέλεσμα.



## A.4 Αλγόριθμος βελτιστοποίησης

Για να γίνει η βελτιστοποίηση, ορίστηκε μία συνάρτηση με 4 arguments. Το πρώτο ήταν η αρχική κατάσταση, το δεύτερο το dataframe των δεδομένων των συγκεντρώσεων (για την μέγιστη συγκέντρωση αιθανόλης και την τελική κατάσταση), οι παραμέτροι ως προς την βελτιστοποίηση και ο όγκος του διαλύματος (καθώς πρέπει οι υπολογισμένες συγκεντρώσεις να γίνουν μάζες για τα ισοζύγια μάζας). Οι παράμετροι που επιλέχθηκαν για την βελτιστοποίηση είναι οι εξής: Ποσοστό γλυκόζης που καταναλώθηκε στην ετερογαλακτική ζύμωση, ποσοστό πυροσταφυλικού που αντέδρασε για οξικό οξύ, γαλακτικό οξύ και αιθανόλη και τέλος η ποσότητα οξυγόνου στον αντιδραστήρα. Με βάση τα 5 αυτά, μπορούν να προσδιοριστούν πλήρως τα ισοζύγια μάζας.

Οπότε, η βελτιστοποίηση μπορεί να γίνει επιλέγοντας τυχαίες παραμέτρους αρχικά, υπολογίζοντας την διαφορά τις υπολογισμένης συγκέντρωσης με της πειραματικής και βελτιστοποιώντας με βάση αυτό. Αξίζει να σημειωθεί πως συγκρίνονται μόνο οξικό οξύ, προπιονικό οξύ και αιθανόλη καθώς με βάση τους βαθμούς ελευθερίας που έχουν οριστεί, οι άλλες ενώσεις θα είναι σίγουρα ίσες με την πειραματική τους τιμή, οπότε θα ήταν λάθος να συμπεριληφθούν στην βελτιστοποίηση.

Δύο προσθήκες που έγιναν ήταν οι εξής: 1. Υπολογίζεται η μεταβολή των προϊόντων που θα προκληθεί λόγω των οξεικογενών αντιδράσεων ξεχωριστά και προστίθεται στις υπόλοιπες αντιδράσεις, έτσι, υπάρχει ο περιορισμός ότι πρέπει η βελτιστοποίηση να βρει τις τιμές πριν την οξεικογένεση, αλλά θα συγκριθεί με τις συγκεντρώσεις μετά την οξεικογένεση. 2. Λόγω του πως έχει οριστεί το σύστημα των ισοζυγίων μάζας, αν ο αλγόριθμος βελτιστοποίησης δοκιμάσει έναν "παράνομο" συνδυασμό παραμέτρων, θα δώσει error και δεν θα μπορέσει να συγκλίνει ποτέ. Μία λύση για αυτό είναι ένα try/catch statement το οποίο λέει πως αν η συνάρτηση δώσει error, το loss είναι υψηλό, το οποίο επιτρέπει στον αλγόριθμο να αποφύγει τέτοιους συνδυασμούς και να συγκλίνει σε κάτι το οποίο μπορεί να ισχύει.

Έτσι, ορίστηκε το loss για κάθε πείραμα και με βάση αυτό μπορεί να γίνει σε κάθε περίπτωση η βελτιστοποίηση. Η βελτιστοποίηση έγινε με την βοήθεια του πακέτου Optimization.jl <sup>114</sup> το οποίο δίνει ένα πολύ καλό ενωμένο interface για περίπλοκα προβλήματα βελτιστοποίησης το οποίο επιτρέπει χρήση πολλών επιλυτών. Ο επιλύτης που επιλέχθηκε είναι ο Broyden–Fletcher–Goldfarb–Shanno (BFGS) από το πακέτο Optim.jl <sup>111</sup> ο οποίος είναι ένας από τους πιο γρήγορους αλλά ακριβής αλγόριθμους βελτιστοποίησης που βασίζεται σε υπολογισμούς βαθμίδας (gradient descent) και χρησιμοποιείται ευρέως σε τέτοιου είδους προβλήματα. Για καλύτερη απόδοση και πιο ακριβή αποτελέσματα, η βαθμίδα υπολογιζόταν με χρήση αυτόματης διαφορίσης με το πακέτο ForwardDiff.jl <sup>115</sup>. Γενικά, για περίπλοκα προβλήματα όπου οι βαθμίδες δεν είναι εύκολο να υπολογιστούν (όπως οι συναρτήσεις που χρησιμοποιούνται εδώ), είναι πολύ δύσκολο να χρησιμοποιηθεί κάποιο άλλο είδος διαφορίσης (η αναλυτική παράγωγος είναι σχεδόν να οριστεί και η αριθμητική δεν θα έχει καλή ακρίβεια). Ο αλγόριθμος δοκιμάστηκε με και χωρίς όρια και βρέθηκε πως αν υπάρχουν όρια στην βελτιστοποίηση, είναι πιο πιθανό να βρεθεί η βέλτιστη λύση, ενώ αλλιώς ο αλγόριθμος βασίζεται περισσότερο στην επιλογή καλών αρχικών συνθηκών. Όταν ο αλγόριθμος είχε σύγκλιση, το loss function είχε τιμή της τάξης του  $1e-18$  και ήταν εμφανές πως είχαν βρεθεί οι ακριβείς συγκεντρώσεις που μετρήθηκαν. Μεταβάλλοντας τις αρχικές συνθήκες βρέθηκε πως μπορούν να υπολογιστούν διαφορετικές λύσεις στο πρόβλημα (το οποίο αναμένεται σε ένα τέτοιο περίπλοκο πρόβλημα βελτιστοποίησης), αλλά όσες είχαν χαμηλό loss είχαν και πολύ μικρή διαφορά στην τιμή των παραμέτρων, οπότε θεωρήθηκε πως δεν παίζει ρόλο η διαφορά αυτή.



## A.5 Ανάλυση αποτελεσμάτων

Έχοντας τα αποτελέσματα της βελτιστοποίησης, είναι γνωστές οι 5 παραμέτροι που αναφέρθηκαν για κάθε πείραμα. Βέβαια, στην πράξη δεν είναι αυτό που φάχνουμε. Το αναμενόμενο αποτέλεσμα της ανάλυσης αυτής θα ήταν ένας πίνακας στον οποίο φαίνεται η κάθε ένωση σε τι βαθμό παράχθηκε από κάθε αντίδραση και σε τι βαθμό καταναλώθηκε από κάθε αντίδραση. Όπως αναφέρθηκε, με τις 5 αυτές μεταβλητές, αυτό μπορεί εύκολα να υπολογιστεί.

Οπότε, έγιναν οι απαιτούμενοι υπολογισμοί για να βρεθούν οι ροές παραγωγής και κατανάλωσης για κάθε ένωση (η ακριβής μεθοδολογία δεν περιγράφεται εδώ, αλλά περιγράφεται με λεπτομέρεια στο notebook που έγινε linked παραπάνω) και με αυτά, προέκυψαν πίνακες της μορφής του πίνακα A.1 και A.2 (ο πίνακας έχει χωριστεί σε δύο κομμάτια για να χωρέσει στην σελίδα).

Πίνακας A.1: Πρόβλεψη Μεταβολικού Μονοπατιού - Πίνακας 1

Comp	Init	SucHyd	Glycolysis	Heterlactic	PyrOx	Acet
Sucrose	1.0	-1.0	0.0	0.0	0.0	0.0
Glucose	0.639	0.361	-0.146	-0.854	0.0	0.0
Fructose	0.777	0.222	-0.833	0.0	0.0	0.0
Pyruvate	0.0	0.0	1.0	0.0	-0.328	-0.007
Lactate	0.357	0.0	0.0	0.529	0.0	0.0
Acetate	0.568	0.0	0.0	0.0	0.0	0.007
Propionate	0.695	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0
Ethanol	0.073	0.0	0.0	0.526	0.0	0.0

Πίνακας A.2: Πρόβλεψη Μεταβολικού Μονοπατιού - Πίνακας 2

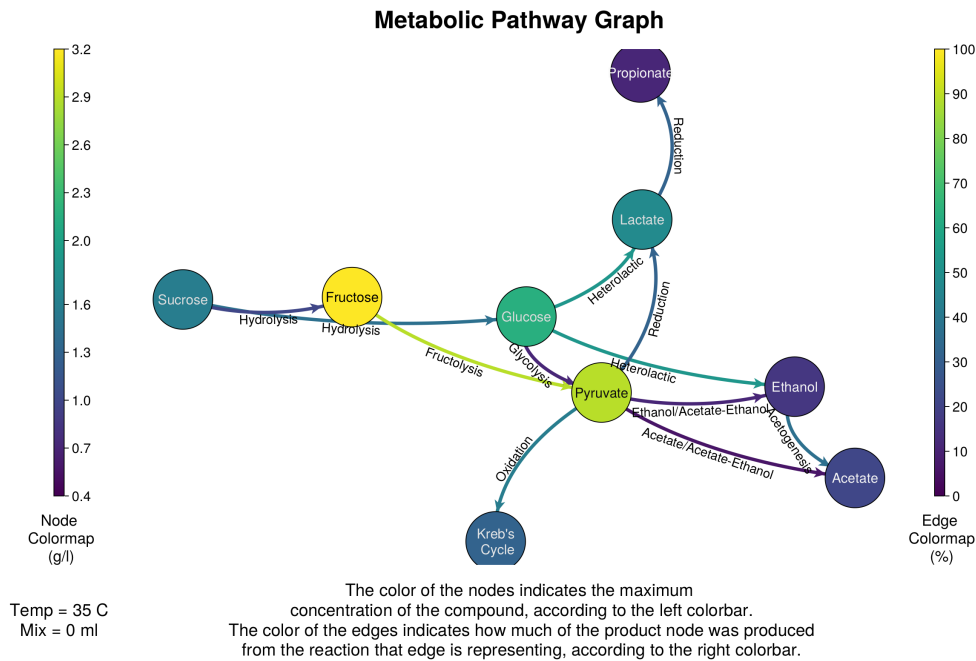
Comp	Lact	Eth	Aceteth	Prop	Acetogenesis	Final
Sucrose	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0
Glucose	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0
Fructose	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.167
Pyruvate	-0.132	-0.396	-0.137	0.0	0.0	0.0
Lactate	0.114	0.0	0.0	-0.170	0.0	0.830
Acetate	0.0	0.0	0.067	0.0	0.358	1.0
Propionate	0.0	0.0	0.0	0.305	0.0	1.0
Ethanol	0.0	0.342	0.059	0.0	-0.247	0.753

Οι πίνακες αυτοί είναι μεγάλοι και σχετικά δυσχρηστοί, παρότι περιέχουν πάρα πολύ χρήσιμη πληροφορία. Για αυτό δεν θα παρουσιαστούν όλοι εδώ, αλλά μπορούν να βρεθούν στο [Github](#). Υπάρχουν διάφορα είδη πινάκων στον φάκελο αυτόν. Για την ανάγνωση προτείνεται το `readable_flux_table`. Τα άλλα δεν έχουν labels και έχουν αποθηκευτεί για περαιτέρω χρήση στον κώδικα. Τα αρχεία csv στα οποία έχουν αποθηκευτεί είναι αρχεία text, τα οποία όμως μπορούν να ανοίξουν σε προγράμματα όπως το Excel για ανάγνωση.

Μία πιο εύχρηστη παρουσίαση των αποτελεσμάτων αυτών είναι μέσω ενός διαγράμματος μεταβολικού δικτύου, σχεδιασμένο σαν graph. Σε αυτό, οι κόμβοι θα είναι η κάθε ένωση ενώ οι ακμές θα δείχνουν τις ροές των αντιδράσεων. Τα διαγράμματα αυτά έγιναν με την βοήθεια του `Makie.jl`<sup>104</sup> και συγκεκριμένα του extension `GraphMakie.jl`, το οποίο κάνει interface με το πακέτο `Graphs.jl`<sup>116</sup> στο οποίο και ορίζονται τα `graphs`. Στο Σχήμα A.1 φαίνεται ένα τέτοιο γράφημα

Καθώς για τα πειράματα του βασικού σχεδιασμού υπάρχουν άλλα 9 τέτοια διαγράμματα, τα υπόλοιπα δεν παρατίθενται εδώ αλλά στο [Github](#).

Από τα διαγράμματα αυτά, μπορούν να προκύψουν πολλά συμπεράσματα για το πως



Σχήμα A.1: Διάγραμμα Προβλεπόμενου Μεταβολικού Δικτύου

μεταβάλλεται το μεταβολικό μονοπάτι με τις αλλαγές στις λειτουργικές συνθήκες. Αυτά παρουσιάζονται στο επόμενο υποκεφάλαιο με κάποια συγκεντρωτικά διαγράμματα που ενισχύουν τις υποθέσεις αυτές.

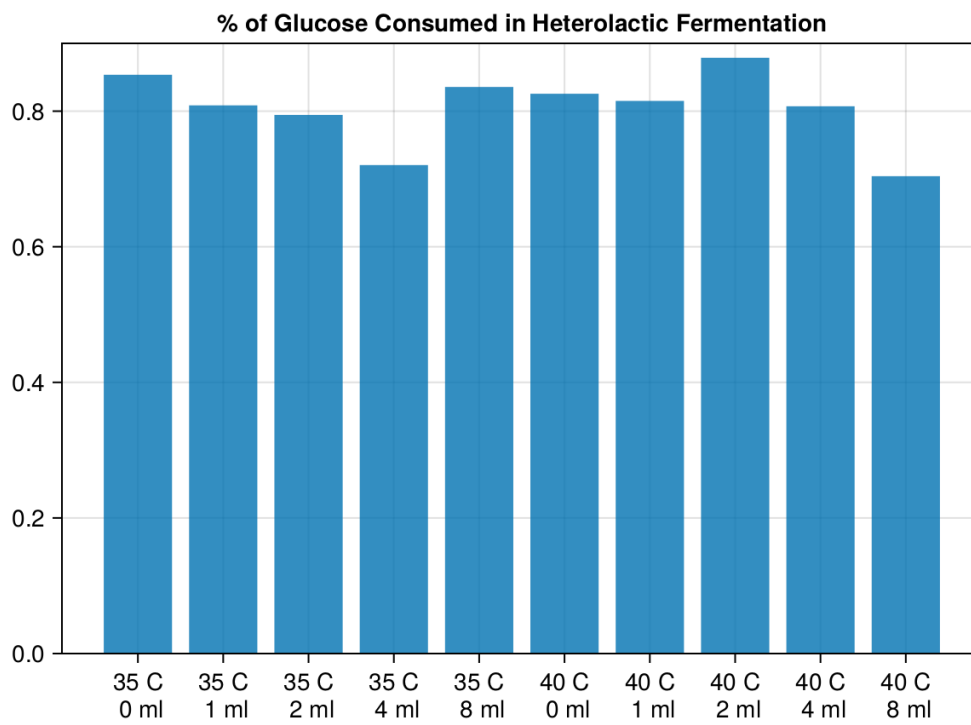
## A.6 Συμπεράσματα Ανάλυσης

Μία σημαντική παρατήρηση που έγινε είναι πως η γλυκόζη η οποία καταναλώνεται στην ετερογαλακτική ζύμωση είναι ένα μεγάλο ποσοστό της συνολικής γλυκόζης και είναι σχεδόν σταθερή με την μεταβολή των συνθηκών (συγκεκριμένα είναι  $0.8 \pm 0.05$  της συνολικής). Αυτό το συμπέρασμα φαίνεται στο Σχήμα A.2.

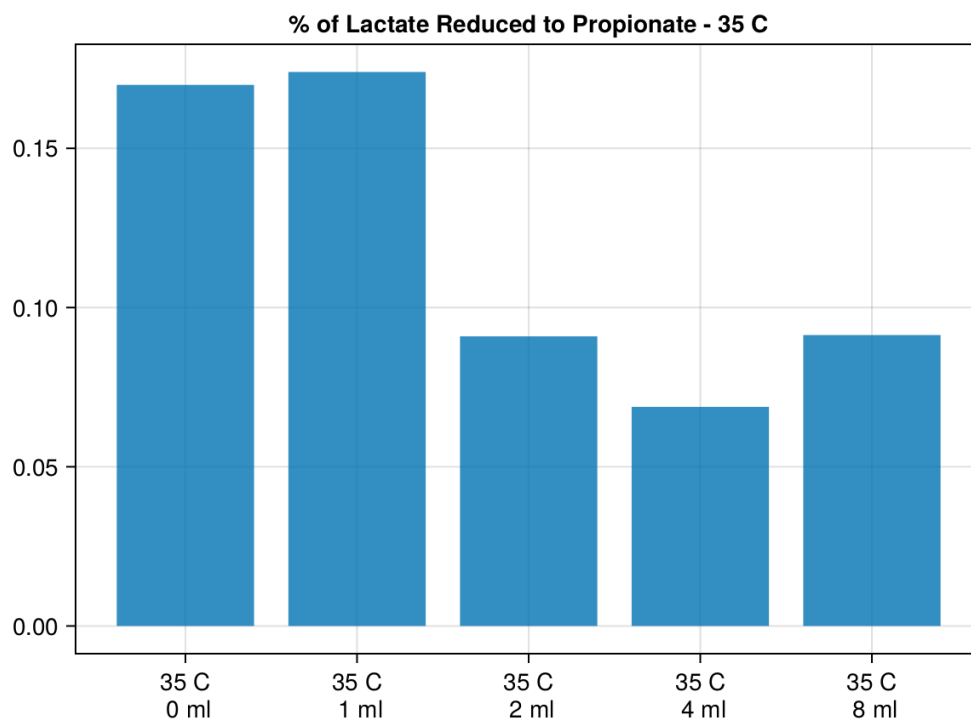
Οπότε, θεωρείται πως το μονοπάτι αυτό γίνεται από τους ιθαγενής μικροοργανισμούς (αυτούς που περιέχονται ήδη στο υπόλειμμα τροφών) και επειδή είναι ανεξάρτητο της γλυκόλυσης/φρουκτόλυσης, δεν επηρεάζεται από την προσθήκη άλλων μικροοργανισμών.

Το μεγάλο ποσοστό γλυκόζης προς αυτό το μεταβολικό μονοπάτι εξηγεί κιόλας γιατί σε κάθε αντιδραστήρα βρέθηκε αιθανόλη ακόμη και στους  $40\text{ }^{\circ}\text{C}$  όπου φάνηκε να αναστέλλεται και είναι ένας από τους λόγους που παράγεται πολύ γαλακτικό. Ακόμη, συμφωνεί με την βιβλιογραφία, η οποία λέει πως οι ιθαγενής μικροοργανισμοί των υπολειμμάτων τροφών είναι συχνά βακτήρια γαλακτικού οξέος, τα οποία μπορούν να καταλύσουν αντιδράσεις παραγωγής και κατανάλωσης του γαλακτικού οξέος.

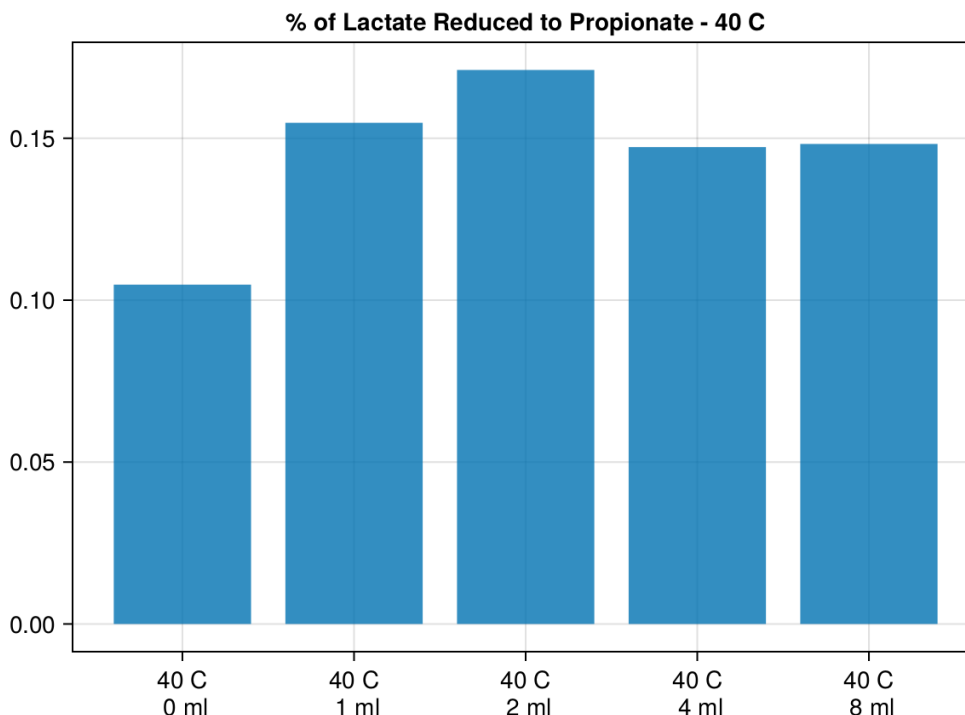
Οπότε, με βάση αυτή την βιβλιογραφία, αφού όντως οι ιθαγενής μικροοργανισμοί είναι βακτήρια γαλακτικού οξέος, αξίζει να δει κανείς τι γίνεται με την κατανάλωση του γαλακτικού προς προπιονικό οξύ. Στους  $35\text{ }^{\circ}\text{C}$ , το μονοπάτι αυτό έχει αναστολή με την προσθήκη του μιξ, το οποίο μπορεί να σημαίνει πως αυτοί οι μικροοργανισμοί δεν μπορούν να κάνουν την αναγωγή αυτή, αλλά επικρατούν οι αντιδράσεις που καταλύουν καθώς έχουν αυξηθεί, οπότε αυτή χάνεται. Αυτή η υπόθεση ενισχύεται εν μέρει από το γεγονός ότι υπάρχει πολύ μικρή μεταβολή της αντίδρασης αυτής με την προσθήκη του μιξ στους  $40\text{ }^{\circ}\text{C}$ , όμως, η αύξηση όταν προστίθεται το μιξ είναι μεγάλη, οπότε είναι πιθανόν πως υπάρχει κάποιος πιο περίπλοκος μηχανισμός πίσω από την αντίδραση αυτή. Τα αποτελέσματα αυτά παρουσιάζονται στα Σχήματα A.3 και A.4.



Σχήμα Α.2: Ποσοστό γλυκόζης στην ετερογαλακτική ζύμωση



Σχήμα Α.3: Παραγωγή Προπιονικού - 35 C

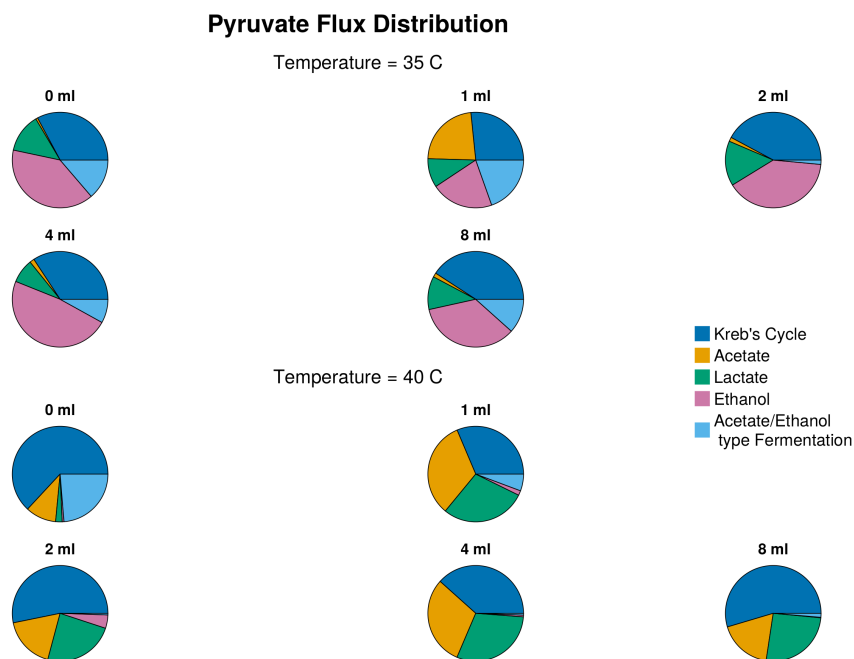


Σχήμα A.4: Παραγωγή Προπιονικού - 40 C

Οι υπόλοιπες αντιδράσεις θεωρείται πως επηρεάζονται είτε άμεσα ή έμμεσα από την προσθήκη του μιξ. Για την υδρόλυση της σακχαρόζης και την γλυκόλυση, αποτελούν δύο γρήγορες αντιδράσεις οι οποίες γίνονται είτε με ή χωρίς παρουσία του μιξ, οπότε, είναι δύσκολο να αποφανθεί αν παίζει ρόλο η προσθήκη του. Θεωρείται όμως πως μπορεί να τις επιταχύνει. Η φρουκτόλυση σίγουρα επηρεάζεται από τους προστιθέμενους μικροοργανισμούς επειδή όπως φαίνεται και στο Σχήμα 8.9, οι ιθαγενής μικροοργανισμοί δεν μπορούν να καταναλώσουν αποδοτικά την φρουκτόζη. Οι υπόλοιπες αντιδράσεις σίγουρα θα επηρεάζονται είτε άμεσα ή έμμεσα από την προσθήκη του μιξ, αν αυτό επηρεάζει μία τουλάχιστον, καθώς όλες αποτελούν αντιδράσεις μεταβολισμού του πυροσταφυλικού οξέος. Για καλύτερη σύγκρισή τους, παρατίθεται και το Σχήμα A.5 .

Από το διάγραμμα αυτό, μπορούν να αναλυθούν σε περισσότερο βάθος κάποιες ενδιαφέρουσες παρατηρήσεις που έχουν γίνει για τα πειράματα αυτά. Μία από τις βασικότερες παρατηρήσεις που είχε γίνει ήταν πως στους 35 °C αναστελλόταν η παραγωγή οξικού οξέος ενώ στους 40 °C η παραγωγή αιθανόλης. Η αναστολή της παραγωγής αιθανόλης θεωρείται πως είναι απενεργοποίηση των μικροοργανισμών λόγω της υψηλής θερμοκρασίας, ενώ για το οξικό δεν θα μπορούσε να ισχύει αυτό (εφόσον αναστέλλεται στην χαμηλή θερμοκρασία). Οπότε, είχε θεωρηθεί πως η μείωση του οξικού οφείλεται σε κάποια αλληλεπίδραση του με τα άλλα προϊόντα.

Αυτή φαίνεται ξεκάθαρα από το σχήμα αυτό. Στους 35 °C, το μεγαλύτερο ποσοστό του πυροσταφυλικού μετατρέπεται σε αιθανόλη, με μικρή ποσότητα γαλακτικού καθώς και μικρή ποσότητα μικτής παραγωγής αιθανόλης/οξικού. Αυτό δείχνει πως η προσθήκη του μιξ, ευνοεί την παραγωγή αιθανόλης έως ένα σημείο και μετά έχει ελάχιστη επίδραση (έτσι και αλλιώς είναι γνωστό πως στους 35 °C δεν επέφερε καμία βελτίωση η προσθήκη πάνω από 2 mL μιξ). Η αιθανόλη παράγεται από το Acetyl-CoA μέσω αναγωγής. Επειδή είναι πάρα πολύ ενεργοί οι μικροοργανισμοί αυτοί με την προσθήκη του μιξ, μεταβολίζουν μεγάλο ποσοστό του πυροσταφυλικού και πολύ λίγο Acetyl-CoA μετατρέπεται σε οξικό, και αυτό σε συνδυασμό με αιθανόλη. Η αιθανόλη δεν απαιτεί κάποιο συμπροϊόν κατά τον μεταβολισμό της και το οξικό



Σχήμα A.5: Μεταβολισμός του Πυροσταφυλικού Οξέος

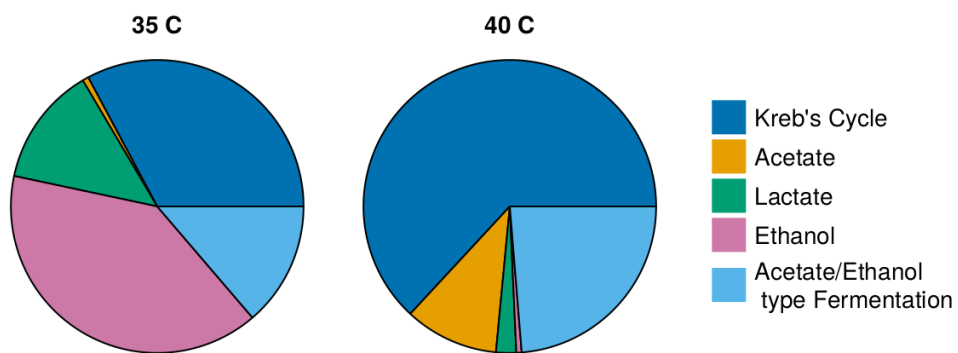
παράγεται αν τα αναγωγικά μέσα είναι λίγα λόγω της ευκολίας μετατροπής του Acetyl-CoA σε οξικό.

Όταν όμως απενεργοποιούνται οι μικροοργανισμοί αυτοί στους 40 °C, κύριο προϊόν της διεργασίας γίνεται το άλλο αναγωγικό προϊόν, το γαλακτικό οξύ. Το γαλακτικό οξύ όμως παράγεται από την άμεση αναγωγή του πυροσταφυλικού οξέος, οπότε δεν παράγει αναγωγικά μέσα κατά την παραγωγή του. Ως αποτέλεσμα, υπάρχει ένας οξειδοαναγωγικός περιορισμός στην παραγωγή του γαλακτικού οξέος και παρόλο που η προσθήκη του μιξ το ευνοεί, δεν μπορεί να φτάσει παραπάνω από περίπου 25 – 30% του πυροσταφυλικού για αυτό τον λόγο. Για να αποκατασταθεί η οξειδοαναγωγική ισορροπία από την ευνόηση αυτή του γαλακτικού, είναι αναγκαστικό να παραχθεί το βασικό οξειδωτικό προϊόν του πυροσταφυλικού, το οξικό οξύ. Οπότε, με την προσθήκη του μιξ στην θερμοκρασία αυτή, υπάρχει μία θετική επίδραση στην συγκέντρωση του οξικού οξέος.

Οπότε, φαίνεται πως τα αναγωγικά προϊόντα είναι αυτά που επηρεάζονται άμεσα με θετικό τρόπο από τους μικροοργανισμούς του μιξ, ενώ το οξικό επηρεάζεται έμμεσα επειδή στην μία περίπτωση η αιθανόλη δεν απαιτεί την συμπαραγωγή του ενώ απτην άλλη το γαλακτικό την απαιτεί.

Ένα ακόμη συμπέρασμα, το οποίο είναι αξιοσημείωτο φαίνεται αν ζουμάρουμε στους ιθαγενής μικροοργανισμούς (Σχήμα A.6). Παρόλο που θεωρητικά μπορούν να καταλύσουν και την παραγωγή οξικού και την παραγωγή αιθανόλης, στους 35 °C δεν παράγεται καθόλου οξικό από μόνο του (ενώ μπορεί να παραχθεί αν προστεθεί 1 mL μιξ) και αντίστοιχα, η αιθανόλη δεν μπορεί να παραχθεί μόνη της στους 40 °C, αλλά χωρίς την προσθήκη του μιξ, παράγεται μία ποσότητα μαζί με το οξικό. Οπότε, υπάρχει μία ένδειξη πως οι ιθαγενής μικροοργανισμοί έχουν μία τάση να παράγουν μίγμα οξικού και αιθανόλης (μονοπάτι το οποίο είναι οξειδωαναγωγικά ουδέτερο), ενώ όταν προστίθεται το μιξ, προτιμούνται τα αναγωγικά μονοπάτια, με το οξικό να παράγεται μόνο για την απαραίτητη εξισορρόπηση του οξειδωαναγωγικού δυναμικού.

### Pyruvate Flux Distribution for the indigenous microorganisms



Σχήμα A.6: Κατανάλωση πυροσταφυλικού οξέος από τους ιθαγενής μικροοργανισμούς