



ΓΕΩΠΟΝΙΚΟ ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΑΘΗΝΩΝ
ΤΜΗΜΑ ΕΠΙΣΤΗΜΗΣ ΤΡΟΦΙΜΩΝ & ΔΙΑΤΡΟΦΗΣ ΤΟΥ ΑΝΘΡΩΠΟΥ
ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΟ ΜΙΚΡΟΒΙΟΛΟΓΙΑΣ & ΒΙΟΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑΣ ΤΡΟΦΙΜΩΝ

ΠΡΟΓΡΑΜΜΑ ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΩΝ ΣΠΟΥΔΩΝ
ΕΠΙΣΤΗΜΗ ΚΑΙ ΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑ ΤΡΟΦΙΜΩΝ

Μεταπτυχιακή Διπλωματική Εργασία

Μελέτη και αριστοποίηση της διεργασίας παραγωγής βιοαερίου
από στερεά παραπροϊόντα και απόβλητα της καλλιέργειας
εδώδιμων μανιταριών

Ευάγγελος – Μάρκος Ε. Ρήγος

Επιβλέπων καθηγητής:
Παπανικολάου Σεραφείμ, Καθηγητής ΓΠΑ

ΑΘΗΝΑ
2022

ΓΕΩΠΟΝΙΚΟ ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΑΘΗΝΩΝ
ΤΜΗΜΑ ΕΠΙΣΤΗΜΗΣ ΤΡΟΦΙΜΩΝ & ΔΙΑΤΡΟΦΗΣ ΤΟΥ ΑΝΘΡΩΠΟΥ
ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΟ ΜΙΚΡΟΒΙΟΛΟΓΙΑΣ & ΒΙΟΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑΣ ΤΡΟΦΙΜΩΝ

Μεταπτυχιακή Διπλωματική Εργασία

Μελέτη και αριστοποίηση της διεργασίας παραγωγής βιοαερίου
από στερεά παραπροϊόντα και απόβλητα της καλλιέργειας
εδώδιμων μανιταριών

Study and optimization of the biogas production process
using solid byproducts and wastes of edible mushroom cultivation

Ευάγγελος – Μάρκος Ε. Ρήγος

Εξεταστική επιτροπή:

Σεραφείμ Παπανικολάου, Καθηγητής ΓΠΑ (επιβλέπων)

Θωμάς Μπαρτζάνας, Καθηγητής ΓΠΑ

Παναγιώτα Διαμαντοπούλου, Κύρια Ερευνήτρια ΕΛΓΟ-ΔΗΜΗΤΡΑ

Μελέτη και αριστοποίηση της διεργασίας παραγωγής βιοαερίου από στερεά παραπροϊόντα και απόβλητα της καλλιέργειας εδώδιμων μανιταριών

ΠΜΣ Επιστήμη & Τεχνολογία Τροφίμων

Τμήμα Επιστήμης Τροφίμων & Διατροφής του Ανθρώπου

Εργαστήριο Μικροβιολογίας & Βιοτεχνολογίας Τροφίμων

ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Η περιβαλλοντική και ενεργειακή κρίση αποτελούν μείζονα προβλήματα της κοινωνίας και αφορούν τόσο το παρόν όσο και το άμεσο μέλλον. Η συνεχής αύξηση των ενεργειακών απαιτήσεων με την ταυτόχρονη μείωση κοιτασμάτων των ορυκτών πόρων οδηγεί στην εύρεση εναλλακτικών πηγών ενέργειας, καθώς και στην βελτιστοποίηση των ήδη υπαρχόντων. Ένα μεγάλο μέρος της περιβαλλοντικής κρίσης προέρχεται από την άκρατη απόρριψη αποβλήτων στο περιβάλλον με αποτέλεσμα τη μόλυνση αυτού και την ενίσχυση της κλιματικής αλλαγής. Πολλά από τα απορριφθέντα υπολείμματα, ειδικά όσα προέρχονται από τον πρωτογενή τομέα, πλούσια σε οργανικό φορτίο, επιβαρύνουν σημαντικά το περιβάλλον, όμως μπορούν να αξιοποιηθούν ως υποστρώματα ανάπτυξης μικροοργανισμών και να προκύψουν νέα προϊόντα προστιθέμενης αξίας, στα πλαίσια της κυκλικής οικονομίας.

Στη παρούσα μελέτη διερευνήθηκε η αξιοποίηση βιομηχανικών αποβλήτων καλλιέργειας μανιταριών, πιο συγκεκριμένα του αναλωμένου υποστρώματος μανιταριών, ως υπόστρωμα αναερόβιας χώνευσης και παραγωγής βιομεθανίου. Στο πρώτο σκέλος της έρευνας, μελετήθηκαν διαφορετικές επεξεργασίες χημικής υδρόλυσης, συνεπικουρούμενη με θερμική επεξεργασία. Το όξινο υδρόλυμα από την υδροθερμική επεξεργασία απέδωσε την υψηλότερη συγκέντρωση ελεύθερων σακχάρων (≈ 36 g/100 g ξηρού SMS, απόδοση υδρόλυσης $\approx 75\%$) και χρησιμοποιήθηκε ως υπόστρωμα για παραγωγή βιοαερίου, σε αυτοσχέδιο χωνευτήρα εργαστηριακής κλίμακας, αποδίδοντας 52 L βιοαερίου/kg VS, που περιείχαν 65% μεθάνιο, αναερόβια χώνευση 15 ημερών. Το αλκαλικό υδρόλυμα ομοιάζε με πολτό, λόγω αποδιάταξης του λιγνοκυτταρινούχου πλέγματος, χωρίς να απελευθερωθούν σάκχαρα και η παραγωγή βιοαερίου καθυστέρησε μερικές ημέρες. Η απόδοση σε βιοαέριο ήταν 37 L/kg VS και η περιεκτικότητα σε μεθάνιο ήταν 62%. Με βάση τα αποτελέσματα, το SMS μπορεί να χρησιμοποιηθεί ως υπόστρωμα για αναερόβια πέψη, όταν έχει προεπεξεργαστεί τόσο με χημική όσο και με υδροθερμική υδρόλυση.

Επιστημονική περιοχή: Αξιοποίηση αποβλήτων βιομηχανικών τροφίμων

Λέξεις κλειδιά: Υδρόλυση, Βιοαέριο, SMS, Μανιτάρι

Study and optimization of the biogas production process from solid by-products and wastes of edible mushroom cultivation

*MSc Food Science & Technology
Department of Food Science & Human Nutrition
Laboratory of Food Microbiology & Biotechnology*

ABSTRACT

The environmental and energy crisis is a major problem of society and concerns both the present and the immediate future. Continuous increase in energy requirements with the simultaneous depletion in fossil fuels resources, leads to finding alternative energy sources, as well as optimizing the existing ones. The environmental crisis is resulted by from the extreme waste disposal, which enhances both pollution and climate change. Many of these industrial residues, rich in organic load, are significantly burdened by the environment, but could be, also, used as substrates of microbial cultures, for the production of new value-added products, in terms of circular economy.

In the present study, the valorization of the spent mushroom substrate, as a potential feedstock for anaerobic digestion and production of biomethane was investigated. Firstly, various chemical hydrolysis treatments were studied, combined with heat process. The acidified hydrolysate, derided by the hydrothermal process yielded the highest concentration of free sugars (≈ 36 g/100 g of dry SMS, $\approx 75\%$ hydrolysis yield) and was used as a substrate for biogas production, in a bench-scale improvised anaerobic digester, producing 52 L biogas/kg VS, containing 65% methane, after 15 days of digestion. The alkaline hydrolysate was pulp-like, due to the disintegration of the lignocellulosic matrix, without releasing any additional sugars, so, the production of biogas delayed a few days. Biogas yield was 37 L/kg of VS and methane content was 62%. Based on the above, the SMS can be used as a substrate for anaerobic digestion when it has been pretreated with both chemical and hydrothermal hydrolysis.

Scientific area: Food-borne industrial waste valorization

Keywords: Biogas, Hydrolysis, SMS, Mushroom

ΠΙΝΑΚΑΣ ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΩΝ

1. Εισαγωγή	9
1.1 Βιομηχανία Μανιταριών.....	9
1.1.1 Τύποι Μανιταριών και Χρήσεις	12
1.1.2 Υποστρώματα.....	16
1.2 Προεπεξεργασία λιγνοκυτταρινούχων υποστρωμάτων	19
1.2.1 Φυσική προεπεξεργασία	21
1.2.2 Φυσικοχημική προεπεξεργασία	21
1.2.3 Χημική προεπεξεργασία	22
1.2.4 Βιολογική προεπεξεργασία	27
1.3 Βιοαέριο	28
2. Σκοπός της Μελέτης	38
3. Υλικά και Μέθοδοι	39
3.1 Προσδιορισμός της σύνθεσης του SMS	39
3.2 Διαδικασία υδρόλυσης του SMS.....	43
3.3 Βελτιστοποίηση της χημικής υδρόλυσης μέσω υδροθερμικής επεξεργασίας	43
3.4 Αναερόβια χώνευση του υδρολυμένου SMS	44
4. Αποτελέσματα – Συζήτηση	48
4.1 Σύσταση SMS.....	48
4.2 Υδρόλυση του SMS.....	49
4.3 Παραγωγή βιοαερίου	54
5. Συμπεράσματα	59
6. Βιβλιογραφία	61

ΚΑΤΑΛΟΓΟΣ ΠΙΝΑΚΩΝ

Πίνακας 1. Θερμικά στάδια και αντίστοιχοι ελάχιστοι χρόνοι παραμονής αναερόβιας χώνευσης.....	34
Πίνακας 2. Σύσταση του αποξηραμένου SMS.....	48
Πίνακας 3. Ποσοτικά δεδομένα από διάφορους συνδυασμούς θερμικής ή/και χημικής υδρόλυσης του SMS.....	49

ΚΑΤΑΛΟΓΟΣ ΕΙΚΟΝΩΝ - ΓΡΦΗΜΑΤΩΝ

Εικόνα 1. Παγκόσμια παραγωγή βρώσιμων μανιταριών (% του συνόλου) διαφόρων γενών για το έτος 2013 (CEFA, 2014). 12

Εικόνα 2. Καλλιέργεια μανιταριών *F. filiformis* (enoki) με βάση την τεχνολογία της φιάλης (<https://enviromushroom.ca/enoki/>)..... 16

Εικόνα 3. Παραπροϊόντα μανιταριών που λαμβάνονται μόνο με ζύμωση σε στερεό υπόστρωμα. Τα (Α) και (Β) είναι απόβλητα παραγωγής μανιταριών (στίποι και μανιτάρια που δεν συμμορφώνονται με τα εμπορικά πρότυπα όσον αφορά στο διαμέτρημα, το σχήμα ή το μέγεθος: 5–20% του βάρους παραγωγής), (C) υποπροϊόντα (πλεονασματική παραγωγή: ≤ 5%), (D) χρησιμοποιημένο υπόστρωμα μανιταριού (>20% του βάρους παραγωγής) (Antunes *et al.*, 2020)..... 19

Εικόνα 4. Μεταβολικό μονοπάτι παραγωγής βιοαερίου (Yadav *et al.*, 2022) 30

Εικόνα 5. Σχετικοί ρυθμοί παραγωγής βιοαερίου ανάλογα με τη θερμοκρασία και το χρόνο παραμονής (STMUGV, 2004). 34

Εικόνα 6. Αναπαράσταση των αυτοσχέδιων χωνευτήρων κλίμακας, οι οποίοι χρησιμοποιήθηκαν για την αναερόβια χώνευση του υδρολύματος SMS. 46

Εικόνα 7. Κορεσμένο διάλυμα καυστικού καλίου, προς προσδιορισμό της περιεκτικότητας του βιοαερίου σε μεθάνιο και διοξείδιο του άνθρακα (Εργαστήριο Μικροβιολογία και Βιοτεχνολογίας Τροφίμων, Γεωπονικό Πανεπιστήμιο Αθηνών)..... 46

Γράφημα 1. Παρακολούθηση της προόδου της υδρόλυσης SMS, με προσδιορισμό της συγκέντρωσης των ολικών αναγωγικών σακχάρων, σε διαδικασίες διάρκειας 3 ωρών..... 50

Γράφημα 2. (α) Γραφική αναπαράσταση Ολικών Αναγωγικών Σακχάρων (g/L), που προκύπτουν από τον υδρολυτικό συνδυασμό όξινης χημικής επεξεργασίας (με χρήση διαφόρων συγκεντρώσεων οξέος) και υδροθερμικής επεξεργασίας στους 140 ή 150 °C. (β) Γραφική αναπαράσταση της απόδοσης υδρόλυσης (%) όξινης χημικής επεξεργασίας (με χρήση διαφόρων συγκεντρώσεων οξέος), σε συνδυασμό με υδροθερμική επεξεργασία στους 140 ή 150 °C 53

Γράφημα 3. (α) Γραφική αναπαράσταση της παραγωγικότητας βιοαερίου (mL/ημέρα) και της απόδοσης βιοαερίου (L/kg VS), όπως προέκυψε από την αναερόβια χώνευση του όξινου υδρολύματος SMS. (β) Γραφική αναπαράσταση της ολικής παραγωγής βιοαερίου (mL) και της περιεκτικότητας του βιοαερίου σε CH₄, που προέκυψε από την αναερόβια χώνευση του όξινου υδρολύματος. 55

Γράφημα 4. (α) Γραφική αναπαράσταση της παραγωγικότητας βιοαερίου (mL/ημέρα) και της απόδοσης βιοαερίου (L/kg VS), όπως προέκυψε κατά την αναερόβια χώνευση του αλκαλικού υδρολύματος SMS. (β) Γραφική αναπαράσταση της ολικής παραγωγής βιοαερίου (mL) και της περιεκτικότητας του βιοαερίου σε CH₄, που προέκυψε από την αναερόβια χώνευση του αλκαλικού υδρολύματος. 56

Ευχαριστίες

Η παρούσα εργασία εκπονήθηκε στο πλαίσιο του Προγράμματος Μεταπτυχιακών Σπουδών “Επιστήμη και Τεχνολογία Τροφίμων” με ειδίκευση στην “Επεξεργασία, Συντήρηση και Βιοτεχνολογικές Διεργασίες Τροφίμων – Ανάπτυξη Προϊόντων Βιο-οικονομίας”.

Θα επιθυμούσα να ευχαριστήσω θερμά τον κο Παπανικολάου Σεραφείμ για την βοήθεια του στην επιλογή του θέματος, την εποπτεία, την καθοδήγηση, τις χρήσιμες συμβουλές του, καθώς και την κα Διαμαντοπούλου Παναγιώτα και τον κο Μπαρτζάνα Θωμά και για τη βοήθειά τους και τη συμμετοχή τους στην Τριμελή Εξεταστική Επιτροπή.

Ακόμη, θα ήθελα να ευχαριστήσω θερμά τον υποψήφιο διδάκτορα Γαβριήλ Βασιλάκη, ο οποίος συνέβαλε τα μέγιστα στην ολοκλήρωση της μεταπτυχιακής μου εργασίας και ήταν πάντα πρόθυμος να με βοηθήσει σε οτιδήποτε χρειαζόμουν.

Επιπλέον, ένα μεγάλο ευχαριστώ αξίζει στα υπόλοιπα μέλη του εργαστηρίου, που ήταν πάντα στην διάθεσή μου, συμβουλευόντάς με και καθοδηγώντας με, όποτε παρέστη ανάγκη.

Τέλος, ευχαριστώ την οικογένεια μου, για την στήριξη που μου παρέχει και τις αξίες, τις οποίες μου δίδαξε, βάση των οποίων πορεύομαι και λειτουργώ αλλά και τους φίλους μου που είναι δίπλα μου και με στηρίζουν σε κάθε σημαντικό βήμα της ζωής μου.

Με την άδειά μου, η παρούσα εργασία ελέγχθηκε από την Εξεταστική Επιτροπή μέσα από λογισμικό ανίχνευσης λογοκλοπής που διαθέτει το ΓΠΑ και διασταυρώθηκε η εγκυρότητα και η πρωτοτυπία της σε ποσοστό 94%

1. Εισαγωγή

Μια από τις μεγαλύτερες προκλήσεις, που αντιμετωπίζουν οι κοινωνίες σήμερα και στο μέλλον, είναι η μείωση των εκπομπών αερίων του θερμοκηπίου και, κατά συνέπεια, η πρόληψη της κλιματικής αλλαγής. Επομένως, είναι σημαντικό να αντικατασταθούν τα ορυκτά καύσιμα με ανανεώσιμες πηγές, όπως το βιοαέριο, η ηλιακή και η αιολική ενέργεια (Kåberger, 2018). Το βιοαέριο μπορεί να παραχθεί από διάφορες ροές οργανικών αποβλήτων ή ως παραπροϊόν βιομηχανικών διεργασιών. Εκτός από την παραγωγή ενέργειας, η αποικοδόμηση των οργανικών αποβλήτων μέσω της αναερόβιας χώνευσης προσφέρει και άλλα πλεονεκτήματα, όπως η πρόληψη της απελευθέρωσης οσμών και η μείωση των παθογόνων μικροοργανισμών. Επιπλέον, τα πλούσια σε θρεπτικά συστατικά χωνεμένα υπολείμματα μπορούν να χρησιμοποιηθούν ως λίπασμα για την ανακύκλωση των θρεπτικών συστατικών πίσω στους αγρούς (Vaneekhaute *et al.*, 2018). Ως εκ τούτου, τις τελευταίες δεκαετίες έχουν σημειωθεί σημαντικές εξελίξεις όσον αφορά την αξιοποίηση της λιγνοκυτταρινούχας βιομάζας, την ανάπτυξη συστημάτων υψηλών ρυθμών και την εφαρμογή τεχνολογιών στο πλαίσιο της διαδικασίας αναερόβιας χώνευσης, προκειμένου να ξεπεραστούν πιθανά εμπόδια, που προκύπτουν κατά τη διεργασία σε μεγάλη κλίμακα (Umor *et al.*, 2021). Η αποικοδόμηση του οργανικού υλικού απαιτεί συγχρονισμένη δράση ποικίλων ομάδων μικροοργανισμών με διαφορετικές μεταβολικές ικανότητες. Οι πρόσφατες εξελίξεις στις τεχνικές μοριακής βιολογίας παρέχουν στην ερευνητική κοινότητα ένα πολύτιμο εργαλείο για τη βελτίωση της κατανόησης αυτού του πολύπλοκου μικροβιολογικού συστήματος, το οποίο με τη σειρά του θα μπορούσε να βοηθήσει στη βελτιστοποίηση και τον αποτελεσματικό έλεγχο της διεργασίας στο μέλλον (Venkiteshwaran *et al.*, 2016).

1.1 Βιομηχανία Μανιταριών

Οι άνθρωποι καταναλώνουν μανιτάρια, τόσο άγρια, που συλλέγουν από τη φύση, όσο και τα καλλιεργούμενα είδη, όπως τα shiitake (*Lentinula* sp.), *Pleurotus* sp., *Auricularia* sp. για τα διατροφικά και θεραπευτικά τους οφέλη. Τα μανιτάρια έχουν χαμηλή περιεκτικότητα σε θερμίδες και λίπος, αλλά είναι πλούσια σε πρωτεΐνες, υδατάνθρακες και φυτικές ίνες, περιλαμβάνουν ένα ευρύ φάσμα

βιταμινών, μετάλλων και ιχνοστοιχείων, όπως χαλκό, ριβοφλαβίνη και φυλλικό οξύ, καθώς και κάλιο. Λόγω της ιδιαίτερης γεύσης τους, καταναλώνονται ως τροφή εδώ και χιλιετίες. Ορισμένα μανιτάρια, όχι μόνο αναγνωρίζονται ως υγιεινά τρόφιμα, αλλά αποτελούν επίσης σημαντική πηγή φυσικών ενεργών ουσιών, με υψηλό φαρμακευτικό ενδιαφέρον (Kalač, 2013; Kumla *et al.*, 2020; Argyropoulos *et al.*, 2022). Οι φαινόλες, οι στερόλες και τα τριτερπένια, που απαντώνται στα μανιτάρια, είναι παραδείγματα βιοδραστικών δευτερογενών μεταβολιτών με ευεργετικές ιδιότητες για την υγεία, έναντι της φλεγμονής, της υπέρτασης, του καρκίνου, της υπερχοληστερολαιμίας και άλλων ασθενειών (Cheung, 2010; Valverde *et al.*, 2015; Ma *et al.*, 2018).

Οι βασιδιομύκητες ανήκουν, μαζί με τους ασκομύκητες, στους ανώτερους μύκητες και είναι γνωστοί ως μανιτάρια. Η διαφορά από τους υπόλοιπους μύκητες είναι ότι παράγουν σπόρια (βασιδιοσπόρια), στο εξωτερικό ενός ειδικού εξωπαραγωγικού οργάνου, που ονομάζεται βασίδιο (Φραντζεσκάκης, 1990). Το σώμα τους αποτελείται από λεπτά νημάτια, που καλούνται υφές, ενώ το σύνολο των υφών ονομάζεται μυκήλιο και είναι είτε πολυκύτταρο, είτε μονοκύτταρο. Το πολυκύτταρο μυκήλιο διαφέρει από το μονοκύτταρο στο ότι παρουσιάζει διαφράγματα, που καλούνται σέπτα (septa). Τα μανιτάρια δεν έχουν χλωροφύλλη και έχουν την ικανότητα να αναπτύσσονται στο σκοτάδι, ενώ μια ομάδα εξ αυτών χρειάζεται φως για να επιτελέσει κάποιες λειτουργίες της (Στεφανάκης, 1995).

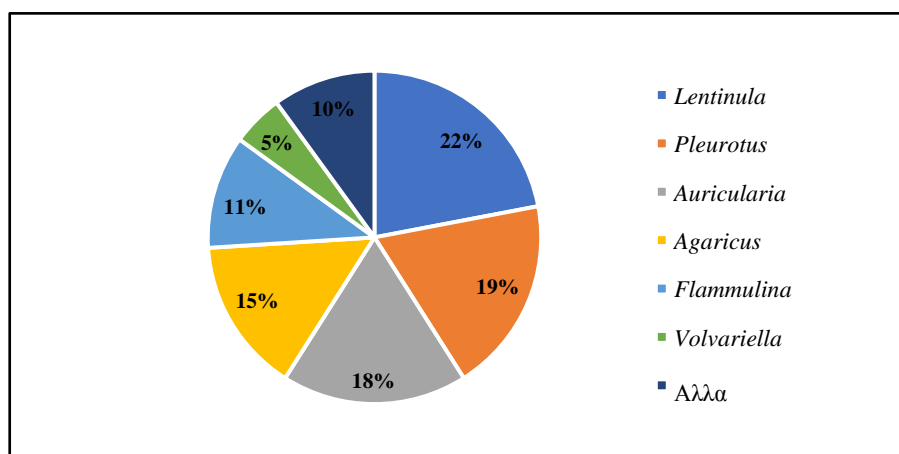
Με βάση την επιστήμη της βοτανολογίας, τα μανιτάρια είναι ετερότροφοι οργανισμοί, παρασιτικοί (σε φυτά), σαπροφυτικοί (σε φυτικές ή ζωικές νεκρές ύλες) και συνεπώς είναι ανίκανοι να παράγουν υδατάνθρακες, σε αντίθεση με τα φυτά και το παραχθέν άμυλο από διοξείδιο του άνθρακα. Για το λόγο αυτό παίρνουν την απαραίτητη πηγή άνθρακα και ενέργειας για το μεταβολισμό τους από ζώντες ή μη οργανισμούς (Στεφανάκης, 1995). Η αναπαραγωγή τους γίνεται είτε με αγενή είτε με εγγενή σπόρια, με την πλειοψηφία τους να αναπαράγονται και με τους δύο τρόπους. Η αγενής αναπαραγωγή πραγματοποιείται με σπόρια προερχόμενα από το μυκήλιο και τα όργανα, στα οποία σχηματίζονται ονομάζονται καρποφορίες. Στην εγγενή αναπαραγωγή γίνεται ένωση πυρήνων αντίθετου φύλου, δημιουργώντας νέα μυκήλια με νέο γονότυπο (Alexopoulos *et al.*, 1996).

Οι τρεις κύριοι πυλώνες της παγκόσμιας αγοράς μανιταριών είναι τα βρώσιμα, τα θεραπευτικά και τα άγρια μανιτάρια. Το 2013, η αξία της παγκόσμιας αγοράς μανιταριών εκτιμάται ότι ξεπέρασε τα 63 δισεκατομμύρια δολάρια. Το μεγαλύτερο μέρος της αγοράς (54%) αποτελείται από καλλιεργούμενα, βρώσιμα μανιτάρια αξίας περίπου 34 δισεκατομμυρίων δολαρίων, ακολουθούμενα από τα ιατρικά μανιτάρια με 24 δισεκατομμύρια δολάρια (38%) και τα άγρια μανιτάρια αξίας 5 δισεκατομμυρίων δολαρίων (8%) (Roysse *et al.*, 2017). Η πλειονότητα των καλλιεργούμενων, βρώσιμων μανιταριών παράγεται στην Κίνα, η οποία παρήγαγε περισσότερα από 30 δισεκατομμύρια κιλά μανιταριών το 2013, τα οποία αποτελούσαν περίπου το 87% της παγκόσμιας παραγωγής (CEFA, 2014). Η ΕΕ, η Αμερική και άλλες χώρες παρήγαγαν περίπου 3,1 δισεκατομμύρια κιλά, ενώ η υπόλοιπη Ασία παρήγαγε μόλις 1,3 δισεκατομμύρια κιλά. Από το 1978, η ποσότητα των καλλιεργούμενων, βρώσιμων μανιταριών, που παράγονται παγκοσμίως έχει αυξηθεί περισσότερο από 30 φορές (από περίπου 1 δισεκατομμύριο κιλά το 1978 σε 34 δισεκατομμύρια κιλά το 2013). Δεδομένου ότι ο παγκόσμιος πληθυσμός αυξήθηκε μόνο 1,7 φορές σε αυτό το διάστημα (από περίπου 4,2 δισεκατομμύρια το 1978 σε περίπου 7,1 δισεκατομμύρια το 2013), το επίτευγμα αυτό είναι αξιοσημείωτο. Κατά συνέπεια, η ποσότητα μανιταριών, που καταναλώνεται ανά άτομο, ετησίως, έχει ξεπεράσει τα 4,7 κιλά, ιδίως από το 1997 και μετά (έναντι 1 κιλού το 1997) (Roysse *et al.*, 2017). Το 2013, σχεδόν όλα τα μανιτάρια, που καταναλώθηκαν στην Κίνα, την Ευρωπαϊκή Ένωση και την Ινδία προέρχονταν από εγχώριες πηγές. Ομοίως, σχεδόν όλα τα μανιτάρια, που καταναλώθηκαν στις Ηνωμένες Πολιτείες, τον Καναδά, την Ιαπωνία και την Αυστραλία, το ίδιο έτος, προέρχονταν κυρίως από εγχώριες πηγές, όμως με σημαντικές ποσότητες εισαγωγών (USITC, 2010).

Οι πρώτες καλλιέργειες μανιταριών έγιναν το 1650, ενώ μετά το 1950 άρχισαν να καλλιεργούνται μανιτάρια σε εμπορικές φάρμες. Καθώς πρόκειται για μια άκρως εξειδικευμένη καλλιέργεια, που απαιτεί βαθιά γνώση και σημαντικούς οικονομικούς πόρους, η παραγωγή μανιταριών ήταν ασυνήθιστη στην Ελλάδα. Ωστόσο, η ποσότητα των διαθέσιμων μανιταριών αυξήθηκε σημαντικά τη δεκαετία 2007 - 2017, από τους 3.000 σε 6.000 τόνους παραγωγή, με τα κυριότερα είδη, που καλλιεργούνται να ανήκουν στα γένη *Pleurotus* sp. και *Agaricus* sp.. Αυτό οφείλεται στο γεγονός ότι τα μανιτάρια, αν και δεν είναι συχνά παρόντα στη διατροφή των Ελλήνων, έχουν

αυξήσει τη σημασία τους μέσα στο χρόνο. Παρά το γεγονός ότι ήταν ασυνήθιστο στην τοπική διατροφή, έχει καταφέρει να διεισδύσει με την πάροδο του χρόνου και με την αλληλεπίδραση με άλλες κουλτούρες τα τελευταία χρόνια (Kaldis *et al.*, 2002).

Περίπου το 85% της παγκόσμιας προσφοράς μανιταριών προέρχεται από πέντε κύρια γένη (Εικόνα 1). Το κυρίαρχο γένος, *Lentinula* sp., είναι υπεύθυνο για το 22% περίπου του συνόλου των καλλιεργούμενων μανιταριών στον κόσμο, με πάνω από 7 δισεκατομμύρια κιλά και την παραγωγή του να αυξάνεται κατά 106,8% συγκριτικά με το 2016. Με πέντε ή έξι καλλιεργούμενα είδη, το *Pleurotus* sp. αντιπροσωπεύει περίπου το 19% της παγκόσμιας παραγωγής (6 δις κιλά στην Κίνα το 2013, 10,8% αύξηση σε σχέση με το έτος 2010), ενώ ακολουθεί το *Auricularia* sp. και το *Agaricus* sp. σε ποσοστά 18% και 25%, αντίστοιχα, με την παραγωγή των ειδών *Auricularia* να γνωρίζουν αύξηση περί το 92% από το 2010. Τα γένη *Flammulina* sp. και *Volvariella* sp. απαντώνται σε χαμηλότερα αλλά σημαντικά ποσοστά.



Εικόνα 1. Παγκόσμια παραγωγή βρώσιμων μανιταριών (% του συνόλου) διαφόρων γενών για το έτος 2013 (CEFA, 2014).

1.1.1 Τύποι Μανιταριών και Χρήσεις

Lentinula edodes

Μέχρι τα μέσα της δεκαετίας του 1980, η Ιαπωνία ήταν ο κορυφαίος παραγωγός του *L. edodes*, συχνά γνωστού ως shiitake ή xianggu στα κινέζικα και αναπτύσσεται φυσικά στους κορμούς του δέντρου shii. Παρ' όλα αυτά, η Κίνα ξεπέρασε γρήγορα άλλες χώρες ως ο κύριος παραγωγός του xianggu μέχρι το 1990 χάρη στην ανάπτυξη διαδικασιών με βάση το πριονίδι, που συντόμευσαν τους χρόνους του κύκλου καλλιέργειας και βελτίωσαν την αποδοτικότητα της παραγωγής. Οι Κινέζοι αγρότες αύξησαν την παραγωγή xianggu από περίπου 500 εκατομμύρια

κιλά σε πάνω από 2 δισεκατομμύρια κιλά μεταξύ 1995 και 2000. Περισσότερο από το 95% της παγκόσμιας παραγωγής αυτού του είδους παράγεται πλέον στην Κίνα. Λόγω των οικονομικών ευκαιριών, που τους παρέχει η παραγωγή του xianggu, πολλές πόλεις βγήκαν από τη φτώχεια (Chang 1999; 2005). Από τις αρχές της δεκαετίας του 1980, η παραγωγή αποξηραμένων μανιταριών shiitake στην Ιαπωνία μειώθηκε σταδιακά (Yamanaka, 2011). Η παραγωγή αποξηραμένων shiitake μειώθηκε κατά 37% μεταξύ 2000 και 2009, αλλά η παραγωγή νωπών shiitake αυξήθηκε κατά 12%. Οι αυξήσεις στην παραγωγή φρέσκων shiitake ήταν απαραίτητες για να καλυφθεί η ζήτηση, που δημιουργήθηκε από τη μείωση των εισαγωγών φρέσκων shiitake από την Κίνα. Το 2009 παρήχθησαν συνολικά λίγο περισσότερα από 101 εκατομμύρια κιλά *L. edodes* (με βάση τα νωπά μανιτάρια συν τα αποξηραμένα μανιτάρια, ως νωπά ισοδύναμα), κατατάσσοντάς το στην τρίτη θέση με 22% όλων των βρώσιμων μανιταριών, που παράγονται στην Ιαπωνία. Η πλειονότητα της παραγωγής shiitake στις ΗΠΑ πραγματοποιείται σε υποστρώματα με βάση το πριονίδι, που είναι συμπληρωμένα με θρεπτικά συστατικά (Royle, 2014).

Pleurotus sp.

Τα μανιτάρια του γένους *Pleurotus*, αποκαλούμενα και ως oyster mushrooms, διαθέτουν χαρακτηριστικό πύλο (ελληνιστί καπέλο), ο οποίος μπορεί να παρατηρηθεί μακροσκοπικά, έχει διάμετρο 5 έως 15 cm, ανάλογα με τον φωτισμό και μπορεί να έχει χρώμα από κίτρινο έως υπόλευκο και καφέ. Το συγκεκριμένο μανιτάρι μπορεί να αρχίσει να αναπτύσσεται αμέσως από το υπόστρωμα. Χαρακτηριστικά είναι τα υπόλευκα ελάσματα, που μπορεί να είναι ή να μην είναι αναστομωμένα, ενώ διαθέτει στίγμα (κορμό), που έχει μήκος μικρότερο από 3-4 cm και διάμετρο περίπου 1 cm. Λόγω του αρνητικού γεωτροπισμού τους, τα μανιτάρια αυτά έλκονται προς το φως. Τα επίπεδα, ιώδη και λευκά σπόρια των βασιδίων, τα οποία έχουν τέσσερα από το καθένα, είναι ορατά στο μικροσκόπιο σε σημαντικούς αριθμούς. Τα σπόρια έχουν μέγεθος περίπου 10 x 4 μm, σε σύγκριση με το κατά προσέγγιση μέγεθος των βασιδίων που είναι 25 x 8 μm.

Τα μανιτάρια *Pleurotus* παράγονται και καταναλώνονται κυρίως σε χώρες της Ασίας, με την Κίνα, την Ιαπωνία, τη Νότια Κορέα, την Ταϊβάν, την Ταϊλάνδη, το Βιετνάμ και την Ινδία να αντιπροσωπεύουν το 99% της παγκόσμιας παραγωγής και

κατανάλωσης. Με το 87% της παγκόσμιας παραγωγής αυτού του είδους, η Κίνα είναι η κύρια παραγωγός (Roysse *et al.*, 2017). Η παραγωγή των *P. eryngii* και *P. nebrodensis* ενισχύθηκε, όταν οι διοικητικές και επαγγελματικές οργανώσεις στην Κίνα δημιούργησαν στρατηγικές για να βοηθήσουν τους παραγωγούς να κάνουν σωστή αρχική επιλογή των περιοχών, όπου η χρήση των πόρων και η καλλιέργεια μπορεί να αποδώσει τη βέλτιστη παραγωγή μανιταριών. Τα είδη *Pleurotus* παράγονται κυρίως στις κεντρικές περιοχές της Κίνας, ιδίως στις επαρχίες Henan, Hebei και Shandong. Η παραγωγή ειδών *Pleurotus* στην Ιαπωνία αυξήθηκε κατά 200% μεταξύ του 1997 (13,3 εκατομμύρια κιλά) και του 2010 (39,6 εκατομμύρια κιλά). Από άποψη ποσοστού, η παραγωγή *Pleurotus eryngii* αυξήθηκε περισσότερο (+453%), από 6,7 εκατομμύρια κιλά το 2000 σε σχεδόν 37 εκατομμύρια κιλά το 2009 (Yamanaka, 2011).

Η πλειονότητα του *P. eryngii* καλλιεργείται σε σάκους πολυπροπυλενίου, συμπληρωμένους με πίτουρο, πάνω σε αλεσμένο πριονίδι ιαπωνικού κέδρου ή καλαμποκιού. Στην Ελλάδα το *Pleurotus* sp. καταλαμβάνει σημαντικό ποσοστό της εγχώριας παραγωγής (Kaldis *et al.*, 2002)

Agaricus bisporus

Η Κίνα είναι ο κορυφαίος παραγωγός *Agaricus bisporus* παγκοσμίως, παράγοντας το 54% (2,37 δισεκατομμύρια κιλά) του είδους παγκοσμίως το 2013. Όσον αφορά τη συνολική παραγωγή, οι ΗΠΑ αντιπροσώπευαν το 9% (409 εκατ. kg), ακολουθούμενες από την Πολωνία (285 εκατ. kg), τις Κάτω Χώρες (270 εκατ. kg) και την Ινδία (250 εκατ. kg). Η παραγωγή του *A. bisporus* στην Κίνα έχει μετατοπιστεί σταδιακά προς τα βόρεια τα τελευταία χρόνια, ως αποτέλεσμα του ευνοϊκότερου κλίματος για την καλλιέργεια μανιταριών στις βόρειες επαρχίες και της ευκολότερης πρόσβασης σε πρώτες ύλες σε σχέση με τις νότιες επαρχίες. Η τάση αυτή αναμένεται να συνεχιστεί και τα επόμενα χρόνια (Li, 2012). Η παραγωγή στις Ηνωμένες Πολιτείες αυξήθηκε κατά περίπου 11,7% (από 378,9 εκατομμύρια κιλά το 2006 σε 423,2 εκατομμύρια κιλά το 2015) (USDA 2006, 2015).

Τα τελευταία δέκα χρόνια, η αύξηση της παραγωγής της λευκής ποικιλίας έχει ανέβει κατά 10,1%, ενώ η αύξηση της παραγωγής της καφέ ποικιλίας (*portabella* και *crimini*) έχει αυξηθεί κατά 24,3%. Η παραγωγή του *A. bisporus* στην Ευρώπη

εξακολουθεί να κινείται προς τα ανατολικά (Lelley 2014; Royse 2014). Η Πολωνία ξεπέρασε τις Κάτω Χώρες κατά σχεδόν 9 εκατομμύρια κιλά το 2013 και έγινε ο τρίτος μεγαλύτερος παραγωγός στον κόσμο. Το 2014, η διαφορά αυτή διευρύνθηκε ακόμη περισσότερο, καθώς η Πολωνία παρήγαγε 315 εκατ. kg, ενώ οι Κάτω Χώρες διατήρησαν το επίπεδο παραγωγής των 270 εκατ. kg. Πρόσφατα, η Πολωνία κατασκεύασε πολλά αγροκτήματα στο ολλανδικό σχέδιο, ιδίως στα ανατολικά της χώρας (Bieniecka & Dreve, 2012; Rozendaal, 2012). Λόγω της κρίσης στην Ουκρανία και του γεγονότος ότι η Πολωνία προμήθευε περίπου το 90% της ρωσικής αγοράς, η παραγωγή της Πολωνίας έγινε πρόσφατα αμφίβολη. Πάνω από το 90% της παραγωγής στις Κάτω Χώρες, τον τέταρτο μεγαλύτερο παραγωγό *A. bisporus*, πραγματοποιείται στα νοτιοανατολικά της χώρας, συγκεκριμένα στις επαρχίες Limburg, Brabant και Gelderland (Baars, 2012). Σχεδόν το 30% της καλλιέργειας αποστέλλεται ως νωπά μανιτάρια, ενώ το υπόλοιπο 60% εξάγεται είτε ως κατεψυγμένα είτε ως κονσερβοποιημένα μανιτάρια. Η πλειονότητα των υπόλοιπων φρέσκων μανιταριών αγοράστηκε από τη Γαλλία, τη Γερμανία, το Βέλγιο, τη Νορβηγία και τη Σουηδία, με το Ηνωμένο Βασίλειο να απορροφάει περίπου το 41% της παραγωγής φρέσκων μανιταριών (Baars 2012; Royse 2014). Το *Agaricus bisporus* αποτελεί το δεύτερο μανιτάρι με υψηλή εγχώρια παραγωγή στην Ελλάδα (Kaldis *et al.*, 2002)

Flammulina sp.

Η Ιαπωνία ήταν ο κύριος παραγωγός αυτού του είδους μέχρι τα μέσα της δεκαετίας του 1990. Στη συνέχεια, αρχής γενομένης περίπου από το 1997, η Κίνα ξεπέρασε όλες τις άλλες χώρες όσον αφορά την παραγωγή του *F. velutipes*. Από το 1995 έως το 2013, η παραγωγή αυξήθηκε από περίπου 0,12 δισεκατομμύρια κιλά σε περίπου 2,7 δισεκατομμύρια κιλά. Πολλές νέες φάρμες εποκί, του καλλιεργούμενου είδους *F. filiformis*, που χρησιμοποιούν την τεχνολογία της φιάλης (Εικόνα 2) έχουν κατασκευαστεί στην Κίνα τα τελευταία δέκα περίπου χρόνια, οδηγώντας σε εντατικοποίηση και αύξηση της παραγωγής του συγκεκριμένου μανιταριού (Royse *et al.*, 2017).



Εικόνα 2. Καλλιέργειαμανιταριών *F. filiformis* (enoki) με βάση την τεχνολογία της φιάλης (<https://enviromushroom.ca/enoki/>).

1.1.2 Υποστρώματα

Ταμανιτάρια, ιδίως εκείνα του γένους *Pleurotus*, καλλιεργούνται σε ειδικά διαμορφωμένους σάκους, γνωστούς ως ‘μπλοκμανιταριών’. Το εμβόλιο - σπόρια τουμανιταριού και αποστειρωμένο άχυρο περιλαμβάνονται στο μπλοκ. Η περίμετρος του μπλοκ διαθέτει μερικές οπές μέσα από τις οποίες θα ξεπηδήσει τελικά τομανιτάρι, το υπέργειο και βρώσιμο τμήμα του μύκητα. Εκτός από το απλό άχυρο, πολυάριθμα λιγνοκυτταρινούχα υλικά, όπως άχυρο σίτου, καλαμποκόσποροι, σταφύλια, χρησιμοποιημένα υπολείμματα καφέ και φλοιός βαμβακόσπορου, έχουν χρησιμοποιηθεί για την καλλιέργεια τωνμανιταριών *Pleurotus* (Philippoussis *et al.*, 2007; Corrêa *et al.*, 2016), ωστόσο το άχυρο σιταριού χρησιμοποιείται συνήθως ως υπόστρωμα για την εμπορική παραγωγή τους (Philippoussis, *et al.*, 2001; Grimm & Wösten, 2018). Για την ανάπτυξη του *Agaricus bisporus* χρησιμοποιείται συνήθως μείγμα κοπριάς αλόγου και σανό (Bellettini *et al.*, 2019).

Η παραγωγή και η κατανάλωσημανιταριών αυξάνεται κάθε χρόνο, λόγω της υψηλής θρεπτικής τους αξίας και της νόστιμης γεύσης τους, που προσελκύουν ανθρώπους από όλο τον κόσμο. Ωστόσο, ένα σημαντικό μέρος των υποπροϊόντων, που παράγονται κατά τη διαδικασία παραγωγήςμανιταριών απορρίπτεται, γεγονός που έχει σημαντικό αρνητικό αντίκτυπο στο περιβάλλον και αυξάνει το κόστος

παραγωγής. Το ποσοστό αυτό κυμαίνεται από 5 έως 20% του συνολικού όγκου παραγωγής, ανάλογα με την κλίμακα παραγωγής και το είδος. Οι πύλοι, οι στίποι, τα μανιτάρια, που δεν πληρούν τα εμπορικά κριτήρια ποιότητας, μορφής ή μεγέθους και το χρησιμοποιημένο υπόστρωμα μανιταριών αποτελούν παραδείγματα υπο-προϊόντων μανιταριών. Ως αναλωθέν υπόστρωμα μανιταριών (Spent Mushroom Substrate - SMS) ορίζεται το χρησιμοποιημένο υπόστρωμα μανιταριών μαζί με μυκήλια μανιταριών, σημαντικές ποσότητες ημικυτταρίνης, κυτταρίνης και λιγνίνης, που παρέμειναν αχρησιμοποίητα μετά την καλλιέργεια των μανιταριών, καθώς και εξωκυτταρικά ένζυμα τροποποίησης της λιγνίνης, που εκκρίνονται κατά τον αποικισμό του υποστρώματος (Phan & Sabaratnam 2012; Corrêa *et al.* 2016). Μεταξύ αυτών των ενζύμων, η λακκάση (Lac, E.C. 1.10.3.2), μια οξειδάση, που περιέχει χαλκό, είναι το πιο σύνηθες ένζυμο στο SMS του *Pleurotus* (Phan & Sabaratnam, 2012; Economou *et al.*, 2020).

Τα μυκήλια, τα εξωκυτταρικά ένζυμα, που απελευθερώνονται από τα μανιτάρια και βοηθούν στη διάσπαση του υποστρώματος και τα αχρησιμοποίητα λιγνοκυτταρινούχα υποστρώματα είναι όλα παρόντα στα υποστρώματα (Lim & Lee, 2013). Κατά μέσο όρο, 5 έως 6 κιλά χρησιμοποιημένου υποστρώματος προέρχονται από κάθε κιλό παραγόμενων μανιταριών *Pleurotus* (Paredes *et al.*, 2009), ενώ από την παραγωγή *Agaricus* περί τα 2,5 κιλά (Zied *et al.*, 2020). Στο παρελθόν, η διαχείριση του αναλωμένου υποστρώματος γινόταν με αποτέφρωση, μια διαδικασία, που μπορεί να οδηγήσει σε διάφορα περιβαλλοντικά ζητήματα, συμπεριλαμβανομένης της ατμοσφαιρικής ρύπανσης. Η χρήση φιλικών προς το περιβάλλον πρακτικών είναι η συνήθης στρατηγική διάθεσης των SMS, όπως η εναπόθεση στο έδαφος, η ταφή, η κομποστοποίηση ή η υγειονομική ταφή (Diamantopoulou & Philippoussis, 2015; Economou *et al.*, 2017). Ως εκ τούτου, φαίνεται αναγκαία η αναζήτηση εναλλακτικών τρόπων για περαιτέρω αξιοποίησή των (Lou *et al.*, 2017).

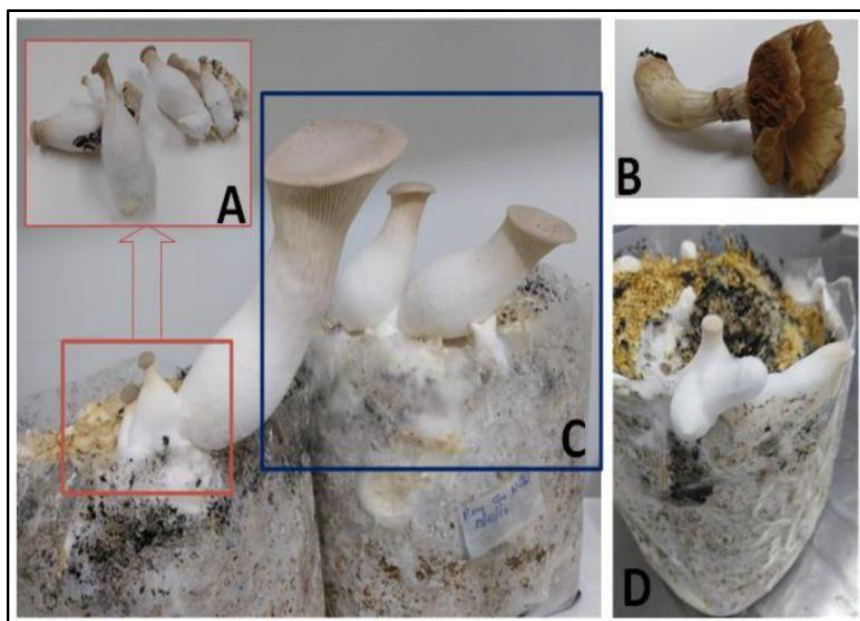
Τα παραπροϊόντα μπορούν να χρησιμοποιηθούν με διάφορους τρόπους, δεδομένου ότι έχουν υψηλή θρεπτική αξία. Η επαναχρησιμοποίηση των υπολειμμάτων ως πηγή πρώτων υλών για τη δημιουργία προϊόντων αιχμής, που υποστηρίζουν την κυκλική οικονομία έχει καταστεί προτεραιότητα τις τελευταίες δεκαετίες. Η μαζική απώλεια πολύτιμων οργανικών υλικών, όπως προκύπτει από τα απόβλητα της βιομηχανίας μανιταριών, δημιουργεί μείζον ζήτημα διαχείρισης τόσο

από οικονομική όσο και από περιβαλλοντική σκοπιά. Με γνώμονα αυτό, έχουν προκύψει πολλές μελέτες σχετικά με τις πιθανές χρήσεις των παραπροϊόντων σε πολυάριθμους τομείς, όπως ανάκτηση οργανικής ουσίας εδάφους, οργανικά λιπάσματα, κοπριά σε κηπευτικές καλλιέργειες, βιοεξυγίανση μολυσμένου εδάφους και νερού, διαχείριση ασθενειών καλλιεργούμενων φυτών, ανακαλλιέργεια μανιταριών, ζωοτροφές, καθώς και ως πηγή άνθρακα ανάπτυξης μικροοργανισμών, προς παραγωγή βιοαερίου, ενζύμων και λοιπών μικροβιακών μεταβολιτών (Ahlawat, 2011; Qiao *et al.*, 2011; Phan & Sabaratnam, 2012; Haq *et al.*, 2021; Ma *et al.*, 2021).

Όπως προαναφέρθηκε, για την εμπορική παραγωγή των μανιταριών *Agaricus* sp., χρησιμοποιούνται κομποστοποιημένα και παστεριωμένα υποστρώματα, ενώ σε άλλα είδη προηγείται μία σύντομη ζύμωση και παστερίωση (π.χ. *Pleurotus* sp.), ή τα υπολείμματα χρησιμοποιούνται ως έχουν, αλλά αποστειρώνονται (σε *Lentinula*, *Auricularia*, *Flammulina*, *Ganoderma* sp. κλπ) (Philippoussis *et al.*, 2001, 2007). Τα υποστρώματα αυτά συνήθως παράγονται από ανανεώσιμα γεωργικά υπολείμματα, όπως πριονίδι, ζαχαροκάλαμο, κοπριά αλόγων με άχυρο σίτου, σανό, κοπριά πουλερικών, αλεσμένο καλαμποκάλευρο, βαμβακόσπορο, κελύφη κακάο, γύψο και άλλα υλικά (Jasinska, 2018). Το κύριο παραπροϊόν της βιομηχανίας μανιταριών είναι το αναλωμένο υπόστρωμα μανιταριών - SMS (Εικόνα 3), Το SMS, το οποίο είναι πλούσιο σε φυσικά πολυμερή, όπως χιτοζάνη, χιτίνη, πρωτεΐνες, κυτταρίνη και ημικυτταρίνες, απορρίπτεται σε τεράστιες ποσότητες κάθε χρόνο. Ενδιαφέρον είναι να σημειωθεί ότι τα προαναφερθέντα πολυμερή είναι πρόδρομα των λειτουργικών ομάδων καρβονυλίου, υδροξυλίου και αμιδίου, τα οποία μπορούν να λειτουργήσουν ως ενεργές θέσεις δέσμευσης για τους ρύπους, καθ' όλη τη διάρκεια της διαδικασίας επεξεργασίας των υγρών αποβλήτων. Ένα κατιονικό επιφανειοδραστικό (βρωμιούχο κετυλοτριμεθυλαμμώνιο, CTAB) χρησιμοποιήθηκε σε μια πρόσφατη μελέτη για την τροποποίηση χρησιμοποιημένων υπολειμμάτων μανιταριών προκειμένου να απομακρυνθούν επιβλαβή χρώματα από τα υγρά απόβλητα (Alhujaily *et al.*, 2018).

Επιπλέον, σύμφωνα με τους Lin *et al.* (2016), στα χρησιμοποιούμενα υποστρώματα υπάρχει μυκήλιο με υψηλές συγκεντρώσεις συστατικών, όπως ιχνοστοιχεία (Fe, Ca, Zn και Mg), κυτταρίνη, ημικυτταρίνη, λιγνίνη, υδατάνθρακες, ακατέργαστες πρωτεΐνες και λιπίδια. Ως ο μεγαλύτερος παραγωγός μανιταριών στον κόσμο, η Κίνα παράγει ετησίως περισσότερους από 30 εκατομμύρια τόνους

μανιταριών, που αντιστοιχεί σε 150 εκατομμύρια τόνους SMS. Επομένως, η εφαρμογή αποτελεσματικών μεθόδων για την επαναχρησιμοποίηση του SMS είναι επιτακτική.



Εικόνα 3. Παραπροϊόντα μανιταριών που λαμβάνονται μόνο με ζύμωση σε στερεό υπόστρωμα. Τα (A) και (B) είναι απόβλητα παραγωγής μανιταριών (σίτποι και μανιτάρια που δεν συμμορφώνονται με τα εμπορικά πρότυπα όσον αφορά στο διαμέτρημα, το σχήμα ή το μέγεθος: 5–20% του βάρους παραγωγής), (C) υποπροϊόντα (πλεονασματική παραγωγή: $\leq 5\%$), (D) χρησιμοποιημένο υπόστρωμα μανιταριού ($>20\%$ του βάρους παραγωγής) (Antunes *et al.*, 2020).

1.2 Προεπεξεργασία λιγνοκυτταρινούχων υποστρωμάτων

Η λιγνοκυτταρίνη είναι η πιο ευρέως χρησιμοποιούμενη, προσιτή και βιώσιμη πρώτη ύλη (Jagtap *et al.*, 2012; Bhatia *et al.*, 2019^a). Η εφαρμογή τεχνολογιών, που βασίζονται στην αξιοποίηση της λιγνοκυτταρίνης είναι δυνατόν να οδηγήσει σε μείωση των εκπομπών αερίων του θερμοκηπίου, να ενισχυθούν οι αγροτικές οικονομίες και να εξασφαλιστεί η ενεργειακή επάρκεια, μέσω παραγωγής εμπορικά χρήσιμων χημικών ουσιών και βιοκαυσίμων (Patel *et al.*, 2019). Εκτός από την προέλευση, την ηλικία, τις κλιματικές συνθήκες, τις διαδικασίες συγκομιδής και αποθήκευσης, η σύνθεση της λιγνοκυτταρινούχας βιομάζας ποικίλλει ανάλογα με την πηγή βιομάζας, δηλαδή σκληρά ξύλα, μαλακά ξύλα, γεωργικά υπολείμματα και ενεργειακές καλλιέργειες. Τα τρία κύρια πολυμερή συστατικά της λιγνοκυτταρινούχας βιομάζας είναι η κυτταρίνη, η ημικυτταρίνη και η λιγνίνη και συνθέτουν αυτό το φυσικό ανθεκτικό βιοσύνθετο (Saini *et al.*, 2016; Bhatia *et al.*,

2017). Η δυσκολία απομόνωσης των ζυμώσιμων σακχάρων από τη λιγνοκυτταρινούχα βιομάζα, λόγω της ανθεκτικής της φύσης, καθιστά δύσκολη την αξιοποίηση αυτής της βιομάζας σε βιοδιυλιστήρια (Sindhu *et al.*, 2017; Bhatia *et al.*, 2019^a). Το πρώτο στάδιο για την υδρόλυση της περιεχόμενης κυτταρίνης και ημικυτταρίνης (ολοκυτταρίνης) μέσω ενζύμων ή χημικών παραγόντων καλείται η προεπεξεργασία της λιγνοκυτταρινικής βιομάζας (Bhatia *et al.*, 2017). Η ενζυμική διάσπαση της κυτταρίνης σε γλυκόζη επηρεάζεται από την περιεκτικότητα σε λιγνίνη, τη χημεία της ημικυτταρίνης και τις ομάδες ακετυλίου. Για τη βιομάζα αυτή έχουν αναπτυχθεί διάφορες διεργασίες προεπεξεργασίας.

Η προεπεξεργασία των λιγνοκυτταρινούχων υλικών είναι από καιρό γνωστό ότι έχει θετικά αποτελέσματα (McMillan, 1994). Η διαδικασία προεπεξεργασίας αποσκοπεί στη μείωση της κρυσταλλικότητας της κυτταρίνης, στην απαλλαγή από τη λιγνίνη και την ημικυτταρίνη και στο να καταστήσει τα λιγνοκυτταρινούχα υλικά πιο πορώδη και, συνάμα, βιοδιαθέσιμα. Η προεπεξεργασία πρέπει να πληροί τις ακόλουθες προϋποθέσεις: Να βελτιώνει την απελευθέρωση σακχάρων ή την ικανότητα απελευθέρωσης σακχάρων με υδρόλυση, να αποτρέπει την απώλεια ή την υποβάθμιση των υδατανθράκων, να αποτρέπει την ανάπτυξη παραπροϊόντων, που περιορίζουν τις διαδικασίες υδρόλυσης και ζύμωσης, που ακολουθούν και να είναι οικονομικά βιώσιμη. Οι διάφοροι τύποι διεργασιών προεπεξεργασίας μπορούν χονδρικά να κατηγοριοποιηθούν ως φυσικές – μηχανικές (θρυμματισμός και άλεση), φυσικοχημικές [προεπεξεργασία με ατμό ή θερμό νερό (υδροθερμόλυση) ή υγρή οξείδωση], χημικές (έκρηξη ατμού ή αμμωνίας, αλκαλική προεπεξεργασία, την αραιή όξινη υδρόλυση), βιολογικές (μικροοργανισμοί ή/και ένζυμα), ηλεκτρικές ή συνδυασμός αυτών (Singh, 2018; Kumar *et al.*, 2009; Sankaran *et al.*, 2019). Οι τεχνικές προεπεξεργασίας διευρύνουν την επιφάνεια και παρέχουν στα ένζυμα άμεσα διαθέσιμες θέσεις πρόσδεσης (Parthiba Karthikeyan *et al.*, 2018). Η υψηλότερη απόδοση σε σάκχαρα επιτυγχάνεται με τη μικρότερη ποσότητα παραπροϊόντων, όταν χρησιμοποιούνται τεχνικές προεπεξεργασίας (Patinvoh *et al.*, 2017; Meng *et al.*, 2018; Sorn *et al.*, 2019).

Πολυάριθμοι μικροοργανισμοί μπορούν να εκμεταλλευτούν τα απελευθερωμένα σάκχαρα πεντόζης και εξόζης για να παράγουν οργανικά οξέα,

πολυόλες, λιπαρά οξέα, αλκοόλες και βιοπλαστικά (Jagtap *et al.*, 2019; Kumar *et al.*, 2019).

1.2.1 Φυσική προεπεξεργασία

Μηχανικός θρυμματισμός

Μέσω συνδυασμού τεμαχισμού, θρυμματισμού ή/και άλεσης, είναι δυνατόν να μειωθεί η κρυσταλλικότητα της κυτταρίνης. Μετά τον τεμαχισμό, το μέγεθος των υλικών είναι συνήθως 10-30 mm, ενώ μετά την άλεση είναι 0,2-2 mm (Sun *et al.*, 2002). Η ισχύς που χρησιμοποιείται για τον μηχανικό θρυμματισμό των γεωργικών υλικών εξαρτάται από το τελικό μέγεθος των σωματιδίων, που θέλουμε να επιτύχουμε και τις ιδιότητες της βιομάζας (Cadoche & Lopez, 1989).

1.2.2 Φυσικοχημική προεπεξεργασία

Έκρηξη ατμού

Η πιο δημοφιλής τεχνική για την προεπεξεργασία λιγνοκυτταρινούχων υλικών είναι η έκρηξη με ατμό. Η τεχνική αυτή περιλαμβάνει την επεξεργασία της βιομάζας με κορεσμένο ατμό υψηλής πίεσης, ακολουθούμενη από ταχεία πτώση της πίεσης, που προκαλεί εκρηκτική εκτόνωση των υλικών. Πριν το υλικό εκτεθεί σε πίεση αέρα, συνήθως ξεκινά μια έκρηξη ατμού σε θερμοκρασία 160-260 °C (αντίστοιχη πίεση, 0,69-4,83 MPa) για σύντομο χρονικό διάστημα (Sun *et al.*, 2002). Παρατεταμένη διάρκεια αναμονής εφαρμόζεται για να ενθαρρυνθεί η υδρόλυση της ημικυτταρίνης και μια εκρηκτική αποσυμπύεση χρησιμοποιείται για να ολοκληρωθεί η διαδικασία. Λόγω του μετασχηματισμού της λιγνίνης, που προκαλείται από την υψηλή θερμοκρασία της μεθόδου και της διάσπασης της ημικυτταρινικής, αυξάνεται η δυνατότητα υδρόλυσης της κυτταρίνης (McMillan, 1994).

Έκρηξη αμμωνίας

Η λιγνοκυτταρινούχος βιομάζα υποβάλλεται σε υψηλή θερμοκρασία και πίεση σε υγρή αμμωνία για μεγάλο χρονικό διάστημα και στη συνέχεια η πίεση μειώνεται απότομα. Η διαδικασία αυτή είναι γνωστή ως έκρηξη αμμωνίας (AFEX). Η μέθοδος AFEX και η έκρηξη με ατμό είναι εξαιρετικά συγκρίσιμες. Σε μια τυπική διαδικασία AFEX, η θερμοκρασία είναι 90 °C, η περίοδος παραμονής είναι 30 λεπτά και η

δοσολογία της υγρής αμμωνίας είναι 1-2 kg αμμωνίας/kg ξηρής βιομάζας. Η προεπεξεργασία πολυάριθμων λιγνοκυτταρινικών υλικών, όπως η μηδική, το άχυρο σιταριού και το άγανο, έχει επιτευχθεί με τη χρήση της τεχνολογίας AFEX (MesHartree *et al.*, 1988).

Έκρηξη διοξειδίου του άνθρακα

Η έκρηξη υπερκρίσιμου CO₂, η οποία θα είχε χαμηλότερη θερμοκρασία από την έκρηξη με ατμό και πιθανώς φθηνότερο κόστος από την έκρηξη με αμμωνία, μελετήθηκε σε μια προσπάθεια να αναπτυχθούν καλύτερες διεργασίες επεξεργασίας λιγνοκυτταρίνης. Ένα ρευστό, που βρίσκεται σε αέρια κατάσταση, αλλά συμπιέζεται σε πυκνότητα, που μοιάζει περισσότερο με υγρό σε θερμοκρασίες πάνω από το κρίσιμο σημείο του αναφέρεται ως υπερκρίσιμο ρευστό. Προτάθηκε ότι ο σχηματισμός ανθρακικού οξέος από το CO₂, όταν διαλύεται στο νερό, επιταχύνει τη διαδικασία υδρόλυσης. Δεδομένου ότι τα μόρια του διοξειδίου του άνθρακα έχουν παρόμοιο μέγεθος με εκείνα του νερού και της αμμωνίας, θα πρέπει να μπορούν να περάσουν μέσα από τις ίδιες μικροσκοπικές οπές, που μπορούν να περάσουν τα μόρια των προαναφερθέντων. Έχει προταθεί ότι το CO₂ βοηθά στην υδρόλυση τόσο της κυτταρίνης όσο και της ημικυτταρίνης. Επιπλέον, η χαμηλή θερμοκρασία εμποδίζει το οξύ να αποσυνθέσει σημαντικά τους μονοσακχαρίτες. Η διάσπαση της δομής της κυτταρίνης μετά την εκρηκτική απελευθέρωση της πίεσης του CO₂ αυξάνει την επιφάνεια του υποστρώματος, που εκτίθεται στην υδρόλυση (Dale & Moreira, 1982).

1.2.3 Χημική προεπεξεργασία

Οζονόλυση

Μια ακόμη μέθοδος για τη μείωση της περιεκτικότητας σε λιγνίνη των λιγνοκυτταρινούχων αποβλήτων είναι η επεξεργασία με όζον. Σε αντίθεση με άλλες χημικές επεξεργασίες, αυτή βελτιώνει την *in vitro* πεπτικότητα του επεξεργασμένου υλικού και δεν αφήνει επιβλαβή κατάλοιπα. Σε πολλά λιγνοκυτταρινούχα υλικά, όπως άχυρο σίτου, παραπροϊόν ζαχαρότευτλου, πράσινος σανός, φιστίκια, πεύκο, άχυρο βαμβακιού και πριονίδι λεύκης, έχει εφαρμοστεί η οζονόλυση για τη διάσπαση της λιγνίνης και της ημικυτταρίνης (Ben-Ghedalia & Miron, 1981; Neely, 1984; Vidal &

Molinier, 1988). Η λιγνίνη είναι η κύρια ουσία που αποικοδομείται, η ημικυτταρίνη υφίσταται μια μικρή αλλαγή, αλλά η κυτταρίνη δεν επηρεάζεται.

Όξινη υδρόλυση

Τα λιγνοκυτταρινούχα υλικά έχουν υποστεί επεξεργασία με τη χρήση πυκνών οξέων, όπως H_2SO_4 και HCl . Η βελτίωση της ενζυμικής υδρόλυσης των λιγνοκυτταρινικών βιομαζών για την παραγωγή ζυμώσιμων σακχάρων μπορεί να προέλθει από την προεπεξεργασία με όξινη χημική υδρόλυση. Τα πυκνά οξέα είναι αποτελεσματικά για την υδρόλυση της κυτταρίνης, αλλά είναι δηλητηριώδη, διαβρωτικά και επικίνδυνα. Ως αποτέλεσμα, απαιτούνται αντιδραστήρες ανθεκτικοί στη διάβρωση, γεγονός που αυξάνει το κόστος της προεπεξεργασίας. Για να καταστεί η διαδικασία εμπορικά βιώσιμη, το συμπυκνωμένο οξύ πρέπει, επίσης, να συλλέγεται μετά την υδρόλυση (Sivers & Zacchi, 1995; Sun & Cheng, 2002). Με επιτυχία έχει αναπτυχθεί η προεπεξεργασία λιγνοκυτταρινούχων υλικών μέσω όξινης υδρόλυσης με αραιωμένο χημικό παράγοντα. Λόγω του χαμηλού κόστους και της αποτελεσματικότητάς του, το θειικό οξύ σε συγκεντρώσεις συνήθως κάτω του 4% κατά βάρος έχει προσελκύσει τη μεγαλύτερη προσοχή σε αυτές τις έρευνες. Η φουρφουράλη έχει παραχθεί εμπορικά από κυτταρινικές πηγές με τη χρήση αραιωμένου H_2SO_4 (Root *et al.*, 1959; Zeitsch, 2000). Η βιομάζα επεξεργάζεται με αραιωμένο H_2SO_4 για την υδρόλυση της ημικυτταρίνης σε ξυλόζη και άλλα σάκχαρα, τα οποία στη συνέχεια διασπώνται περαιτέρω σε φουρφουράλη (Mosier *et al.*, 2005).

Μπορούν να επιτευχθούν υψηλοί ρυθμοί αντίδρασης και η υδρόλυση της κυτταρίνης ενισχύεται σημαντικά ύστερα από προεπεξεργασία με αραιωμένο H_2SO_4 (Esteghlalian *et al.*, 1997). Η πλειονότητα της ημικυτταρίνης απομακρύνεται επιτυχώς από το αραιωμένο οξύ και ανακτάται ως διαλυμένα σάκχαρα και όταν η ημικυτταρίνη απομακρύνεται, οι αποδόσεις γλυκόζης από την κυτταρίνη αυξάνονται σε περίπου 100%, όταν έχει πρότερα επιτευχθεί πλήρης υδρόλυση της ημικυτταρίνης. Όταν προστίθεται θειικό οξύ, η ημικυτταρίνη εξαλείφεται, γεγονός που βελτιώνει τη χώνευση της κυτταρίνης στα εναπομείναντα στερεά (Mosier *et al.*, 2005). Παρουσία αραιωμένου οξέος, η υδρόλυση της κυτταρίνης επωφελείται από τις υψηλές θερμοκρασίες (McMillan, 1994). Η υδρόλυση με αραιά οξέα αποδίδει υψηλά ποσοστά μετατροπής ξυλάνης σε ξυλόζη υπό λιγότερο δύσκολες συνθήκες. Επειδή η

ξυλάνη αποτελεί έως και το ένα τρίτο των συνολικών υδατανθράκων σε πολλά λιγνοκυτταρινούχα υλικά, η επίτευξη υψηλών αποδόσεων μετατροπής της ξυλάνης σε ξυλόζη είναι απαραίτητη για την επίτευξη ευνοϊκής συνολικής οικονομίας της διεργασίας (Hinman *et al.*, 1992). Για χαμηλά φορτία στερεών (βάρος υποστρώματος / βάρος μίγματος αντίδρασης =5-10%), χρησιμοποιείται συχνά διεργασία συνεχούς ροής υψηλής θερμοκρασίας ($T >160$ °C). Για υψηλά φορτία στερεών (10-40%), χρησιμοποιείται συνήθως μια χαμηλής θερμοκρασίας ($T <160$ °C) μέθοδος δέσμης (Esteghlalian *et al.*, 1997).

Υπό συγκρίσιμες συνθήκες, οι Yat *et al.* ανέφεραν την προεπεξεργασία με αραιό οξύ τεσσάρων ειδών ξυλείας (λεύκη, έλατο βαλσάμ, basswood και κόκκινο σφενδάμι). Σε έναν αντιδραστήρα παρτίδας με γυάλινη επένδυση (όγκου 1 L) διερευνήθηκε η παραγωγή και η αποικοδόμηση ξυλόζης σε διαφορετικές θερμοκρασίες αντιδραστήρα (160-190 °C), συγκεντρώσεις θειικού οξέος (0,25% - 1,0% (w/v)) και μεγέθη σωματιδίων (28-10/20 mesh). Με βάση τα αποτελέσματα, οι ρυθμοί αντίδρασης για την παραγωγή ξυλόζης από ημικυτταρίνη και φουρφουράλης από ξυλόζη εξαρτώνται σε μεγάλο βαθμό τόσο από τη θερμοκρασία όσο και από τη συγκέντρωση του οξέος. Ο ρυθμός διάσπασης της ξυλόζης μεταβάλλεται γραμμικά με την περιεκτικότητα σε οξύ σε συνδυασμό με θερμοκρασίες άνω των 140 °C. Η εφαρμογή χαμηλών συγκεντρώσεων οξέων $<0,1\%$, σε αντίθεση με το 0,7 - 3,0%, που είναι σύνηθες για την τεχνολογία αραιών οξέων, είναι πιο αποτελεσματική στις υψηλές θερμοκρασίες. Οι διαμορφώσεις του εξοπλισμού και ο υψηλός λόγος νερού προς στερεά που χρησιμοποιούνται στα συστήματα ροής έχουν ως αποτέλεσμα καλές αποδόσεις ημικυτταρινικών σακχάρων και ιδιαίτερα εύπεπτη κυτταρίνη με χαμηλά φορτία οξέων, αλλά απαιτούν σημαντική ενέργεια για την προεπεξεργασία και την ανάκτηση του προϊόντος.

Αν και η υδρόλυση της κυτταρίνης μπορεί να βελτιωθεί σημαντικά με την προεπεξεργασία με αραιωμένο οξύ, η μέθοδος αυτή έχει συχνά υψηλότερο κόστος από τις φυσικοχημικές μεθόδους προεπεξεργασίας, όπως η έκρηξη με ατμό ή η AFEX, που προαναφέρθηκαν. Για τις επακόλουθες διαδικασίες ενζυμικής υδρόλυσης ή ζύμωσης απαιτείται εξουδετέρωση του pH. Οι Selig *et al.* (2007) ανέφεραν ότι μετά από προεπεξεργασία με αραιό οξύ σε υψηλή θερμοκρασία, σχηματίστηκαν σφαιρικά σταγονίδια στην επιφάνεια υπολείμματος καλαμποκιού. Υπέθεσαν ότι οι λιγνίνες και,

ενδεχομένως, τα σύμπλοκα λιγνίνης - υδατανθράκων αποτελούσαν τα σταγονίδια, που δημιουργήθηκαν. Αυτά τα σταγονίδια αποδείχθηκε ότι μπορούν να εναποτίθενται στην επιφάνεια της εναπομείνουσας βιομάζας και ότι σχηματίστηκαν από υπολείμματα αραβοσίτου κατά την προεπεξεργασία σε ουδέτερα και όξινα pH στους 130 °C και άνω. Στην καθαρή κυτταρίνη, η εναπόθεση σταγονιδίων, που δημιουργήθηκαν υπό συγκεκριμένες συνθήκες προεπεξεργασίας (όξινο pH, T >150 °C) είχε επιζήμιο αντίκτυπο στην ενζυμική σακχαροποίηση του υποστρώματος. Ως εκ τούτου, είναι ζωτικής σημασίας να εξετάζεται προσεκτικά η κατάλληλη προεπεξεργασία με αραιά οξέα σε βιομάζα, που εμπεριέχει λιγνοκυτταρίνη. Έχει αποδειχθεί ότι τα υλικά, που έχουν υποστεί όξινη υδρόλυση μπορεί να είναι πιο δύσκολο να ζυμωθούν λόγω της παρουσίας επικίνδυνων ενώσεων (Galbe & Zacchi, 2007).

Αλκαλική υδρόλυση

Μια ποικιλία βάσεων μπορεί να χρησιμοποιηθεί για την προεπεξεργασία λιγνοκυτταρινικών υλικών και η ποσότητα λιγνίνης στα υλικά επηρεάζει το πόσο καλά λειτουργεί η αλκαλική προεπεξεργασία (Fan *et al.*, 1987; McMillan, 1994). Σε σύγκριση με άλλες τεχνολογίες προεπεξεργασίας, οι αλκαλικές τεχνικές χρησιμοποιούν χαμηλότερες θερμοκρασίες και πιέσεις (Mosier *et al.*, 2005). Η αλκαλική προεπεξεργασία είναι δυνατή σε θερμοκρασίες περιβάλλοντος, αλλά η διαδικασία προεπεξεργασίας διαρκεί ώρες ή ημέρες σε αντίθεση με λεπτά ή δευτερόλεπτα, που διαρκεί όταν εφαρμοστούν υψηλότερες θερμοκρασίες. Οι αλκαλικές μέθοδοι είναι λιγότερο πιθανό να υποβαθμίσουν τα σάκχαρα από ό,τι οι όξινες διαδικασίες και πολλά από τα καυστικά άλατα μπορούν να ανακτηθούν. Οι αλκαλικές επεξεργασίες με χημικούς παράγοντες, όπως τα υδροξείδια νατρίου, καλίου, ασβεστίου και αμμωνίου είναι κατάλληλες. Η περισσότερη έρευνα έχει γίνει για το υδροξείδιο του νατρίου (MacDonald *et al.*, 1983; Fox *et al.*, 1989; Elshafei *et al.*, 1991; Soto *et al.*, 1994). Ωστόσο, έχει αποδειχθεί ότι το υδροξείδιο του ασβεστίου, το οποίο είναι και το οικονομικότερο μεταξύ των υπολοίπων, είναι ένα αποτελεσματικό μέσο προεπεξεργασίας, γιατί, μετά το πέρας της υδρόλυσης και μέσων εξουδετέρωσης του ασβεστίου με CO₂, το ασβέστιο μπορεί να ανακτηθεί από το σύστημα ως αδιάλυτο ανθρακικό ασβέστιο, το οποίο μπορεί στη συνέχεια να μετατραπεί ξανά σε υδροξείδιο του ασβεστίου και να επαναχρησιμοποιηθεί.

Η ενζυμική πεπτικότητα, η περιεκτικότητα σε λιγνίνη, όπως και η κρυσταλλικότητα βρέθηκαν να συσχετίζονται, από τους Chang και Holtzaple (2000), οπότε και κατέληξαν στα ακόλουθα συμπεράσματα: (1) η εκτεταμένη απολιγνινοποίηση απομακρύνει τα εμπόδια της ενζυμικής υδρόλυσης, ανεξάρτητα από την κρυσταλλικότητα και (2) η κρυσταλλικότητα επηρεάζει σημαντικά τους αρχικούς ρυθμούς υδρόλυσης, αλλά έχει μικρότερο αντίκτυπο στις τελικές αποδόσεις σακχάρων. Τα ευρήματα αυτά υποδηλώνουν ότι μια επιτυχής διαδικασία επεξεργασίας λιγνοκυτταρίνης θα πρέπει να εξαλείψει όλες τις ομάδες ακετυλίου και να μειώσει το ποσοστό λιγνίνης της επεξεργασμένης βιομάζας σε περίπου 10% (Kim *et al.*, 2016). Ως αποτέλεσμα, η αλκαλική προεπεξεργασία μπορεί να συμβάλει σημαντικά στη βιοδιαθεσιμότητα της κυτταρίνης σε ενζυμική υδρόλυση.

Με την απομάκρυνση των αναποτελεσματικών θέσεων προσρόφησης και τη βελτίωση της πρόσβασης στην κυτταρίνη και την ημικυτταρίνη, η απομάκρυνση της λιγνίνης ενισχύει την αποδοτικότητα των ενζύμων. Σύμφωνα με τους Lee & Fan (1982) η προσρόφηση ενζύμων και η αποτελεσματικότητα των προσροφημένων ενζύμων καθορίζουν τον ρυθμό της ενζυμικής υδρόλυσης και όχι τη διάχυτη μεταφορά μάζας του ενζύμου. Με την απομάκρυνση των αναποτελεσματικών θέσεων προσρόφησης και τη βελτίωση της πρόσβασης στην κυτταρίνη και την ημικυτταρίνη, η απομάκρυνση της λιγνίνης ενισχύει την αποδοτικότητα των ενζύμων. Σύμφωνα με τους Kong *et al.* (1996), τα αλκάλια απομακρύνουν τις ακετυλομάδες από την ημικυτταρίνη (κυρίως την ξυλάνη), μειώνοντας το εμπόδιο των υδρολυτικών ενζύμων και αυξάνοντας σημαντικά την πεπτικότητα των υδατανθράκων, οπότε κατέληξαν στο συμπέρασμα ότι η περιεκτικότητα σε ακετυλομάδες έχει άμεση συσχέτιση με την απόδοση σακχάρων κατά την ενζυμική υδρόλυση. Έχει διαπιστωθεί ότι τα λιγνοκυτταρινούχα υλικά διογκώνονται όταν εκτίθενται σε αραιωμένο NaOH, το οποίο αυξάνει την εσωτερική επιφάνεια, μειώνει τον πολυμερισμό, μειώνει την κρυσταλλικότητα, διαχωρίζει τους δομικούς δεσμούς μεταξύ λιγνίνης και υδατανθράκων και διαταράσσει τη δομή της λιγνίνης (Fan *et al.*, 1987). Η χρήση NaOH για την επεξεργασία σκληρού ξύλου φέρεται να αύξησε την πεπτικότητα του από 14% σε 55%, ενώ μείωσε τη συγκέντρωση λιγνίνης από 24-55% σε 20%. Επιπλέον, η προεπεξεργασία με αραιωμένο NaOH ήταν αποτελεσματική για την υδρόλυση καλαμιών με συγκεντρώσεις λιγνίνης 10-18% (Bjerre *et al.*, 1996).

Οξειδωτική απολιγνινοποίηση

Το ένζυμο υπεροξειδάση μπορεί να καταλύσει τη βιοαποικοδόμηση της λιγνίνης με την παρουσία υπεροξειδίου του υδρογόνου (H_2O_2) (Azzam, 1989). Η ευαισθησία του παραπροϊόντος ζαχαροκάλαμου στην ενζυμική υδρόλυση αυξήθηκε σημαντικά με την προεπεξεργασία του υλικού με H_2O_2 . Με τη χρήση 2% H_2O_2 στους 30 °C για 8 ώρες, διαλύθηκε περίπου το 50% της λιγνίνης και η πλειοψηφία της ημικυτταρίνης. Η κυτταρινάση χρησιμοποιήθηκε στη συνέχεια για τη σακχαροποίηση της κυτταρίνης στους 45 °C για 24 ώρες, παράγοντας γλυκόζη με απόδοση 95% (Azzam, 1989). Χρησιμοποιώντας υγρή οξείδωση και αλκαλική υδρόλυση, οι Bjerre *et al.* (1996) μετέτρεψαν το 85% του άχυρου σιταριού (20 g άχυρου/L, 170 °C, 5-10 λεπτά) σε γλυκόζη. Η λιγνίνη του άχυρου σιταριού οξειδώνεται εύκολα με υγρή οξείδωση και προσθήκη βάσεων, γεγονός που αυξάνει την ευαισθησία των πολυσακχαριτών στην ενζυμική υδρόλυση. Η υγρή οξείδωση δεν είχε ως αποτέλεσμα την παρουσία φουρφουράλης ή υδροξυμεθυλοφουρφουράλης, αναγνωρισμένων αναστολέων της μικροβιακής ανάπτυξης όταν χρησιμοποιούνται εναλλακτικά συστήματα προεπεξεργασίας, όπως η όξινη χημική επεξεργασία.

1.2.4 Βιολογική προεπεξεργασία

Ανάλογα με τη διαδικασία, η πλειονότητα των τεχνολογιών προεπεξεργασίας απαιτεί ακριβά όργανα ή εξοπλισμό με υψηλές ενεργειακές απαιτήσεις. Για τη μετατροπή της βιομάζας, οι φυσικές και θερμοχημικές διεργασίες απαιτούν πολλή ενέργεια. Παρά τη σημαντική διάσπαση της λιγνίνης, η βιολογική επεξεργασία με τη χρήση διαφόρων τύπων σαπροφυτικών μυκήτων προωθείται όλο και περισσότερο ως μέθοδος, που αφαιρεί τη λιγνίνη από μια λιγνοκυτταρινούχα βιομάζα χωρίς να δαπανάται πολλή ενέργεια (Okano *et al.*, 2005). Μικροοργανισμοί, όπως οι μύκητες καφέ, λευκής και μαλακής σήψης χρησιμοποιούνται σε μεθόδους βιολογικής προεπεξεργασίας για τη διάσπαση της λιγνίνης και της ημικυτταρίνης σε παραπροϊόντα (Galbe & Zacchi, 2007). Οι λευκές και μαλακές σήψεις στοχεύουν τόσο στην κυτταρίνη όσο και στη λιγνίνη, ενώ οι καφέ σήψεις στοχεύουν κυρίως στην κυτταρίνη. Όταν υπάρχουν μύκητες λευκής σήψης, η λιγνίνη διασπάται από ένζυμα που αποδομούν τη λιγνίνη, όπως οι υπεροξειδάσες και η λακκάση (Lee *et al.*, 2007).

Ο λόγος άνθρακα - αζώτου ελέγχουν αυτά τα ένζυμα. Ο άνθρακας και το άζωτο είναι δύο θεμελιώδη θρεπτικά συστατικά για τη μικροβιακή ανάπτυξη: ο άνθρακας χρησιμοποιείται ως πηγή ενέργειας και το άζωτο για τη σύνθεση πρωτεϊνών και νουκλεϊκών οξέων. Ένας υψηλός λόγος C/N θα μειώσει τον ρυθμό βιοαποικοδόμησης, ενώ ένας χαμηλός λόγος C/N θα τείνει να παράγει υπερβολική αμμωνία και VFAs, τα οποία μπορεί να προκαλέσουν αναστολή στην ανάπτυξη των μικροοργανισμών και κατ' επέκταση στην έκκριση ενζύμων (Kumar, 2011; Li *et al.*, 2011). Η πιο αποτελεσματική βιολογική προετοιμασία για τα λιγνοκυτταρινικά υλικά βασίζεται στη χρήση μυκήτων λευκής σήψης (Fan *et al.*, 1987). Επίσης, έχει διερευνηθεί ο συνδυασμός βιολογικής προεπεξεργασίας με άλλες προσεγγίσεις προεπεξεργασίας. Οι Itoh *et al.* (2003) ανέφεραν ότι μετά από καλλιέργεια λευκόσπορων μυκήτων, όπως *Ceriporiopsis subvermispota*, *Dichomitus squalens*, *Pleurotus ostreatus* και *Coriolus versicolor* και επακόλουθη αλκοόλυση, σε μια διεργασία ταυτόχρονης σακχαροποίησης και ζύμωσης (SSF) σε τεμαχίδια ξύλου οξιάς παράχθηκε αιθανόλη. Ο στόχος των βιο-επεξεργασιών με βάση τους μύκητες ήταν να μειωθεί η εισροή ενέργειας, που απαιτείται για το διαχωρισμό των συστατικών του ξύλου με βάση την αιθανόλυση. Χωρίς την προσθήκη θρεπτικών ουσιών, τα τεμαχίδια ξύλου οξιάς αφέθηκαν για 2 έως 8 εβδομάδες παρουσία των μυκήτων λευκής σήψης. Στη συνέχεια, τα τεμαχίδια ξύλου υποβλήθηκαν σε αιθανόλυση για το διαχωρισμό τους σε πολτό και διαλυτά κλάσματα. Από το κλάσμα πολτού, η αιθανόλη παράχθηκε με SSF.

1.3 Βιοαέριο Created with BioRender.com

Η Αναερόβια Χώνευση (AX) είναι μια βιοχημική διεργασία, κατά τη διάρκεια της οποίας σύνθετα οργανικά στοιχεία αποσυντίθεται απουσία οξυγόνου, από διάφορους τύπους αναερόβιων μικροοργανισμών και μετατρέπονται σε βιοαέριο. Με άλλα λόγια, κατά τη διάρκεια αυτής της διαδικασίας, τα βακτήρια διασπούν σύνθετα οργανικά μόρια σε απλούστερα, όπως το μεθάνιο (CH₄) και το διοξείδιο του άνθρακα (CO₂), ενώ αναπτύσσονται σε θερμοκρασίες μεταξύ 20 και 55 °C, εν τη απουσία οξυγόνου. Η διαδικασία της αναερόβιας χώνευσης απαντάται στη φύση, με το μεθάνιο να εκλύεται όταν η οργανική ύλη διασπάται υπό τη μικροβιακή δραστηριότητα, η οποία συνήθως συμβαίνει σε λίμνες ή θαλάσσια ιζήματα, καθώς και

από τη δραστηριότητα των ζώων, όπως στα στομάχια των μηρυκαστικών. Αντίστοιχη τεχνική χρησιμοποιείται, επίσης, για την παραγωγή βιοαερίου σε αεροστεγή δοχεία, που χρησιμεύουν ως αντιδραστήρες ή χωνευτήρες σε μικρή ή/και βιομηχανική κλίμακα. Τα προϊόντα της αναερόβιας χώνευσης σε μια μονάδα βιοαερίου περιλαμβάνουν το βιοαέριο και το κομπόστ (Ali Shah *et al.*, 2014).

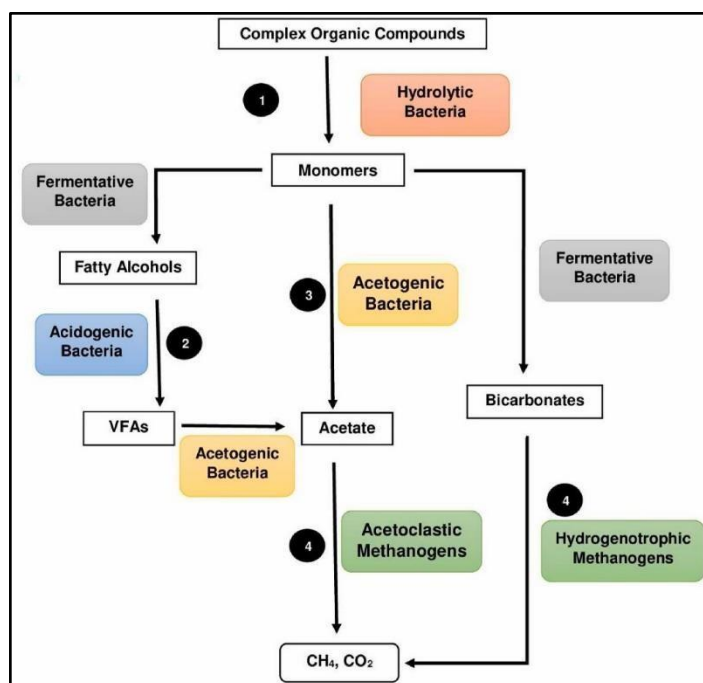
Η πλήρης βιολογική αποδόμηση της οργανικής ύλης προς βιοαέριο σε αναερόβιες συνθήκες αποτελεί μία σύνθετη διεργασία, που συνίσταται στην αλληλεπίδραση διαφορετικών ομάδων μικροοργανισμών. Κάθε μία από αυτές τις ομάδες είναι υπεύθυνη για την εκτέλεση ενός συγκεκριμένου σταδίου της συνολικής διαδικασίας. Ως αποτέλεσμα, μια ουσία, που θα ήταν απόβλητο για μια ομάδα μικροοργανισμών, αποτελεί θρεπτικό υπόστρωμα για άλλη μικροβιακή ομάδα. Τα αναερόβια βακτήρια αναπτύσσονται πολύ πιο αργά από τα αερόβια βακτήρια σε σύγκριση με την αερόβια αποικοδόμηση της οργανικής ύλης (αποσύνθεση της οργανικής ύλης παρουσία αέρα και οξυγόνου – αερόβια επεξεργασία). Ως αποτέλεσμα, σε σύγκριση με την αερόβια διεργασία, το τελικό προϊόν, που παράγεται από την αναερόβια χώνευση είναι μικρότερο ανά μονάδα βάρους της οργανικής ύλης (Meegoda *et al.*, 2018).

Η αποτελεσματικότητα της αξιοποίησης των υπολειμμάτων, που προέρχονται από αγροτικές δραστηριότητες, μέσω αναερόβιας πέψης, καθορίζεται από τη συνολική πεπτικότητα των μορίων. Η λιγνίνη, η οποία παραμένει αχρησιμοποίητη κατά την παραγωγή του βιοαερίου, καθώς είναι άπεπτο μόριο, καθορίζει σε μεγάλο βαθμό την πέψη των υπολειμμάτων. Μεμονωμένα υπολείμματα, όπως η κοπριά αγελάδας και ο υδρόβιος υάκινθος παρέχουν υποβέλτιστες αναλογίες άνθρακα/αζώτου, περιορίζοντας τη λειτουργία σε πολλά ενζυμικά συστήματα, που είναι υπεύθυνα για την αποικοδόμηση μιας ποικιλίας συστατικών, που υπάρχουν στα υπολείμματα. Η χρήση μικτών υποστρωμάτων με ευνοϊκές αναλογίες C/N έχει αναφερθεί ότι οδηγούν σε υψηλότερη παραγωγή βιοαερίου (Ghose & Das, 1982). Χρησιμοποιώντας ένα μείγμα από σιτάρι αχύρου προεπεξεργασμένο από το μανιτάρι *Pleurotus sp.* έχει βρεθεί ότι ενισχύει σημαντικά την απόδοση βιοαερίου (Mueller & Troesch, 1986). Καταναλωμένα υπολείμματα, όπως αυτά που λαμβάνονται μετά την καλλιέργεια των βρώσιμων μανιταριών, θα μπορούσαν να είναι καλύτερη πηγή βιολογικά προεπεξεργασμένων υποστρωμάτων για την παραγωγή βιοαερίου (Bisaria

et al., 1987). Έρευνες έχουν δείξει αυξημένη παραγωγή βιοαερίου από αναλωμένο υπόστρωμα βρώσιμου μανιταριού *Pleurotus sajor-caju* (Bisaria & Madan, 1983).

Το μεθάνιο είναι το κύριο συστατικό του βιοαερίου, που απελευθερώνεται από τη χημικά συνδεδεμένη ενέργεια του υποστρώματος. Η αρχική ουσία διασπάται συνεχώς σε μικρότερα μόρια κατά τη διάρκεια μιας σειράς σταδίων, που οδηγούν στη δημιουργία βιοαερίου (Εικόνα 4). Η αναερόβια χώνευση είναι διεργασία που εκλύει πολύ λίγη θερμότητα. Η διεργασία της αναερόβιας χώνευσης παρουσιάζει τέσσερα κύρια διακριτά στάδια, όπως αυτά συνοψίζονται παρακάτω και θα αναλυθούν εκτενέστερα στη συνέχεια (Yadav *et al.*, 2022):

1^ο Στάδιο: Υδρόλυση, **2^ο Στάδιο:** Οξεογένεση, **3^ο Στάδιο:** Ακετογένεση, **4^ο Στάδιο:** Μεθανογένεση



Εικόνα 4. Μεταβολικό μονοπάτι παραγωγής βιοαερίου (Yadav *et al.*, 2022)

Κάθε ένα από τα προαναφερθέντα στάδια ολοκληρώνεται με επιτυχία από διάφορους μικροοργανισμούς. Στη δεξαμενή χώνευσης, τα διάφορα στάδια της διαδικασίας εκτελούνται ταυτόχρονα. Οι βραδύτερες φάσεις των διαφόρων σταδίων καθορίζουν την ταχύτητα της συνολικής διαδικασίας αποικοδόμησης.

Υδρόλυση

Τα βιοπολυμερή διασπώνται σε απλούστερα και πιο διαλυτά μόρια από υδρολυτικά βακτήρια κατά το στάδιο της υδρόλυσης, το οποίο είναι το αρχικό στάδιο της διαδικασίας. Με αυτόν τον τρόπο, οι οργανικές μακρομοριακές ουσίες, συμπεριλαμβανομένων των πρωτεϊνών, των πολυσακχαριτών, των λιπιδίων και των νουκλεϊκών οξέων, αποσυντίθενται στα ολιγομερή και μονομερή τους, τα οποία είναι εύπεπτες ουσίες μικρότερου μοριακού βάρους. Η διαδικασία αυτή είναι εξωκυτταρική, δηλαδή λαμβάνει χώρα στην κύρια υγρή καλλιέργεια έξω από τα κυτταρικά τοιχώματα των βακτηρίων.

Υπό αναερόβιες συνθήκες, ουσίες όπως οι πρωτεΐνες ή το άμυλο υδρολύονται εύκολα. Αντίθετα, οι θεμελιώδεις φυτικές ουσίες, όπως η ολοκυτταρίνη και η λιγνίνη διασπώνται σταδιακά και ανομοιόμορφα σε αναερόβια περιβάλλοντα. Η υδρόλυση των λοιπών υδατανθράκων (λ.χ. άμυλο) ολοκληρώνεται εντός λίγων ωρών, ενώ η διαδικασία για τις πρωτεΐνες και τα λιπίδια ολοκληρώνεται εντός λίγων ημερών. Το στάδιο της υδρόλυσης είναι καθοριστικής σημασίας για τη χώνευση, επειδή ελέγχει την ποσότητα του μεθανίου, που θα παραχθεί.

Οξεογένεση

Τα προϊόντα υδρόλυσης διασπώνται και μετατρέπονται σε μεθανογενή υποστρώματα από τα οξεογόνα βακτήρια κατά τη διάρκεια της οξεογένεσης. Οι ολιγοσακχαρίτες και οι μονοσακχαρίτες, τα αμινοξέα και τα λιπαρά οξέα διασπώνται σε οξικό οξύ (CH_3COOH) σε ποσοστό 50%, διοξείδιο του άνθρακα (CO_2) και υδρογόνο (H_2) σε ποσοστό 20%, τα οποία αποτελούν υποστρώματα για τη μεθανογένεση και μπορούν να μετατραπούν απευθείας σε μεθάνιο, καθώς και σε πτητικά λιπαρά οξέα (VFA) και αλκοόλες σε ποσοστό 30%, τα οποία πρέπει να περάσουν από το επόμενο στάδιο της ακετογένεσης.

Ακετογένεση

Κατά τη διάρκεια της ακετογένεσης, μια ομάδα εξειδικευμένων αναερόβιων μικροοργανισμών, γνωστών ως μεταβατικά βακτήρια, μετατρέπει τα προϊόντα της οξεογένεσης, που δεν μπορούν να μετατραπούν απευθείας σε μεθάνιο από τα μεθανογόνα βακτήρια, σε κατάλληλα για τα πέψουν υποστρώματα. Οι αλκοόλες και τα πτητικά λιπαρά οξέα μετατρέπονται σε μεθανογενή υποστρώματα, όπως το οξικό

οξύ (CH_3COOH), το υδρογόνο (H_2) και το διοξείδιο του άνθρακα με οξείδωση. Το οξικό οξύ και το υδρογόνο παράγονται κατά την οξείδωση πτητικών λιπαρών οξέων με αλυσίδες άνθρακα μεγαλύτερες από δύο και αλκοολών με αλυσίδες μεγαλύτερες από ένα άτομο άνθρακα. Κατά τη διαδικασία της μεθανογένεσης, το υδρογόνο μετατρέπεται σε μεθάνιο. Η οξεογένεση και η μεθανογένεση συμβαίνουν συνήθως ταυτόχρονα ως αποτέλεσμα μιας συμβιωτικής σχέσης μεταξύ των δύο τύπων μικροοργανισμών.

Μεθανογένεση

Η μεθανογένεση είναι η τελευταία φάση της αναερόβιας χώνευσης. Τα οξεοτροφικά μεθανοβακτήρια (*Methanosarcina* sp., *Methanothrix* sp. κλπ), τα οποία διασπούν τα παραγόμενα οργανικά οξέα, συμπεριλαμβανομένου του οξικού οξέος, παράγουν μεθάνιο σε ποσοστό περίπου 70% κατά τη διάρκεια αυτής της φάσης. Το υπόλοιπο 30% παράγεται από υδρογονοτροφικά μεθανοβακτήρια (*Methanococcus* sp., *Methanobacterium* sp. κλπ) μέσω της αναγωγής του υδρογόνου και του διοξειδίου του άνθρακα (Ahning, 2003, Yadnika *et al.*, 2004). Κοβάλτιο, μολυβδαίνιο, νικέλιο και σελήνιο απαιτούνται από τα υδρογονοτροφικά μεθανοβακτήρια και επιταχύνουν τη διαδικασία, όταν υπάρχουν σε υψηλές συγκεντρώσεις στην πρώτη ύλη (Lebuhn *et al.*, 2008). Η μεθανογένεση, η οποία είναι η πιο αργή βιολογική αντίδραση και η αντίδραση, που ρυθμίζει τον ρυθμό της διαδικασίας, είναι μια ουσιαστική φάση σε ολόκληρη τη διαδικασία της πέψης.

Από όλους τους αναερόβιους μικροοργανισμούς, που εμπλέκονται στη διαδικασία, τα μεθανογόνα βακτήρια έχουν τον πιο αργό ρυθμό ανάπτυξης. Λόγω υψηλής ευαισθησίας, τα μεθανοβακτήρια επηρεάζονται σε μεγάλο βαθμό από τις παραμέτρους λειτουργίας του χωνευτήρα (pH, θερμοκρασία, κλπ). Προκειμένου να επιτευχθεί ισορροπία μεταξύ των παραγωγών οργανικών οξέων και των μεθανοβακτηρίων, είναι επιτακτική ανάγκη να διατηρηθεί η ομαλότητα της διαδικασίας, ώστε τα πτητικά οξέα και το υδρογόνο να διατηρούνται σε σταθερά, επιθυμητά επίπεδα στον χωνευτήρα. Μεταβλητές, που επηρεάζουν τη μεθανογένεση, είναι ο ρυθμός τροφοδοσίας, η θερμοκρασία, το pH και η σύσταση της πρώτης ύλης. Η παραγωγή μεθανίου μειώνεται ή ακόμη και σταματά ως αποτέλεσμα της υπερφόρτωσης του χωνευτήρα, των μεταβολών της θερμοκρασίας (που προκαλούνται

από τα μεσόφιλα και θερμοφιλα βακτήρια) και της αύξησης των συγκεντρώσεων διαλυμένου οξυγόνου.

Η διεργασία της αναερόβιας χώνευσης μπορεί να πραγματοποιηθεί σε διαφορετικές θερμοκρασίες, που χωρίζονται σε τρία θερμοκρασιακά εύρη (φάσεις), μέσα στα οποία δραστηριοποιούνται οι αντίστοιχοι μικροοργανισμοί (βακτήρια):

- 10-25 °C, ψυχρόφιλη φάση
- 25-40 °C, μεσόφιλη φάση
- 40-65 °C, θερμοφιλη φάση

Οι ενζυμικές αντιδράσεις, που πραγματοποιούνται στα μικροβιακά κύτταρα των αναερόβιων μικροοργανισμών, εξαρτώνται άμεσα από τις μεταβολές της θερμοκρασίας. Σε κάθε θερμοκρασιακό επίπεδο υπάρχει μια τιμή μέγιστης δραστηριότητας. Οι ψυχρόφιλοι μικροοργανισμοί, που δραστηριοποιούνται μόνο σε ψυχρόφιλες συνθήκες επιτυγχάνουν το άριστο σημείο ανάπτυξής τους σε επίπεδα θερμοκρασίας μικρότερα των 15 °C. Οι μεσόφιλοι μικροοργανισμοί, αντίστοιχα, έχουν ως θερμοκρασία μέγιστης ανάπτυξης περί τους 35 °C, ενώ οι θερμοφιλοι τους 55 °C (Μάρη, 2000). Έχουν βρεθεί μικροοργανισμοί σε ένα ευρύ φάσμα θερμοκρασιακών περιοχών από 2 °C σε θαλάσσια ιζήματα μέχρι πάνω από 100 °C σε γεωθερμικές περιοχές (Ferry, 1993).

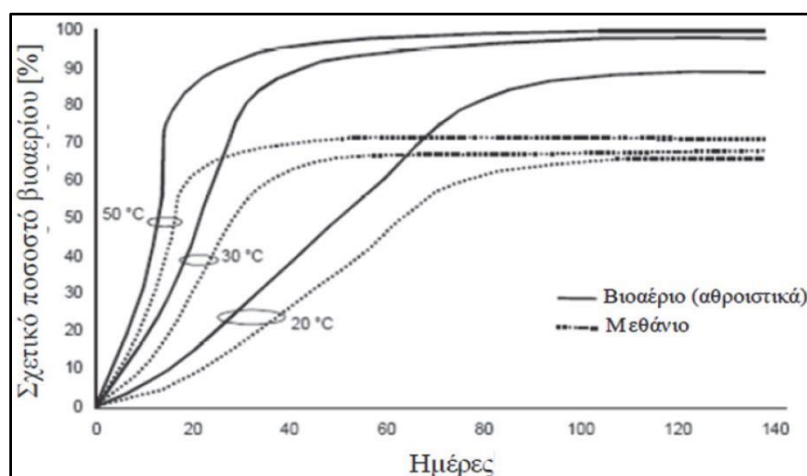
Σε γενικές γραμμές, σε πολύ χαμηλή ή υψηλή θερμοκρασία (π.χ. σε θερμοκρασίες μικρότερες των -10 °C ή άνω των 90 °C) οι μικροοργανισμοί εξοντώνονται πλήρως. Στην πράξη, ο στόχος είναι η πιο αποδοτική παραγωγή σε βιοαέριο. Στην παραγωγή ηλεκτρισμού και θερμότητας από το σύστημα συμπαραγωγής βρίσκει εφαρμογή μόνο η μεσόφιλη και η θερμοφιλη αναερόβια χώνευση. Η θερμοκρασία είναι η βασικότερη παράμετρος στην αναερόβια χώνευση παρεμβαίνοντας άμεσα και έμμεσα σε κάποιες από τις υπόλοιπες παραμέτρους, όπως στον χρόνο παραμονής.

Ο υδραυλικός χρόνος παραμονής (HRT) εκφράζει το μέσο χρόνο σε ημέρες που θα πρέπει να μείνουν τα απόβλητα μέσα στο χωνευτήρα. Υπάρχει μια άμεση συσχέτιση μεταξύ της θερμοκρασίας της διεργασίας και του υδραυλικού χρόνου παραμονής, όπως φαίνεται και στον Πίνακα 1. Η θερμοκρασία είναι αντιστρόφως ανάλογη με τον χρόνο παραμονής. Όσο υψηλότερη είναι η θερμοκρασία, τόσο μικρότερος είναι ο χρόνος παραμονής των αποβλήτων στον αναερόβιο χωνευτήρα.

Αυτό οφείλεται στο γεγονός ότι οι αναερόβιοι μικροοργανισμοί, που δραστηριοποιούνται σε υψηλές θερμοκρασίες, όπως στη θερμοφιλή περιοχή, αυξάνουν τον ρυθμό παραγωγής βιοαερίου, επομένως δεν χρειάζεται τα απόβλητα να παραμένουν για μεγάλο χρονικό διάστημα μέσα στο χωνευτήρα. Η σχέση του ρυθμού παραγωγής βιοαερίου με τη θερμοκρασία και το χρόνο παραμονής παρουσιάζεται στο διάγραμμα, που ακολουθεί (Εικόνα 5).

Πίνακας 1. Θερμικά στάδια και αντίστοιχοι ελάχιστοι χρόνοι παραμονής αναερόβιας χώνευσης.

Θερμικό στάδιο	Θερμικές διεργασίες	Ελάχιστος χρόνος Παραμονής
Ψυχρόφιλη	< 20 °C	70 έως 80 ημέρες
Μεσόφιλη	30 έως 42 °C	30 έως 40 ημέρες
Θεομόφιλη	43 έως 55 °C	15 έως 20 ημέρες



Εικόνα 5. Σχετικοί ρυθμοί παραγωγής βιοαερίου ανάλογα με τη θερμοκρασία και το χρόνο παραμονής (STMUGV, 2004).

Παρόλο που οι υψηλές θερμοκρασίες αυξάνουν την αποδοτικότητα του χωνευτήρα, από την άλλη οδηγούν το σύστημα σε αστάθεια εμφανίζοντας ευαισθησία ακόμα και στις μικρές αυξομειώσεις της θερμοκρασίας και της οργανικής φόρτισης. Τα θερμοφιλά βακτήρια είναι πιο ευαίσθητα σε διακυμάνσεις της θερμοκρασίας κατά ± 1 °C και απαιτούν περισσότερο χρόνο στο να προσαρμοστούν σε μια νέα θερμοκρασία, προκειμένου να επιτευχθεί η μέγιστη παραγωγή μεθανίου. Οι χαμηλότερες θερμοκρασίες αποδεικνύονται πιο λειτουργικές, καθώς οι μικροοργανισμοί δεν είναι τόσο ευαίσθητοι στις διακυμάνσεις, διατηρώντας σταθερό το σύστημα χωρίς να επηρεάζεται η παραγωγή μεθανίου ακόμα και σε μεταβολές ± 3 °C, ενώ γίνεται καλύτερη επεξεργασία λόγω του μεγαλύτερου χρόνου παραμονής.

Αντίστοιχα όμως, μεγαλώνει το κόστος αφού απαιτείται μεγαλύτερο μέγεθος χωνευτήρα και χρόνος παραμονής. Σε θερμοκρασίες χαμηλότερες των 20 °C (ψυχρόφιλες συνθήκες) η παραγωγή βιοαερίου είναι σημαντικά μειωμένη σε σχέση με τις άλλες δύο περιπτώσεις (Σιούλας *et al.*, 2009).

Η σταθερότητα της θερμοκρασίας έχει καθοριστική σημασία. Στην πράξη, η θερμοκρασία λειτουργίας επιλέγεται σε συνάρτηση με την χρησιμοποιούμενη πρώτη ύλη και η θερμοκρασία διεργασίας, συνήθως, παρέχεται από ειδικά συστήματα θέρμανσης, τα οποία περιλαμβάνουν είτε εναλλάκτες στο εσωτερικό του χωνευτήρα, είτε εναλλάκτες θερμότητας εξωτερικά αυτού. Στις περισσότερες εγκαταστάσεις παραγωγής βιοαερίου σε παγκόσμιο επίπεδο εφαρμόζεται η μεσόφιλη φάση, καθώς συνδυάζει ικανοποιητική σταθερότητα του συστήματος, μικρό χρόνο παραμονής και μέτριες απαιτήσεις σε θέρμανση (Feng *et al.*, 2019)

Το pH του υποστρώματος επηρεάζει την αύξηση των μεθανογενών μικροοργανισμών και μπορεί να έχει επιπτώσεις στο διαχωρισμό μερικών ενώσεων, που έχουν σημασία για τη διεργασία (αμμωνία, σουλφίδιο, οργανικά οξέα). Από μελέτες έχει δειχθεί ότι ο σχηματισμός του μεθανίου πραγματοποιείται μέσα σε ένα σχετικά μικρό εύρος pH περίπου από 5,5 έως 8,5 με ένα βέλτιστο εύρος 7-8 για τους περισσότερους μεθανογενείς μικροοργανισμούς. Τα οξεογενή και οξεοπαραγωγά βακτήρια έχουν, σε πολλές περιπτώσεις, χαμηλότερη τιμή του βέλτιστου pH, κάτω από 5. Το pH των αποβλήτων στον αντιδραστήρα είναι ένδειξη της όξινης ή βασικής φύσης τους. Το ευνοϊκότερο εύρος pH για τη μεσόφιλη επεξεργασία είναι μεταξύ 6,8 και 7,5. Η διαδικασία της αναερόβια χώνευσης δύναται να πραγματοποιηθεί ικανοποιητικά και σε τιμές pH 6,5 και 8, όμως πτώση του pH σε τιμές μικρότερες του 6,5 θεωρούνται επικίνδυνες και διαταράσσουν τη διεργασία της μεθανογένεσης. Τιμές κάτω από 6,0 αντιστοιχούν σε όξινες συνθήκες, τοξικές για τα μεθανοπαραγωγά βακτήρια (Cioabla *et al.*, 2012).

Οι μεταβολές του pH οφείλονται σε πολλούς παράγοντες, σημαντικό εκ των οποίων αποτελεί η συγκέντρωση των πτητικών λιπαρών οξέων. Όσο αυξάνεται η συγκέντρωσή τους, τόσο μειώνεται το pH, αλλά όχι συγχρόνως και με τον ίδιο ρυθμό. Το υπόστρωμα του χωνευτήρα διαθέτει ικανότητα ανασχεσης ή αλλιώς ρυθμιστική ικανότητα, η οποία του επιτρέπει να διατηρεί το pH σε περίπτωση αύξησης της συγκέντρωσης των πτητικών οξέων. Επομένως, χρειάζεται να αυξηθεί κατά μεγάλο

ποσοστό η συγκέντρωση των πτητικών λιπαρών οξέων, ώστε να επηρεαστεί το pH και να μειωθεί (Ward *et al.*, 2008). Παρόλα αυτά, μια μεγάλη συγκέντρωση των πτητικών προκαλεί τοξικότητα στους αναερόβιους μικροοργανισμούς, πριν ακόμα καταφέρει να αποτυπωθεί σε μια μεταβολή του pH, με μη αναστρέψιμα αποτελέσματα (Meng *et al.*, 2020). Ακόμη, ένας παράγοντας που επηρεάζει το επίπεδο του pH είναι η αύξηση της συγκέντρωσης του διοξειδίου του άνθρακα, η οποία προκαλεί μείωση του pH και αντίστροφα. Το διαλυμένο CO₂ σχηματίζει ανθρακικό οξύ (H₂CO₃) από την αντίδραση του με το νερό. Η διαλυτότητα του διοξειδίου του άνθρακα στο νερό μειώνεται με την αύξηση της θερμοκρασίας. Επομένως, η τιμή του pH στους θεرمόφιλους χωνευτήρες είναι υψηλότερη απ' ό,τι στους μεσόφιλους. Τέλος, η τιμή του pH αυξάνεται με την παρουσία αμμωνίας, η οποία παράγεται κατά την υποβάθμιση των πρωτεϊνών ή από την παρουσία αμμωνίας στο ρεύμα τροφοδοσίας. Η ρυθμιστική ικανότητα του συστήματος μπορεί να ισοσταθμίσει τις αλλαγές στο pH, που προέρχονται από τη συσσώρευση βάσεων ή οξέων στο εσωτερικό του χωνευτήρα, μέχρι ένα ορισμένο επίπεδο. Από εκεί και πέρα εμφανίζονται δραστικές αλλαγές στις τιμές του pH, εμποδίζοντας εξολοκλήρου τη διεργασία. Γι' αυτό το λόγο, το pH θεωρείται ικανοποιητικός δείκτης για τον έλεγχο της αναερόβιας επεξεργασίας μόνο σε υποστρώματα με χαμηλή ρυθμιστική ικανότητα (Σιούλας *et al.*, 2009).

Όπως έχει αναφερθεί ήδη σε προηγούμενο εδάφιο, το SMS αποτελείται κυρίως από μυκήλιο και αποσαθρωμένη λιγνοκυτταρινούχα βιομάζα. Από μελέτες εδείχθη ότι το SMS έχει καλύτερη απόδοση παραγωγής βιοαερίου σε σύγκριση με πρώτες ύλες, όπως το άχυρο (Gao *et al.*, 2021). Ωστόσο, η χρήση του SMS ως υπόστρωμα για την αναερόβια χώνευση εξακολουθεί να αντιμετωπίζει πολλές προκλήσεις και εμπόδια. Για παράδειγμα, μια υψηλότερη αναλογία άνθρακα προς άζωτο αναστέλλει τη χώνευση και η υψηλή πεπτικότητα του SMS μπορεί επίσης να επηρεάσει αρνητικά τη σταθερότητα της. Αυτά τα προβλήματα οδηγούν σε σύντομο κύκλο παραγωγής αερίου, χαμηλή απόδοση αερίου και χαμηλά οικονομικά οφέλη, και ως εκ τούτου γίνονται εμπόδιο, περιορίζοντας την ανάπτυξη της οικονομικής παραγωγής βιοαερίου (Choi *et al.*, 2020).

Μελέτες έχουν δείξει ότι η συν-πέψη του SMS με κοπριά γαλακτοφόρων ζώων (DM) μπορεί να βελτιώσει τη σταθερότητα της διεργασίας, να παρατείνει τον

κύκλο χώνευσης και να αυξήσει την παραγωγή βιοαερίου. Παράλληλα, αποτελεί έναν αποτελεσματικό τρόπο αποφυγής της ταχείας οξίνισης του υγρού χώνευσης και της αναστολής της μεθανοπαραγωγού μικροχλωρίδας. Κατά τη συν-πέψη, η αναλογία ανάμειξης του υποστρώματος είναι ένας κρίσιμος παράγοντας, ο οποίος θα αλλάξει τη φύση της διαδικασίας πέψης και θα επηρεάσει περαιτέρω την απόδοση βιοαερίου και τον ογκομετρικό ρυθμό απόδοσης βιοαερίου. Οι Luo *et al.* (2017) διερεύνησαν τη συνπέψη του SMS με κοπριά γαλακτοφόρων ζώων σε διαφορετικές αναλογίες ανάμειξης και το αποτέλεσμα έδειξε ότι η απόδοση μεθανίου από τα μείγματα ήταν 6-61% υψηλότερη σε σχέση με την παραγωγή όταν ως υπόστρωμα χρησιμοποιήθηκε μόνο του το SMS ή η κοπριά βοοειδών. Ανέφεραν, δε, ότι για το SMS, που προήλθε από καλλιέργεια του μύκητα *Flammulina velutipes*, η συν-πέψη σε αναλογία 1:1 DM/SMS, ήταν η βέλτιστη για παραγωγή βιοαερίου, ενώ στην περίπτωση του SMS από καλλιέργεια *Pleurotus eryngii*, η αναλογία 3:1 ήταν η αποδοτικότερη. Η συνολική περιεκτικότητα σε στερεά είναι επίσης ένας σημαντικός παράγοντας που επηρεάζει την παραγωγή βιοαερίου. Σε σύγκριση με το παραδοσιακό υγρό χώνευσης [ολικά στερεά από 0,5% έως 10%], η υψηλή περιεκτικότητα σε στερεά έχει πολλά πλεονεκτήματα, όπως χαμηλότερη εισροή ενέργειας, υψηλότερη ογκομετρική παραγωγή μεθανίου, ευκολότερο χειρισμό του χωνευτικού υγρού και λιγότερη χρήση νερού. Ωστόσο, εξακολουθούν να υπάρχουν ορισμένα προβλήματα, όπως η αργή ταχύτητα εκκίνησης και το ασταθές σύστημα ζύμωσης, επομένως απαιτείται περαιτέρω έρευνα (Brown *et al.*, 2012).

Στις περισσότερες περιπτώσεις, κάθε τύπος πρώτης ύλης δεν πληροί όλες τις προδιαγραφές, που απαιτούνται για τις διεργασίες αναερόβιας χώνευσης. Η αναερόβια συν-χώνευση του χρησιμοποιημένου υποστρώματος μανιταριών με διάφορες κοπριές ζώων αυξάνει την παραγωγή βιοαερίου σε αντίθεση με την αναερόβια χώνευση του SMS ή της κοπριάς ως μοναδικού υποστρώματος (Bisaria *et al.*, 1990; Nguyen & Klaus, 2012; Lin *et al.*, 2014; Zhu *et al.*, 2015; Luo *et al.*, 2018; Wang *et al.*, 2019; Shu *et al.*, 2022). Μεταξύ των διαφόρων κτηνοτροφικών αποβλήτων (κοπριά από γαλακτοφόρα ζώα - DM, κοπριά ορνιθοπαραγωγής - CM, κοπριά χοίρου - PM) που δοκιμάστηκαν, η αναλογία πτητικών στερεών SMS:CM = 1:2 έδωσε τα πιο αξιοσημείωτα αποτελέσματα, σε μια αναερόβια χώνευση διάρκειας 30 ημερών (Gao *et al.*, 2021).

2. Σκοπός της Μελέτης

Στην παρούσα μελέτη μελετήθηκαν τα βιομηχανικά απόβλητα (αναλωθέντα υποστρώματα) καλλιέργειας μανιταριών *Pleurotus ostreatus* καθώς και *Agaricus bisporus*, τα πιο ευρέως καταναλωθέντα μανιτάρια στην Ελλάδα, προκειμένου να διερευνηθεί η αξιοποίηση τους ως υποστρώματα αναερόβιας χώνευσης, ύστερα από χημική υδρόλυσή των. Αρχικά, το αναλωθέν υπόστρωμα υποβλήθηκε σε μηχανική προεπεξεργασία άλεσης και συλλέχθηκαν τα μικρά θρύμματα, οπότε και προσδιορίστηκε η σύσταση.

Στη συνέχεια, μελετήθηκαν δύο τύποι χημικής υδρόλυσης (αλκαλική και όξινη) σε διάφορους συνδυασμούς θερμοκρασίας, συγκέντρωσης χημικού παράγοντα και χρόνου εφαρμογής της υδρόλυσης, ως προς την απελευθέρωση σακχάρων από τη λιγνοκυτταρινούχα βιομάζα. Τέλος, το όξινο υδρόλυμα, με τα περισσότερα ελεύθερα σάκχαρα, όπως προέκυψε από τον κατάλληλο συνδυασμό όξινης χημικής και θερμικής υδρόλυσης, καθώς και το αντίστοιχο αλκαλικό υδρόλυμα μελετήθηκαν ως πιθανά υποστρώματα αναερόβιας χώνευσης και παραγωγής βιομεθανίου, σε αυτοσχέδιους χωνευτήρες και σε μεσόφιλες συνθήκες.

3. Υλικά και Μέθοδοι

Το πρώτο εκ των 2 αναλωθέντων υποστρωμάτων μανιταριών, που χρησιμοποιήθηκαν στη παρούσα μελέτη, παρασχέθηκε από μονάδα παραγωγής βρώσιμων μανιταριών (Green Zin A.E., Μαγνησία, Ελλάδα), μετά από τρεις συγκομιδές μανιταριών *Pleurotus ostreatus*, που καλλιεργήθηκαν σε πλαστικούς σάκους και αποτελούταν από άχυρο σίτου, εμπλουτισμένο με θειικό ασβέστιο, άλευρο βαμβακόσπορου και κοπριά κοτόπουλου. Το έτερο αναλωθέν υπόστρωμα, που μελετήσαμε, προήλθε από την ίδια μονάδα, ύστερα από τρεις συγκομιδές μανιταριών *Agaricus bisporus* και αποτελούταν από κομποστοποιημένη κοπριά αλόγου, εμπλουτισμένη με πτηνοτροφικά απόβλητα, γύψο και λοιπά υπολείμματα. Όσον αφορά στην προκατεργασία των υποστρωμάτων, ξηράθηκαν έως σταθερού βάρους, όπως περιγράφεται παρακάτω, στη συνέχεια αλέστηκαν χρησιμοποιώντας ένα μύλο υψηλής ταχύτητας, τα μικρά σωματίδια (<1 mm) κοσκινίστηκαν και συλλέχθηκαν για περαιτέρω επεξεργασία.

3.1 Προσδιορισμός της σύνθεσης του SMS

Η περιεκτικότητα σε ολικά στερεά (TS) υπολογίστηκε μέσω της μεθόδου ξήρανσης σε φούρνο. Συνοπτικά, το SMS ξηράθηκε στους 105 °C για 24 ώρες, ώστε να επιτευχθεί σταθερότητα βάρους και η περιεκτικότητα σε στερεά (g/100 g νεπού SMS - NS) υπολογίστηκε με τον παρακάτω τύπο:

$$TS \text{ (g/100 g NS)} = \text{δείγμα μετά τη ξήρανση (g)} \frac{\text{δείγμα πριν τη ξήρανση (g)}}{\text{δείγμα μετά τη ξήρανση (g)}} \times 100.$$

Αντίστροφα, η περιεκτικότητα σε υγρασία (σε g/100 g NS) δείγμα πριν τη ξήρανση (g) αντιστοιχεί την ποσότητα νερού που εξατμίστηκε στη συγκεκριμένη θερμοκρασία (Sluiter *et al.*, 2008^a). Μετά την καύση στους 575 °C για 6 ώρες, το λεγόμενο ανόργανο υπόλειμμα, γνωστό ως τέφρα, υπολογίστηκε ως εξής: τέφρα (σε g/100 g ξηρού SMS - ΞS) ισούται με το πηλίκο του δείγματος μετά την αποτέφρωση (g) προς το δείγμα μετά την ξήρανση (g) επί 100 (Sluiter *et al.*, 2005), με τα πτητικά στερεά (VS, g/100 g ΞS) να είναι το κλάσμα, που απομένει. Το ολικό άζωτο (TKN, g/100 g ΞS) προσδιορίστηκε σε μονάδα απόσταξης Kjeltex™ 8100 (Foss A/S, Hillerød, Denmark) με τη μέθοδο Kjeldahl (ISO 8968-1, 2001). Η περιεκτικότητα σε πρωτεΐνες υπολογίστηκε στη συνέχεια με τον τύπο: ολική πρωτεΐνη (g/100 g ΞS) = TKN (g/100

g ΞS) * 6,25. Ο συντελεστής πολλαπλασιασμού υπολογίζεται με την παραδοχή ότι τα μόρια των πρωτεϊνών περιέχουν κατά μέσο όρο 16% άζωτο.

Το αποξηραμένο και αλεσμένο SMS παρέμεινε σε νερό για 3 ώρες για την ανάκτηση ελεύθερων σακχάρων. Η μέθοδος του 3,5-δινιτροσαλικυλικό οξύ (DNS), όπως περιγράφηκε από τον Sumner (1921), χρησιμοποιήθηκε για τον προσδιορισμό της συγκέντρωσης των ολικών αναγωγικών σακχάρων και την έκφρασή της ως ισοδύναμα γλυκόζης (g/100 g ΞS).

Η διαδικασία εκχύλισης των λιπόφιλων ενώσεων πραγματοποιήθηκε σύμφωνα με τις οδηγίες των Sluiter *et al.* (2008^b). Προκειμένου να ξεκινήσει η διαδικασία εκχύλισης, ένα προζυγισμένο δείγμα του αποξηραμένου και αλεσμένου SMS τοποθετήθηκε σε βαμβακερό περιέκτη (cotton thimble) και σφραγίστηκε, προστέθηκαν 190 mL εξανίου (κατάλληλος διαλύτης για την εκχύλιση λιπόφιλων μορίων) και στη συνέχεια μεταφέρθηκαν στη συσκευή Soxhlet. Η θερμοκρασία του θερμαντικού μανδύα ήταν ρυθμισμένη κατάλληλα, ούτως ώστε να επιτυγχάνονται 4-5 σιφωνισμοί ανά ώρα, με την εκχύλιση να διαρκεί περί τις 24 ώρες. Στη συνέχεια, το εκχύλισμα εξατμίστηκε με τη χρήση περιστροφικού εξατμιστήρα κενού (Flash Evaporator/Rotavapor R-114, BÜCHI Labortechnik AG, St. Gallen, Switzerland) και το υπόλειμμα ζυγίστηκε. Ο τύπος που χρησιμοποιήθηκε για τον προσδιορισμό της περιεκτικότητας σε λιπόφιλες ενώσεις (g/100 g ΞS) ήταν:

$$\text{μάζα} \frac{\text{υπολείμματος (g)}}{\text{μάζα δείγματος (g)}} \times 100.$$

Η περιεκτικότητα σε ολική λιγνίνη και δομικούς υδατάνθρακες προσδιορίστηκε σύμφωνα με τους Sluiter *et al.* (2012). Η εκχύλιση Soxhlet με χρήση νερού και αιθανόλης ως διαλυτών πραγματοποιήθηκε πριν από τον προσδιορισμό, επειδή η μέθοδος απαιτεί δείγμα απαλλαγμένο από εκχυλίσματα (υδρόφιλα και λιπόφιλα μόρια, αντίστοιχα). Τα αποξηραμένα υπολείμματα υποβλήθηκαν στη συνέχεια σε διεργασία όξινης υδρόλυσης δύο σταδίων. Τα δείγματα τοποθετήθηκαν σε φιάλες αναεροβίωσης, προστέθηκαν 3 mL H₂SO₄ 72% (v/v) και αναδεύτηκαν για 1 ώρα στους 30 °C με χρήση μαγνητικού αναδευτήρα. Στη συνέχεια, σε κάθε δείγμα προστέθηκε απιονισμένο H₂O προς αραιώση του διαλύματος H₂SO₄ έως τελικής συγκέντρωσης 4% (v/v). Τα σφραγισμένα φιαλίδια θερμάνθηκαν, εν συνεχεία, σε αυτόκαυστο, στους 121 °C για 60 λεπτά κατά το δεύτερο στάδιο της υδρόλυσης. Για

τον προσδιορισμό του ποσοστού των σακχάρων, που χάθηκαν κατά την όξινη υδρόλυση, η πλήρης διαδικασία διεξήχθη επίσης για ένα διάλυμα με γνωστή συγκέντρωση σακχάρων για να υπολογιστεί το ποσοστό απώλειας σακχάρων κατά τη διάρκεια της όξινης χημικής υδρόλυσης (Sugar Recovery Standards-SRS). Τα δείγματα διηθήθηκαν υπό κενό με τη χρήση προζυγισμένων φίλτρων υαλοίνων, όταν ολοκληρώθηκε η διαδικασία. Τα φίλτρα με το στερεό κατακράτημα τοποθετήθηκαν σε πορσελάνινες κάπουλες, που είχαν ζυγιστεί εκ των προτέρων και ξηράθηκαν στους 80 °C για 24 ώρες, μέχρι σταθερού βάρους. Στη συνέχεια τα δείγματα θερμάνθηκαν στους 560 °C για 4 ώρες στο φούρνο. Η διαφορά μεταξύ των δύο τιμών, που προέκυψαν από την ξήρανση (80 °C) και την αποτέφρωση (560 °C), χρησιμοποιήθηκε για τον ποσοτικό προσδιορισμό της αδιάλυτης στα οξέα λιγνίνης (AIL, g/100 g ΞS). Η περιεκτικότητα σε διαλυτή λιγνίνη (ASL, g/100 g ΞS) μετρήθηκε φωτομετρικά με φασματοσκοπία UV-Vis (Jasco V-530) στα 320 nm από το υγρό κλάσμα, που απομονώθηκε κατά τη διήθηση υπό κενό. Τα δύο επιμέρους κλάσματα προστέθηκαν για τον προσδιορισμό της ολικής λιγνίνης (g/100 g ΞS).

Οι δομικοί υδατάνθρακες του δείγματος προσδιορίστηκαν ποσοτικά και ποιοτικά με υγρή χρωματογραφία υψηλής απόδοσης (HPLC), στήλη Shodex SP0810 σε θερμοκρασία 60 °C, ρυθμό ροής 0,6 mL/min και υπερκαθαρό νερό ως κινητή φάση. Με την προσθήκη CaCO₃, το pH κάθε δείγματος ρυθμίστηκε σε ένα εύρος 5,0 έως 5,5, το οποίο είναι κατάλληλο pH για την αποφυγή της καθίζησης των σακχάρων. Τα δείγματα υποβλήθηκαν σε φυγοκέντρηση στις 9000 rpm για 10 λεπτά στους 4 °C, διήθηση του υπερκείμενου (φίλτρο διαμέτρου πόρου 0,02 μm) και ανάλυση των σακχάρων με HPLC. Η συγκέντρωση του πρότυπου διαλύματος σακχάρου (SSSC), που μετράται με HPLC, πριν και μετά την επεξεργασία σε αυτόκαυστο, χρησιμοποιείται για τον υπολογισμό του ποσοστού ανάκτησης σακχάρου (SRR), το οποίο ορίζεται ως το πηλίκο της συγκέντρωσης του SSSC μετά την επεξεργασία (g/L)

$$\text{SRR} = \frac{\text{SSSC μετά επεξεργασίας}(\text{g/L})}{\text{SSSC προ επεξεργασίας}(\text{g/L})}$$

Ο τύπος, που χρησιμοποιήθηκε για τον προσδιορισμό της πραγματικής συγκέντρωσης κάθε σακχάρου στο δείγμα ήταν:

$$\text{πραγματική συγκέντρωση σακχάρων (g/L)} = \frac{\text{Παρατηρούμενη συγκέντρωση σακχάρων (g)} \cdot SRR}{L}$$

Απαραίτητη είναι, επιπρόσθετα, η εφαρμογή ενός διορθωτικού συντελεστή για να ληφθεί υπόψη η απώλεια ενός μορίου νερού, που προκύπτει από τη δημιουργία γλυκοζιτικών δεσμών κατά τον υπολογισμό της αρχικής (πριν την υδρόλυση) συγκέντρωσης των πολυμερών των υδατανθράκων. Με βάση τα μοριακά βάρη, για τις πεντόζες (ξυλόζη, αραβινόζη) ο συντελεστής ήταν ίσος με 0,88 [(MB πεντόζης-MB H₂O)/(MB πεντόζης)=132/150], ενώ για τις εξόζες (γλυκόζη, γαλακτόζη, μαννόζη) ήταν ίσος με 0,90 [(MB εξόζης-MB H₂O)/(MB εξόζης)=162/180. Η συγκέντρωση κάθε πολυσακχαρίτη (κυτταρίνη, ημικυτταρίνη, σε g/100 g ΞS) υπολογίστηκε χρησιμοποιώντας αυτούς τους διορθωτικούς συντελεστές ως το γινόμενο της συγκέντρωσης των αντίστοιχων μονομερών με τον διορθωτικό συντελεστή. Με βάση την συγκέντρωση της γλυκόζης, υπολογίστηκε η ποσότητα της κυτταρίνης (σε g/100 g ΞS), εκφρασμένη σε ισοδύναμα γλυκάνης, ενώ η ποσότητα της ημικυτταρίνης (σε g/100 g ΞS), προσδιορίστηκε εκφρασμένη στην περίπτωση αυτή σε ισοδύναμα ξυλάνης, δεδομένου ότι η ξυλόζη ήταν η μόνη πεντόζη που βρέθηκε.

3.2 Διαδικασία υδρόλυσης του SMS

Τα προς υδρόλυση εναιωρήματα περιείχαν 75 g/L SMS σε dH₂O (7,5% w/v) ή 15 g SMS σε 200 mL συνολικού όγκου (σε μπουκάλες από βοριοπυριτικό γυαλί), τα οποία στη συνέχεια του κειμένου θα αναφέρονται ως εναιώρημα SMS (E-SMS). Το σύνολο των υδρολύσεων περιελάμβανε επεξεργασία με ή χωρίς ανάδευση ή/και θέρμανση (85 °C ή 100 °C), ακολουθούμενη από την προσθήκη χημικού παράγοντα (H₂SO₄ 2% v/v για όξινη υδρόλυση ή NaOH 2% w/v για αλκαλική υδρόλυση). Εξετάστηκαν, συγκεκριμένα, οι ακόλουθες περιπτώσεις: E-SMS + θέρμανση (85 °C), E-SMS + H₂SO₄, E-SMS + θέρμανση (100 °C) + H₂SO₄, E-SMS + ανάδευση + NaOH και E-SMS + θέρμανση (85 °C) + NaOH. Οι διαδικασίες διήρκησαν τρεις ώρες και η δειγματοληψία γινόταν κάθε μία ώρα για την παρακολούθηση της προόδου υδρόλυσης μέσω προσδιορισμού της συγκέντρωσης των ελεύθερων αναγωγικών σακχάρων (g/L), χρησιμοποιώντας τη μέθοδο DNS. Η απόδοση της υδρόλυσης (AY, %) υπολογίστηκε ως το πηλίκο των απελευθερωμένων αναγωγικών σακχάρων (ολικά αναγωγικά σάκχαρα - ελεύθερα σάκχαρα, σε g/100 g ΞS) προς το άθροισμα των περιεκτικότητων κυτταρίνης και ημικυτταρίνης, σύμφωνα με την εξίσωση

$$AY (\%) = \frac{\text{Απελευθερωμένα αναγωγικά σάκχαρα (g/100g ΞS)}}{\text{κυτταρίνη + ημικυτταρίνη (g/100g ΞS)}} \times 100.$$

3.3 Βελτιστοποίηση της χημικής υδρόλυσης μέσω υδροθερμικής επεξεργασίας

Ο όρος ‘υδροθερμική επεξεργασία’ αναφέρεται σε μια θερμοχημική διαδικασία, κατά την οποία χρησιμοποιείται νερό υπό συνθήκες υψηλής πίεσης και θερμοκρασίας για να προκαλέσει την αποσύνθεση ανθρακούχων υλικών, όπως η λιγνοκυτταρινούχα βιομάζα (Yuliansyah & Hirajima, 2012; Ahmed *et al.*, 2019). Η διαδικασία στην παρούσα έρευνα περιλαμβάνει τη θέρμανση του δείγματος για μία ώρα σε αυτόκαυστο σε υψηλή πίεση (316,3 kPa ή 475,8 kPa) και θερμοκρασία (140 °C ή 150 °C, αντίστοιχα). Η τρέχουσα υδρολυτική διαδικασία περιελάμβανε την εφαρμογή της έντονης θερμικής επεξεργασίας, είτε μόνη της είτε σε συνδυασμό με χημική επεξεργασία, για να προκληθεί ευρύτερη διάσπαση του πολυμερούς και επακόλουθη αύξηση της συγκέντρωσης των ελεύθερων σακχάρων. Αξιολογήθηκε, επίσης, η επίδραση διαφόρων συγκεντρώσεων χημικών αντιδραστηρίων, όπως H₂SO₄

(0,1%, 0,2%, 0,3%, 0,4%, 0,5%, 1%, 2%, v/v) και NaOH (1%, 2%, w/v), οπότε και ερευνήθηκαν οι ακόλουθες περιπτώσεις υδροθερμικής επεξεργασίας: E-SMS + H₂SO₄ (όλες οι προαναφερθείσες συγκεντρώσεις δοκιμάστηκαν στους 140 °C και 150 °C), ESMS + NaOH (και οι δύο προαναφερθείσες συγκεντρώσεις δοκιμάστηκαν στους 140 °C και 150 °C), και η ανάλυση DNS χρησιμοποιήθηκε για τον προσδιορισμό της συγκέντρωσης των ελεύθερων αναγωγικών σακχάρων. Η απόδοση της υδρόλυσης (AY, %) υπολογίστηκε και σε αυτή την περίπτωση.

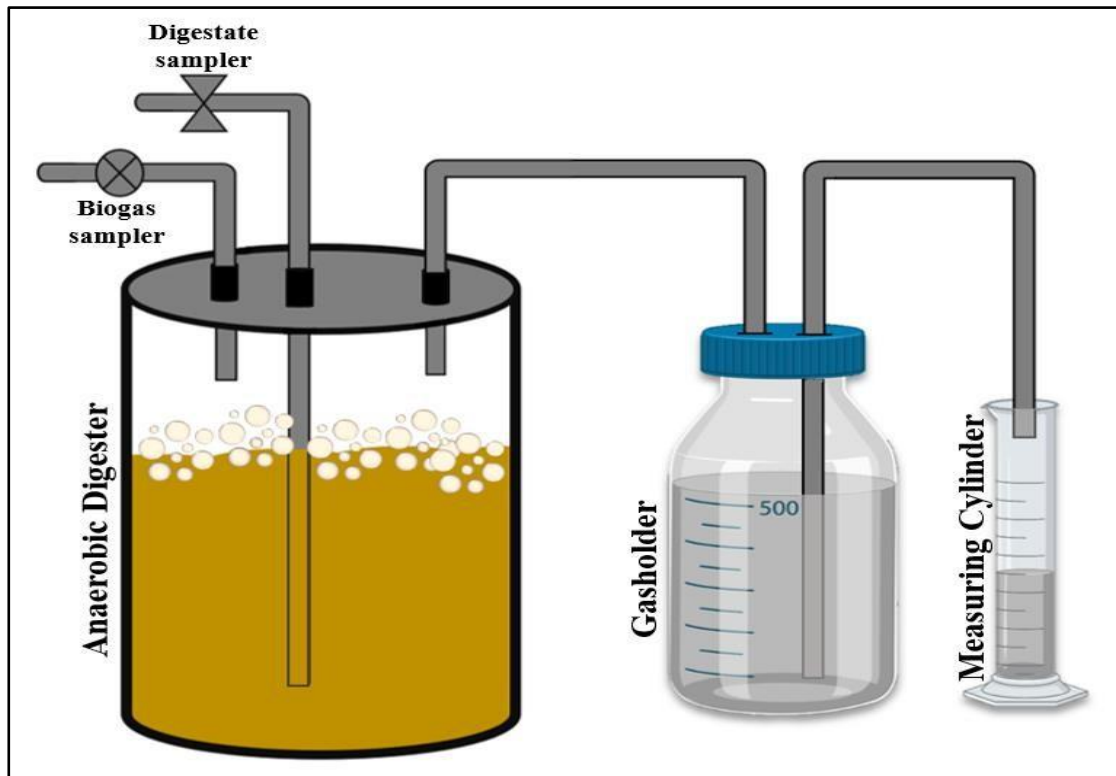
3.4 Αναερόβια χώνευση του υδρολυμένου SMS

Σε αυτοσχέδιους χωνευτήρες, το όξινο υδρόλυμα, που προήλθε από την πιο αποτελεσματική υδρολυτική επεξεργασία (0,4% H₂SO₄ + θέρμανση στους 150 °C) και το αλκαλικό υδρόλυμα (2% NaOH + θέρμανση στους 150 °C) αξιολογήθηκαν ως πιθανά υποστρώματα για αναερόβια χώνευση (σε μπουκάλες από βοριοπυριτικό γυαλί). Το εμβόλιο καταλάμβανε το 50% v/v (450 mL) του ενεργού όγκου, ο οποίος ορίστηκε στο 90% του συνολικού όγκου, και το υδρόλυμα κάλυπτε τον υπόλοιπο όγκο. Το αρχικό pH ρυθμίστηκε στο 7,6 και η περιεκτικότητα του μείγματος σε πτητικά στερεά ορίστηκε στο 2,5%. Επιπλέον, τα VS που προέρχονταν από το υπόστρωμα ήταν διπλάσια από αυτά του εμβολίου (VS_{υποστρώματος}:VS_{εμβολίου} 2:1). Για 15 ημέρες, οι αναερόβιοι χωνευτήρες διατηρήθηκαν σε θαλάμους υπό μεσόφιλες συνθήκες σε σταθερή θερμοκρασία 37±2 °C.

Στην περίπτωση της όξινης υδρόλυσης, το εναιώρημα αραιώθηκε κατάλληλα (από 6% αρχική συγκέντρωση VS σε 3,33% τελική συγκέντρωση, με την προσθήκη 200 mL dH₂O) και χρησιμοποιήθηκε ως πρώτη ύλη της χώνευσης μετά την εξουδετέρωση της τιμής του pH με υδροξείδιο του νατρίου. Το εναιώρημα περιείχε τόσο τα στερεά υπολείμματα SMS της υδρόλυσης όσο και τα ελεύθερα αναγωγικά σάκχαρα (συγκέντρωση 26,9 g/L, προερχόμενα από υδρόλυση 18,75 g αποξηραμένου και αλεσμένου SMS σε 250 mL dH₂O, TS =7,5%, VS =6%). Όσον αφορά το αλκαλικό υδρόλυμα, το εναιώρημα, που έμοιαζε με πολτό-πούλπα (18,75 g ξηρού, αλεσμένου SMS σε 250 mL dH₂O, TS = 7,5%, VS = 6%) αραιώθηκε επίσης με τον ίδιο τρόπο όπως και το προηγούμενο και χρησιμοποιήθηκε ως πρώτη ύλη της χώνευσης, μετά την εξουδετέρωση του pH με υδροχλωρικό οξύ. Ως εμβόλιο

χρησιμοποιήθηκε υγρό αναερόβιας χώνευσης κοπριάς βοοειδών, που παραχωρήθηκε από γειτονική μονάδα βιοαερίου. Δεδομένου ότι το εμβόλιο είχε τα ακόλουθα χαρακτηριστικά: pH =8, TS =3,15% w/v και VS =2,1% w/v, αραιώθηκε επιπλέον (από 2,1% αρχική συγκέντρωση VS σε 1,67% τελική συγκέντρωση), ρυθμίζοντας κατάλληλα την περιεκτικότητα σε VS, ούτως ώστε να πληροί τις πειραματικές προδιαγραφές, όπως καθορίστηκαν προηγουμένως.

Όπως παρουσιάζεται στην Εικόνα 6, ο μικρής κλίμακας αυτοσχέδιος χωνευτήρας βιοαερίου είχε τρεις εξόδους: μία για τη δειγματοληψία χωνεμένου υπολείμματος, μία για τη δειγματοληψία αερίου και μία για τη συλλογή και μέτρηση όλου του παραγόμενου βιοαερίου. Δείγματα του χωνεμένου υπολείμματος και του βιοαερίου λαμβάνονταν μία φορά κάθε τρεις ημέρες. Το χωνεμένο απόβλητο υποβλήθηκε σε ανάλυση για τον προσδιορισμό της συγκέντρωσης πτητικών στερεών και την τιμή του pH με τη χρήση μετρητή pH/mV (HI 8014-Hanna Instruments). Η περιεκτικότητα σε μεθάνιο (MC,%) των δειγμάτων βιοαερίου, τα οποία περιείχαν CH₄, CO₂ και άλλα αέρια σε ίχνη, όπως H₂, H₂S, N₂ και CO (περιεκτικότητα σε ίχνη 1-5%, Chen *et al.*, 2015), μετρήθηκε έμμεσα με τη χρήση μιας ελαφρώς τροποποιημένης ανάλυσης υδροξειδίου του καλίου (Abdel-Hadi, 2008). Εν συντομία, μέσω μιας σύριγγας, που προσαρμόστηκε στο σωλήνα εισόδου του άνω μέρους φιάλης, ένας συγκεκριμένος όγκος βιοαερίου (όγκος A), που ελήφθη από το χωνευτήρα, εγχύθηκε σε αεροστεγή φιάλη από βοριοπυριτικό γυαλί (Εικόνα 7), που περιείχε κορεσμένο διάλυμα KOH. Το CO₂ του βιοαερίου, το οποίο αντιδρά με το υδροξείδιο του καλίου και παράγει διαλυτό ανθρακικό κάλιο (K₂CO₃) παραμένει στο δοχείο, ενώ το υπόλοιπο αέριο, κυρίως μεθάνιο, αποστέλλεται στον σωλήνα εξόδου, όπου είναι εγκατεστημένη μια γυάλινη σύριγγα. Ο υπολειπόμενος όγκος βιοαερίου (Όγκος B) φαίνεται από τη μετατόπιση του εμβόλου λόγω της πίεσης του εξερχόμενου αερίου και οι περιεκτικότητες σε CO₂ και CH₄ υπολογίζονται ως εξής: CO₂ (%) = [όγκος A (mL)- όγκος B (mL)]/[όγκος A (mL)] x 100, ενώ το CH₄ (%) = 100% - (%CO₂ + 3% άλλα αέρια) (Abdel-Hadi, 2008).



Εικόνα 6. Αναπαράσταση των αυτοσχέδιων χωνευτήρων κλίμακας, οι οποίοι χρησιμοποιήθηκαν για την αναερόβια χώνευση του υδρολύματος SMS.



Εικόνα 7. Κορεσμένο διάλυμα καυστικού καλίου, προς προσδιορισμό της περιεκτικότητας του βιοαερίου σε μεθάνιο και διοξείδιο του άνθρακα (Εργαστήριο Μικροβιολογία και Βιοτεχνολογίας Τροφίμων, Γεωπονικό Πανεπιστήμιο Αθηνών).

Το απελευθερωθέν αέριο συλλέχθηκε σε μια 2^η φιάλη από βοριοπυριτικό γυαλί (Εικόνα 6), η οποία εμπεριείχε όξινο κορεσμένο διάλυμα χλωριούχου νατρίου, το οποίο, σύμφωνα με τους Walker *et al.*, (2009) θεωρείται το ιδανικότερο διάλυμα, ούτως ώστε να αποφευχθεί η διαλυτοποίηση του CO₂ στο νερό, όσο και πιθανές απώλειες του παραγόμενου βιοαερίου. Η ποσοτικοποίηση του βιοαερίου (σε mL) πραγματοποιήθηκε μέσω της μεθόδου μετατόπισης υγρού, όπως αυτή περιγράφηκε από τους Selvankumar *et al.* (2017). Συγκεκριμένα, η πίεση, που αναπτυσσόταν στο συλλέκτη αερίου αυξανόταν σταθερά λόγω της συνεχούς χώνευσης και της συλλογής βιοαερίου, οπότε το αέριο πίεζε το όξινο υγρό, το οποίο διέφευγε από το σφραγισμένο δοχείο, μέσω ενός σωλήνα βυθισμένου στο υγρό αυτό, προς ανοικτό επικοινωνούντα ογκομετρικό κύλινδρο. Μια φορά την ημέρα μετρούταν ο όγκος του υγρού, που εκτοπίζονταν και θεωρήθηκε ίσος με τον συνολικό όγκο του βιοαερίου, που απελευθερώθηκε, εκφρασμένο σε mL ανά ημέρα (mL/day).

4. Αποτελέσματα – Συζήτηση

4.1 Σύσταση SMS

Από τα 2 αναλωθέντα υποστρώματα, τα οποία μελετήσαμε, στα πλαίσια της συγκεκριμένης μελέτης, μόνο το SMS από την καλλιέργεια των μανιταριών του είδους *Pleurotus ostreatus* ήταν πλούσιο σε κυτταρίνη και μελετήθηκε διεξοδικώς ως προς τη σύστασή του, την υδρόλυσή του και την προοπτική αξιοποίησής του ως υπόστρωμα αναερόβιας χώνευσης και παραγωγής βιοαερίου. Το SMS, που προήλθε από την καλλιέργεια των μανιταριών του είδους *Agaricus bisporus* ήταν ήδη εξαντλημένο από την ανάπτυξη των μανιταριών, με αποτέλεσμα να μην εμπεριέχει αξιόλογη ποσότητα υδατανθράκων (<2 g/L ολικά αναγωγικά σάκχαρα), οπότε και δεν μελετήθηκε περαιτέρω.

Η συγκέντρωση ολικών στερεών του SMS από καλλιέργεια *Pleurotus ostreatus*, όπως αυτό παραλήφθηκε από τη μονάδα παραγωγής μανιταριών, ήταν 54,7 g ανά 100 g νωπού SMS. Η συγκέντρωση πτητικών στερεών ήταν 80,15 g/100 g ΞS και στον Πίνακα 2 παρουσιάζονται οι περιεκτικότητες των επιμέρους συστατικών. Οι συγκεντρώσεις κυτταρίνης και ημικυτταρίνης ήταν 32,18 και 10,45 g/100 g ΞS, αντίστοιχα (42,63 g ολοκυτταρίνης ανά 100 g ξηρού SMS). Οι συγκεντρώσεις αυτές έχουν ιδιαίτερη σημασία, δεδομένου ότι η υδρόλυση αυτών των πολυμερών οδηγεί σε απελευθέρωση μονοσακχαριτών, που αφομοιώνονται από τα μικρόβια κατά τη διάρκεια της αναερόβιας χώνευσης.

Πίνακας 2. Σύσταση του αποξηραμένου SMS.

Στοιχεία	Περιεχόμενο (g/100 g ΞS)
Ελεύθερα σάκχαρα	4,09
Συνολική πρωτεΐνη	5,21
Λιπόφιλες ενώσεις	14,46
Συνολική λιγνίνη	13,77
Κυτταρίνη	32,18
Ημικυτταρίνη	10,45
Τέφρα	19,85

Με βάση τη σύσταση, διαπιστώνουμε ότι η περιεκτικότητα του SMS σε κυτταρίνη είναι περίπου η ίδια και η περιεκτικότητα σε ημικυτταρίνη είναι ελαφρώς χαμηλότερη στην παρούσα εργασία, συγκρινόμενη με αντίστοιχα δεδομένα από τη βιβλιογραφία (Kwak *et al.*, 2008; Qiao *et al.*, 2011; Wu *et al.*, 2013; Xiao *et al.*, 2017; Kumar *et al.*, 2021), οπότε το συγκεκριμένο SMS διαθέτει πολυμερή πολυσακχαριδικής φύσεως για περαιτέρω υδρόλυση.

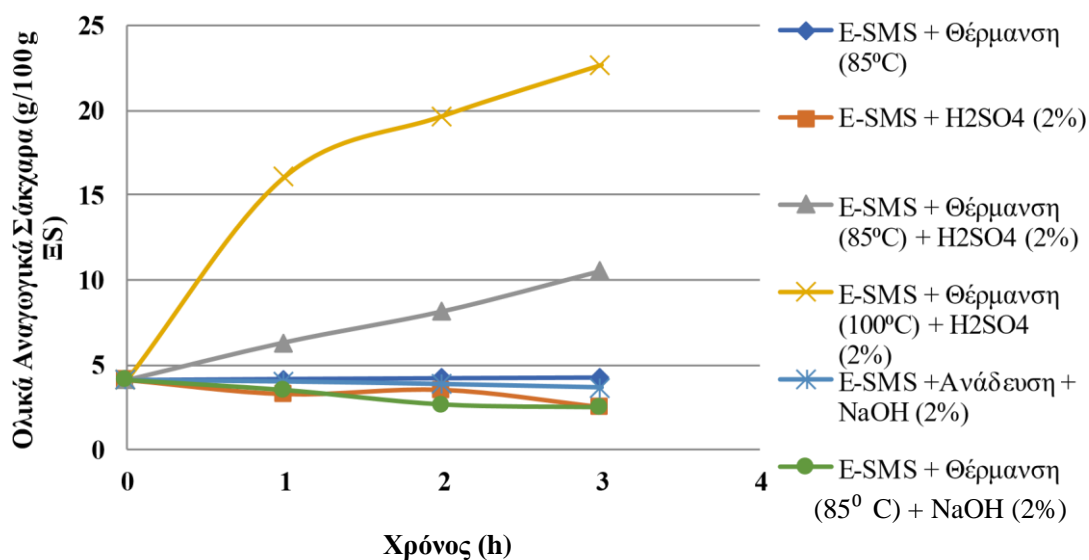
4.2 Υδρόλυση του SMS

Για την υδρολυτική διάσπαση των δομικών υδατανθράκων (κυτταρίνη, ημικυτταρίνη) και την απελευθέρωση μονοσακχαριτών εξετάστηκε η εφαρμογή όξινης και αλκαλικής χημικής υδρόλυσης σε συνδυασμό με θερμική επεξεργασία. Στον Πίνακα 3 συνοψίζονται τα αποτελέσματα της υδρόλυσης, με τα απελευθερωμένα αναγωγικά σάκχαρα (g/100 g ΞS) να προκύπτουν ως η διαφορά των ελεύθερων αναγωγικών σακχάρων, που υπήρχαν εξ αρχής στο SMS (βλέπε Πίνακα 2) από τα συνολικά αναγωγικά σάκχαρα του υδρολύματος, ενώ η απόδοση υδρόλυσης (%) ως το πηλίκο των απελευθερωμένων αναγωγικών σακχάρων προς την περιεκτικότητα σε ολοκυτταρίνη και στο Γράφημα 1 παρουσιάζεται η εξέλιξη της απελευθέρωσης των σακχάρων, που προκαλούν οι υδρολυτικές διαδικασίες.

Πίνακας 3. Ποσοτικά δεδομένα από διάφορους συνδυασμούς θερμικής ή/και χημικής υδρόλυσης του SMS.

Επεξεργασία	Ολικά αναγωγικά σάκχαρα (g/100 g ΞS)	Απελευθερωμένα αναγωγικά σάκχαρα (g/100 g ΞS)	Απόδοση υδρόλυσης (%)
E-SMS + Θέρμανση (85 °C)	4,24	0,15	0,4
E-SMS + H ₂ SO ₄ (2%)	2,49	-1,60	-3,8
E-SMS + Θέρμανση (85 °C) + H ₂ SO ₄ (2%)	10,53	6,44	15,1
E-SMS + Θέρμανση (100 °C) + H ₂ SO ₄ (2%)	22,67	18,58	43,6
E-SMS + Ανάδευση + NaOH (2%)	3,66	-0,43	-1,0
E-SMS + Θέρμανση (85 °C) + NaOH (2%)	2,49	-1,60	-3,8

Όταν εφαρμόστηκε αλκαλική επεξεργασία στα δείγματα (είτε συνοδευόμενη με θερμική επεξεργασία είτε όχι), τα ρεολογικά χαρακτηριστικά του εναιωρήματος άλλαξαν και άρχισε να μοιάζει με πολτό-πούλπα, αυξημένου ιξώδους. Το αποτέλεσμα αυτό είναι σύμφωνο με τη βιβλιογραφία, διότι η ήπια αλκαλική επεξεργασία εξαλείφει επιλεκτικά τη λιγνίνη αποικοδομώντας τις πλευρικές αλυσίδες των εστέρων και των γλυκοζιτών χωρίς να καταστρέφει την κυτταρίνη. Επίσης, αυξάνει την επιφάνεια και το πορώδες, γεγονός που καθιστά το υλικό πιο προσιτό στους μικροοργανισμούς (Kim *et al.*, 2016; Oriez *et al.*, 2020). Σύμφωνα με τους Loow *et al.* (2016) και τα ευρήματα των Shetty *et al.*, (2017), η ολική μείωση της ημικυτταρίνης προκύπτει από την εξάλειψη των ακετυλο- και ουρονικών οξέων κατά την αλκαλική υδρόλυση. Από την άλλη πλευρά, οι Wu *et al.* (2013) ανέφεραν ότι η χρήση διαλυμάτων υδροξειδίου του ασβεστίου ή του νατρίου δεν οδήγησε σε αύξηση της συγκέντρωσης των διαλυτών αναγωγικών σακχάρων κατά την αλκαλική υδρόλυση, κάτι το οποίο παρατηρήθηκε και στην παρούσα μελέτη. Μόνο η ενζυμική υδρόλυση (με τη χρήση ενζύμων, όπως οι κυτταρινάσες και οι ξυλανάσες) θα μπορούσε να αυξήσει την ποσότητα των απελευθερωμένων σακχάρων μετά από επεξεργασία με αλκαλικούς χημικούς παράγοντες (Zhu *et al.*, 2013). Οι αρνητικές τιμές υποδηλώνουν και τη μερική υποβάθμιση των ελεύθερων αναγωγικών σακχάρων λόγω της χημικής (και θερμικής) επεξεργασίας.

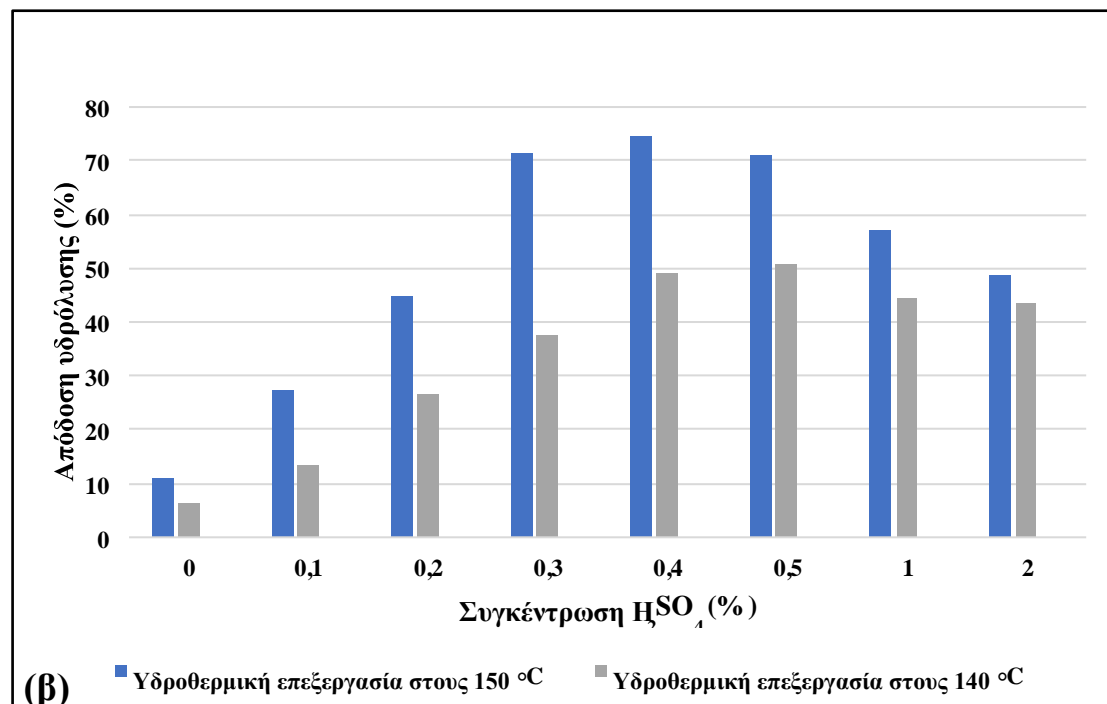
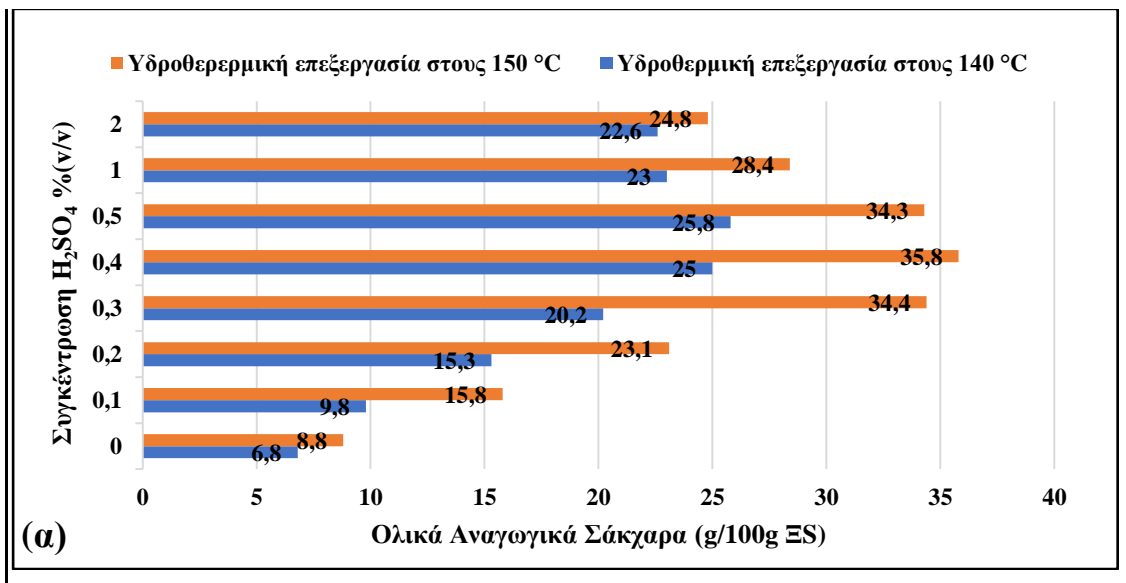


Γράφημα 1. Παρακολούθηση της προόδου της υδρόλυσης SMS, με προσδιορισμό της συγκέντρωσης των ολικών αναγωγικών σακχάρων, σε διαδικασίες διάρκειας 3 ωρών.

Μετά το πέρας των 3 ωρών θερμικής και όξινης χημικής υδρόλυσης, η υψηλότερη συγκέντρωση ολικών αναγωγικών σακχάρων (22,67 g/100 g ΞS, απόδοση υδρόλυσης =43,6%) προήλθε από τον συνδυασμό βρασμού (100 °C) και H₂SO₄ συγκέντρωσης 2% v/v. Από την άλλη πλευρά, όταν το SMS υποβλήθηκε σε επεξεργασία μόνο με θέρμανση, δεν απελευθερώθηκαν επιπλέον ελεύθερα σάκχαρα, ενώ η όξινη υδρόλυση χωρίς θερμική διεργασία παρουσίασε μείωση της συγκέντρωσης των ελεύθερων σακχάρων (σε κάθε περίπτωση έχει αφαιρεθεί η συγκέντρωση =4,09 g/L των ελεύθερων σακχάρων, που υπήρχαν ούτως ή άλλως στο SMS και δεν ήταν προϊόν υδρόλυσης). Αυτή η μείωση θα μπορούσε να οφείλεται στην αντίδραση των απελευθερωμένων αναγωγικών σακχάρων με τα αμινοσυστατικά του SMS με αποτέλεσμα να συμβαίνει μη-ενζυμική κασπάνωση, μια διεργασία ευρέως γνωστή ως αντίδραση Maillard, τελικά προϊόντα της οποίας είναι οι σκουρόχρωμες μελανοΐδινες, όπως η φουρφουράλη και η υδροξυ-μεθυλφουρφουράλη (HMF), οι οποίες είναι παράγωγα της αφυδάτωσης πεντοζών και εξοζών, αντίστοιχα (Li *et al.*, 2011; Shrotri *et al.*, 2017; Ahmed *et al.*, 2019). Οι Wu *et al.* (2013) διαπίστωσαν ότι η πιο αποτελεσματική υδρολυτική διαδικασία ήταν ο συνδυασμός όξινης επεξεργασίας και θερμικής διαδικασίας. Συγκεκριμένα, όταν χρησιμοποιήθηκεθειικό οξύ (2%) και η θερμοκρασία ήταν 121 °C, προσδιορίστηκαν 31,5 g αναγωγικών σακχάρων ανά 100 g ακατέργαστου SMS, υποδεικνύοντας ότι μια υψηλότερη θερμοκρασία θα μπορούσε να αυξήσει την αποτελεσματικότητα της υδρόλυσης, κάτι που υποστηρίζεται επίσης από τους Qiao *et al.* (2011).

Περαιτέρω έρευνα έγινε για τη βελτίωση της υδρόλυσης μέσω συνδυασμού της χημικής επεξεργασίας με υδροθερμική διεργασία σε ακόμη υψηλότερες θερμοκρασίες, ιδίως 140 ή 150 °C, εφόσον στο προηγούμενο στάδιο παρατηρήθηκε αύξηση της απόδοσης της χημικής υδρόλυσης του SMS με την αύξηση της θερμοκρασίας από 85 °C σε 100 °C. Στο Γράφημα 2^α παρουσιάζεται η συγκέντρωση των ολικών αναγωγικών σακχάρων μετά την όξινη χημική υδροθερμική επεξεργασία στις δύο εξεταζόμενες θερμοκρασίες. Σε σύγκριση με το αποτέλεσμα της όξινης χημικής θερμικής επεξεργασίας στους 100 °C, όπως παρατηρείται, η υδροθερμική επεξεργασία σε υψηλότερη θερμοκρασία και πίεση αύξησε τη συγκέντρωση των απελευθερωμένων αναγωγικών σακχάρων.

Ο συνδυασμός 0,4% H₂SO₄ και θέρμανση στους 150 °C οδήγησε στην υψηλότερη συγκέντρωση =35,8 g/100 g ΞS, ενώ η μέγιστη απόδοση υδρόλυσης κυτταρίνης και ημικυτταρίνης ήταν 74,5%, όπως φαίνεται στο Γράφημα 2^β. Λόγω του σχηματισμού φουρφουράλων και συναφών ενώσεων, οι οποίες έχουν ανασταλτική επίδραση στην ανάπτυξη των μικροοργανισμών, η έντονη υδροθερμική επεξεργασία (στους 140 ή 150 °C), σε συνδυασμό με τη δράση όξινου χημικού παράγοντα, σε συγκεντρώσεις υψηλότερες από 0,5%, είχε ως αποτέλεσμα τη μείωση των ελεύθερων αναγωγικών σακχάρων (Li *et al.*, 2011; Zhang *et al.*, 2011; Ahmed *et al.*, 2014; Zha *et al.*, 2014). Τα ρεολογικά χαρακτηριστικά του δείγματος μεταβλήθηκαν από την υδροθερμική διεργασία στους 140 °C ή 150 °C υπό την παρουσία αλκαλικού παράγοντα (NaOH 1% ή 2%, w/v), ενώ δεν παρατηρήθηκε ούτε στην περίπτωση αυτή απελευθέρωση αναγωγικών σακχάρων.

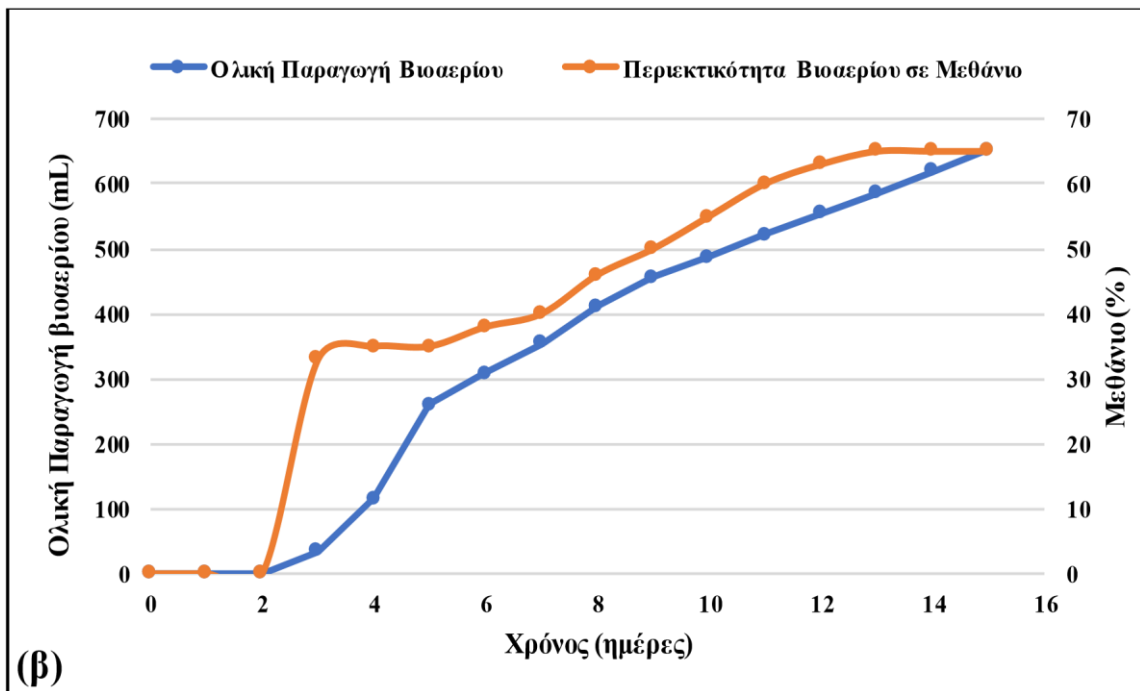
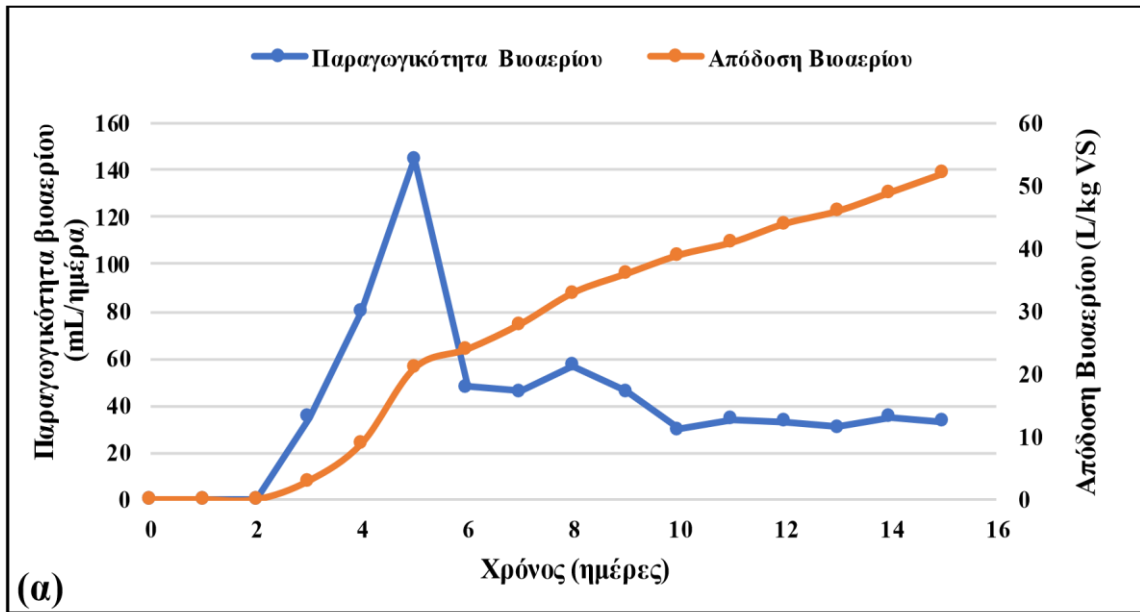


Γράφημα 2. (α) Γραφική αναπαράσταση Ολικών Αναγωγικών Σακχάρων (g/L), που προκύπτουν από τον υδρολυτικό συνδυασμό όξινης χημικής επεξεργασίας (με χρήση διαφόρων συγκεντρώσεων οξέος) και υδροθερμικής επεξεργασίας στους 140 ή 150 °C. (β) Γραφική αναπαράσταση της απόδοσης υδρόλυσης (%) όξινης χημικής επεξεργασίας (με χρήση διαφόρων συγκεντρώσεων οξέος), σε συνδυασμό με υδροθερμική επεξεργασία στους 140 ή 150 °C.

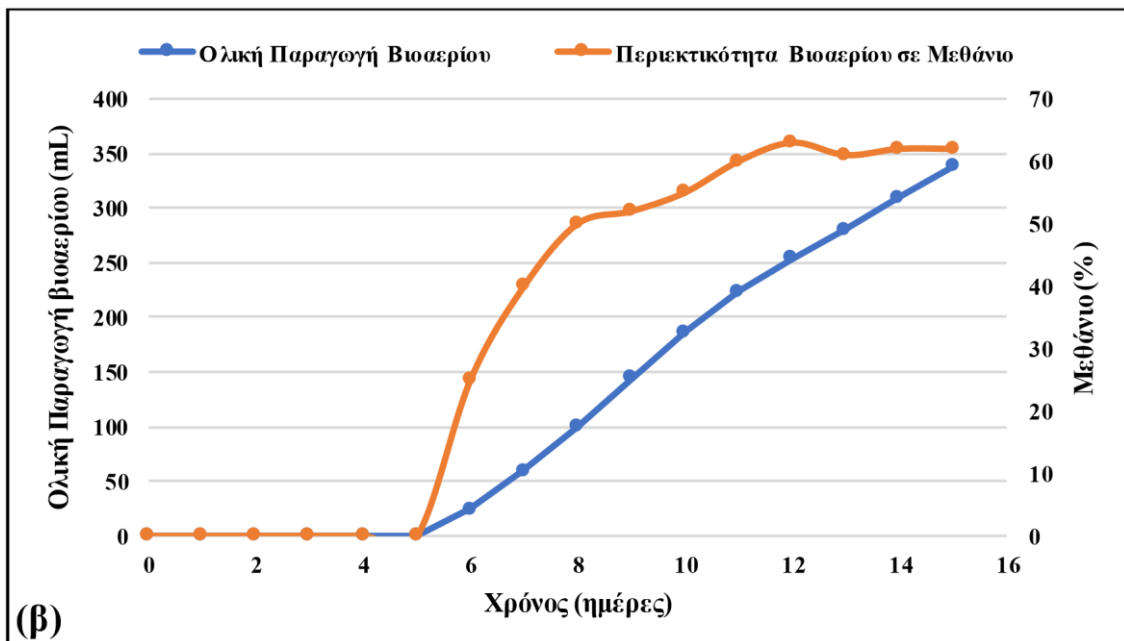
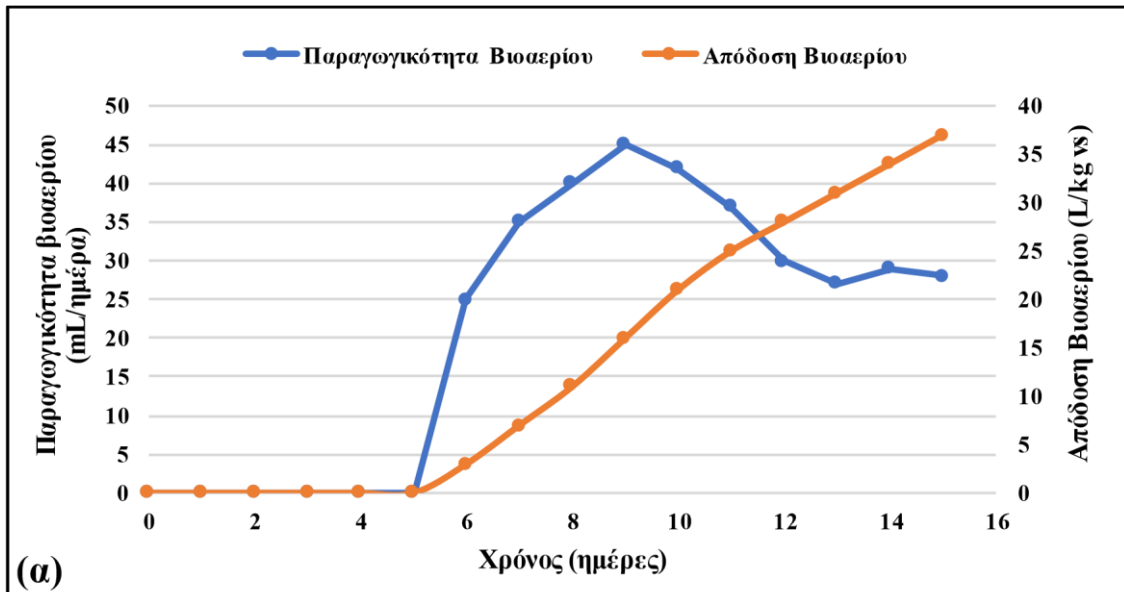
4.3 Παραγωγή βιοαερίου

Το υδρόλυμα, που προήλθε από την υδροθερμική επεξεργασία στους 150 °C και την όξινη χημική υδρόλυση με H₂SO₄ 0,4% v/v, συνδυασμός ο οποίος απέδωσε τη μέγιστη απόδοση υδρόλυσης, χρησιμοποιήθηκε ως πρώτη ύλη για την αναερόβια χώνευση. Αφού και τα δύο εναιωρήματα (υδρόλυμα και εμβόλιο) αραιώθηκαν κατάλληλα, όπως αναφέρθηκε προηγουμένως, το υπόστρωμα, το οποίο περιλάμβανε τόσο τα σάκχαρα όσο και τα στερεά υπολείμματα της υδρόλυσης του SMS, αναμίχθηκε με το εμβόλιο. Στα Γραφήματα 3^α και 3^β παρουσιάζεται η κινητική της αναερόβιας χώνευσης του όξινου υδρολύματος για διάστημα 15 ημερών. Μετά από δύο ημέρες προσαρμογής των μικροοργανισμών στις νέες αναερόβιες συνθήκες ανάπτυξης, άρχισε η παραγωγή βιοαερίου. Το εύρος του pH, το οποίο είναι ιδανικό για AX, διατηρήθηκε μεταξύ των τιμών 6,5 και 8,0. Μετά από 10 ημέρες, η παραγωγικότητα έφτασε σε σταθερή κατάσταση (περίπου 33 mL/ημέρα). Η συγκέντρωση πτητικών στερεών του μείγματος μειώθηκε κατά 1,4 μονάδες σε τελική περιεκτικότητα 1,1%. Κατά την ολοκλήρωση της χώνευσης, η μετατροπή των πτητικών στερεών σε βιοαέριο (απόδοση βιοαερίου) έφτασε στη μέγιστη τιμή της 52 L/kg VS αποδίδοντας 653 mL βιοαερίου, το οποίο εμπεριείχε 65% μεθάνιο μετά από 15 ημέρες χώνευσης.

Το αλκαλικό υδρόλυμα, που προήλθε από την επεξεργασία με NaOH 2% και υδροθερμική διαδικασία στους 150 °C, αραιώθηκε κατάλληλα και αναμίχθηκε με το εμβόλιο (αναλογία 1:1). Στα Γραφήματα 4^α και 4^β παρουσιάζεται η κινητική αυτής της χώνευσης. Σε αυτή την περίπτωση, η έκλυση βιοαερίου εκκίνησε 5 ημέρες μετά τον εμβολιασμό. Κατά τη διάρκεια της χώνευσης, το εύρος του pH διατηρήθηκε, επίσης, μεταξύ των τιμών 6,5 και 8,0. Στο τέλος της βιοδιεργασίας, η περιεκτικότητα του μίγματος σε πτητικά στερεά είχε μειωθεί κατά 0,9 μονάδες σε μια τελική τιμή 1,6%. Μετά από 12 ημέρες, η ημερήσια παραγωγικότητα σταθεροποιήθηκε (περίπου 29 mL/ημέρα), ενώ η τελική απόδοση βιοαερίου ήταν 37 L/kg VS και η συνολική παραγωγή βιοαερίου 338 mL, με περιεκτικότητα σε μεθάνιο περίπου 62%, ύστερα από 15 ημέρες χώνευσης.



Γράφημα 3. (α) Γραφική αναπαράσταση της παραγωγικότητας βιοαερίου (mL/ημέρα) και της απόδοσης βιοαερίου (L/kg VS), όπως προέκυψε από την αναερόβια χώνευση του όξινου υδρολύματος SMS. (β) Γραφική αναπαράσταση της ολικής παραγωγής βιοαερίου (mL) και της περιεκτικότητας του βιοαερίου σε CH₄, που προέκυψε από την αναερόβια χώνευση του όξινου υδρολύματος.



Γράφημα 4. (α) Γραφική αναπαράσταση της παραγωγικότητας βιοαερίου (mL/ημέρα) και της απόδοσης βιοαερίου (L/kg VS), όπως προέκυψε κατά την αναερόβια χώνευση του αλκαλικού υδρολύματος SMS. (β) Γραφική αναπαράσταση της ολικής παραγωγής βιοαερίου (mL) και της περιεκτικότητας του βιοαερίου σε CH₄, που προέκυψε από την αναερόβια χώνευση του αλκαλικού υδρολύματος.

Στις περισσότερες των περιπτώσεων, όπως έχει ήδη αναφερθεί, το είδος του υποστρώματος της χώνευσης δεν πληροί όλα τα κριτήρια, που απαιτούνται για τη διεργασία. Σε αντίθεση με την χώνευση του SMS ή της κοπριάς, ως ξεχωριστά υποστρώματα, η αναερόβια συν-χώνευση του αναλωθέντος υποστρώματος μανιταριών με διάφορες κοπριές ζώων αυξάνει την παραγωγή βιοαερίου (Bisaria *et al.*, 1990; Nguyen & Klaus, 2012; Luo *et al.*, 2018; Wang *et al.*, 2019; Gao *et al.*,

2021), ενώ έχει μελετηθεί, επίσης, η συν-χώνευση κοπριάς βοοειδών και SMS, εμπλουτισμένη και με άλλες πρώτες ύλες, όπως υγρά υπολείμματα βιομηχανιών καλαμποκιού και ζάχαρης (Zhu *et al.*, 2015; Kumar *et al.*, 2021). Τα αποτελέσματα της παρούσας μελέτης, κατά την οποία εξετάστηκε η συν-χώνευση χημικά και θερμικά προκατεργασμένου SMS με κοπριά γαλακτοπαραγωγών ζώων (DM) (αναλογία πτητικών στερεών SMS:DM =2:1), ήταν οριακά καλύτερα από εκείνα που ανέφεραν οι Gao *et al.* (2021), όταν χρησιμοποίησαν την ίδια αναλογία SMS προς DM (απόδοση βιοαερίου 29 L/kg VS, 35% περιεκτικότητα σε μεθάνιο). Αυτό πιθανότατα συνέβη επειδή δεν υπήρξε προηγούμενη υδρόλυση του SMS στα πειράματά τους. Οι μικροοργανισμοί, στην παρούσα μελέτη, κατά τη διάρκεια της χώνευσης του όξινου υδρολύματος αφομοίωσαν τους μονοσακχαρίτες (γλυκόζη, ξυλόζη κ.α.), που απελευθερώθηκαν ως προϊόντα της χημικής υδρόλυσης της ολοκυτταρίνης και η παραγωγή βιοαερίου δεν καθυστέρησε, όπως συνέβη κατά τη χώνευση του αλκαλικού υδρολύματος. Οι φουρφουράλες και οι HMF, ωστόσο, είναι παραπροϊόντα της όξινης υδρόλυσης, που χρησιμεύουν ως ενδιάμεσα προϊόντα στη σύνθεση αναστολέων της χώνευσης, όπως το λεβουλινικό, το φορμικό, το οξικό και διάφορα ουρονικά οξέα, τα οποία, όταν συσσωρεύονται σε μεγάλες ποσότητες, εμποδίζουν την παραγωγή βιοαερίου (Cheng & Brewer, 2021). Η αλκαλική υδρόλυση μπορεί να μην αύξησε τη συγκέντρωση των ελεύθερων σακχάρων, αλλά υποβοήθησε τη διάσπαση του λιγνοκυτταρινούχου πλέγματος, λόγω διαλυτοποίησης της λιγνίνης, όπως αναφέρουν και οι Oriez *et al.* (2020). Σε σύγκριση με το όξινο υδρόλυμα, το αλκαλικό υδρόλυμα κατά την αναερόβια χώνευση απαιτήσε περισσότερο χρόνο για τους μικροοργανισμούς να προσαρμοστούν και να αποικοδομήσουν τις μακρομοριακές πηγές άνθρακα, με αποτέλεσμα την καθυστέρηση της έναρξης έκλυσης βιοαερίου κατά αρκετές ημέρες. Η καθυστέρηση αυτή οφειλόταν κυρίως στην έλλειψη ελεύθερων σακχάρων στο υπόστρωμα. Στη μελέτη των Ikeda *et al.* (2019), εδείχθη ότι η χώνευση αλκαλικά προεπεξεργασμένου SMS (2% NaOH ή KOH και θέρμανση στους 80 °C για 30 λεπτά) οδήγησε σε μεγαλύτερη παραγωγή βιομεθανίου, σε σύγκριση με τα αποτελέσματα της παρούσας έρευνας. Σύμφωνα με τους Sambusiti *et al.*, (2012) μια ακόμα υψηλότερη συγκέντρωση υδροξειδίου του νατρίου (10% NaOH στους 40 °C για 24 ώρες) θα ήταν ικανή να αυξήσει την απόδοση βιοαερίου (2012).

Αντίθετα με τη συν-χώνευση κοπριάς βοοειδών και ακατέργαστου άχυρου σιταριού (χωρίς να έχουν αναπτυχθεί μύκητες στο άχυρο), η αναερόβια συν-χώνευση κοπριάς βοοειδών και SMS ενίσχυσε την παραγωγή βιοαερίου, αναδεικνύοντας τη σημασία των μυκήτων, που έχουν προηγουμένως καλλιεργηθεί στο άχυρο σίτου (Bisaria *et al.*, 1990). Οι Gao *et al.* (2021) διαπίστωσαν ότι οι αναλογίες πτητικών στερεών SMS:DM =1:1 ή =1:2 οδήγησαν σε αισθητά αυξημένη παραγωγή βιομεθανίου, με τη βιβλιογραφία να επιβεβαιώνει ότι η αύξηση της αναλογίας υποστρώματος προς κοπριά οδηγεί σε αποτυχία της διαδικασίας χώνευσης των λιγνοκυτταρούχων υλών (Nguyen & Klaus, 2012; Luo *et al.*, 2017. Σε αναερόβια χώνευση 30 ημερών με διαφόρων ειδών κοπριά κτηνοτροφικής προέλευσης (κοπριά γαλακτοπαραγωγών ζώων - DM, κοπριά πουλερικών - CM και κοπριάς χοίρων - PM), η αναλογία πτητικών στερεών SMS:CM =1:2 απέδωσε τα πιο υψηλά αποτελέσματα (απόδοση βιοαερίου =185 L/kg VS, 65% περιεκτικότητα μεθανίου) (Gao *et al.*, 2021). Σύμφωνα με τους Lin *et al.* (2014) και Luo *et al.* (2018), η αύξηση της περιεκτικότητας σε ολικά στερεά της χώνευσης και της αναλογίας πτητικών στερεών του SMS προς την κοπριά σε 1:9 οδηγεί σε αύξηση της απόδοσης βιοαερίου. Κατά συνέπεια, μια παρόμοια αναλογία θα μπορούσε επίσης να ενισχύσει την παραγωγή βιοαερίου της παρούσας μελέτης. Παρόλα αυτά, η παραγωγή βιοαερίου μειώνεται καθώς αυξάνεται η περιεκτικότητα σε TS (Lin *et al.*, 2014; Luo *et al.*, 2018). Η χώνευση σε θερμοφιλες συνθήκες (≈ 55 °C) οδήγησε σε μικρή αύξηση της παραγωγής μεθανίου κατά την αναερόβια συγχώνευση SMS και κοπριάς ελαφιού, δείχνοντας ότι η χώνευση σε υψηλότερες θερμοκρασίες, ενισχύει την παραγωγικότητα του βιοαερίου (Xiao *et al.*, 2017; Wang *et al.*, 2019).

5. Συμπεράσματα

Στο πλαίσιο της μελέτης υδρόλυσης και αξιοποίησης αναλωμένων υποστρωμάτων καλλιέργειας μανιταριών των ειδών *A. bisporus* και *P. ostreatus* μέσω αναερόβιας χώνευσης, αρχικά παρατηρήθηκε ότι το SMS από το *A. bisporus* ήταν φτωχό σε πολυσακχαριδικής φύσεως μόρια, καθώς είχαν αφομοιωθεί από τα καλλιεργούμενα μανιτάρια, οπότε δεν μελετήθηκε περαιτέρω η υδρόλυση και αξιοποίησή του. Το αναλωμένο υπόστρωμα καλλιέργειας μανιταριών από καλλιέργεια του μανιταριού *P. ostreatus* ήταν πλούσιο σε πτητικά στερεά (80,15%) και ειδικά η συγκέντρωση σε ολοκυτταρίνη ήταν 42,63% (32,18% κυτταρίνη και 10,45% ημικυτταρίνη). Η υψηλή περιεκτικότητα σε πτητικά στερεά και δη κυτταρίνη, καθιστά το SMS υποσχόμενο υπόστρωμα υδρόλυσης και απελευθέρωσης σακχάρων.

Με βάση τους διάφορους συνδυασμούς χημικής προ-επεξεργασίας (όξινη και αλκαλική υδρόλυση συνδυαστικά με την εφαρμογή θερμικής επεξεργασίας) του SMS που εξετάστηκαν, τα βέλτιστα αποτελέσματα σχετικά με την απελευθέρωση αναγωγικών σακχάρων από τη λιγνινοκυτταρινούχα βιομάζα προήλθαν από υδρόλυση παρουσία οξέος 0,4% υπό υδροθερμική κατεργασία στους 150 °C. Συγκεκριμένα, η αύξηση της θερμοκρασίας και έως τους 100 °C οδήγησε σε αναλογική απελευθέρωση αναγωγικών σακχάρων και σχετίζεται άμεσα με την αύξηση της συγκέντρωσης του πυκνού θεικού οξέος, το οποίο σε κάθε περίπτωση κυμάνθηκε σε χαμηλές συγκεντρώσεις. Σε θερμική κατεργασία πέραν των 100 °C (ειδικά κατά την υδροθερμική επεξεργασία θερμοκρασίας 121 °C για χρονική διάρκεια 60 λεπτών), η απόδοση των αναγωγικών σακχάρων δεν έβαινε αύξουσα, όσο αυξανόταν το ποσοστό του θεικού οξέος. Τα βέλτιστα αποτελέσματα προήλθαν από την αύξηση της θερμοκρασίας και χαμηλότερη συγκέντρωση οξέος. Αναφορικά με την επίδραση της αλκαλικής υδρόλυσης, χαρακτηριστική ήταν η αλλαγή στις ρεολογικές ιδιότητες του μίγματος, το οποίο, εξαιτίας της σταδιακής αποδιάταξης του πλέγματος της λιγνινοκυτταρίνης, λόγω διάσπασης ασταθών δεσμών, ομοιάζε με πούλπα, αυξημένης βιοδιαθεσιμότητας των πηγών άνθρακα από τους αποικοδομητές μικροοργανισμούς.

Η αναερόβια χώνευση οδήγησε σε σημαντική μείωση των πτητικών στερεών, τόσο στο υπόστρωμα της όξινης επεξεργασίας (56% για το υδρόλυμα όξινης επεξεργασίας), όσο και σε αυτό της αλκαλικής (36% για αυτό της αλκαλικής

κατεργασίας). Η χώνευση του αλκαλικού υδρολύματος, λόγω καθυστέρησης της έναρξης έκλυσης βιοαερίου, ελέω της απουσίας ελεύθερων σακχάρων, απαίτησε περισσότερες ημέρες χρόνου παραμονής στο χωνευτήρα, οπότε κρίνεται σημαντική η μελέτη της χώνευσης των 2 υδρολυμάτων και για χρονικό διάστημα μεγαλύτερο των 15 ημερών. Σε κάθε περίπτωση, η χημική υδρόλυση του αναλωθέντος υποστρώματος μανιταριών του είδους *P. ostreatus*, με όξινο ή αλκαλικό παράγοντα, συνδυασμένη με θερμική επεξεργασία, οδηγεί σε υδρολύματα ικανά να αξιοποιηθούν ως υποστρώματα αναερόβιας χώνευσης και παραγωγής βιοαερίου.

6. Βιβλιογραφία

- Abdel-Hadi, M.A. 2008. A simple apparatus for biogas quality determination. *Misr Journal of Agricultural Engineering*, 25, 1055-1066.
- Agbor, V.B., Cicek, N., Sparling, R., Berlin, A., Levin, D.B. 2011. Biomass pretreatment: Fundamentals toward application, *Biotechnology Advances*, 29, 675-685.
- Ahlawat, O.P. 2011. Recycling of Spent Mushroom Substrate. *Mushrooms: Cultivation, Marketing and Consumption*, 18, 189-196.
- Ahring, B.K. 2003. Perspectives for Anaerobic Digestion. *Biomethanation I*, 1, 1-30. Ahmed, B., Aboudi, K., Tyagi, V.K., Álvarez-Gallego, C.J., Fernández-Güelfo, L.A., RomeroGarcía, L.I., Kazmi, A.A. 2019. Improvement of anaerobic digestion of lignocellulosic biomass by hydrothermal pretreatment. *Applied Sciences*, 9, 3853.
- Alexopoulos, C. J., Mims, C.W., Blackwell, M. 1996. *Introductory Mycology* (4th ed.)
- Alhujaily, A., Yu, H., Zhang, X., Ma, F. 2018. Highly Efficient and sustainable spent mushroom waste adsorbent based on surfactant modification for the removal of toxic dyes. *Int. J. Environ. Res. Public Heal*, 15, 1421.
- Ali Shah. F., Mahmood. Q., Maroof Shah. M., Pervez. A., Ahmad Asad. S. 2014. Microbial ecology of anaerobic digesters: the key players of anaerobiosis. *The Scientific World Journal*, 2014, 1-21.
- Antunes. F., Marcal. S., Taofiq. O., Morais. A., Freitas. A.C., Ferreira. I., Pintado. M. 2020. Valorization of mushroom by-products as a source of value-added compounds and potential applications. *Molecules*, 25, 2672-2712.
- Argyropoulos, D., Psallida, C., Sitareniou, P., Flemetakis, E., Diamantopoulou, P. 2022. Biochemical evaluation of *Agaricus* and *Pleurotus* strains in batch cultures for production optimization of valuable metabolites. *Microorganisms*, 10, 964-989.
- Azzam, M. 1989. Pretreatment of cane bagasse with alkaline hydrogen peroxide for enzymatic hydrolysis of cellulose and ethanol fermentation. *Journal of Environmental Science and Health, Part B*, 24, 421-433.
- Baars J. 2012. Mushroom industry in the Netherlands – strong competitors. *World Society Mushroom Biology and Mushroom Products Bulletin*, 7, 1-3. Bayerisches Staatsministerium für Umwelt, Gesundheit und Verbraucherschutz (STMUGV). 2004
- Bellettini, M.B., Fiorda, F.A., Maieves. H.A., Teixeira, G.L., Ávila, S., Hornung, P.S., Júnior, A.M., Ribani, R.H. 2019. Factors affecting mushroom *Pleurotus* spp. *Saudi J Biol Sci*, 26, 633646.
- Ben-Ghedalia, D., Miron, J. 1981. The effect of combined chemical and enzyme treatment on the saccharification and in vitro digestion rate of wheat straw. *Biotechnol. Bioeng.* 23, 823-831.
- Bhatia, S.K., Gurav, R., Choi, T.-R., Han, Y.H., Park, Y.-L., Park, J.Y., Jung, H.-R., Yang, S.-Y., Song, H.-S., Kim, S.-H., Choi, K.-Y., Yang, Y.-H. 2019a. Bioconversion of barley straw lignin into biodiesel using *Rhodococcus* sp. YHY01. *Bioresour. Technol.*, 289, 121704.
- Bhatia, S.K., Gurav, R., Choi, T.R., Jung, H.R., Yang, S.Y., Moon, Y.M., Song, H.S., Jeon, J.M., Choi, K.Y., Yang, Y.H. 2019b. Bioconversion of plant biomass hydrolysate into bioplastic (polyhydroxyalkanoates) using *Ralstonia eutropha* 5119. *Bioresour. Technol.*, 271, 306-315.
- Bhatia, S.K., Kim, S.H., Yoon, J.J., Yang, Y.H. 2017. Current status and strategies for second generation biofuel production using microbial systems. *Energy. Convers. Manage*, 148, 11421156.

- Bieniecka, K., Dreve, R. 2012. Peiczarkalia shows Polish confidence. *Mushroom Business*, 55, 8-9.
- Bisaria, R., Vasudevan, P., Bisaria, V.S. 1990. Utilization of spent agro-residues from mushroom cultivation for biogas production. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 33, 607-609.
- Bisaria, R., Madan, M. 1983. Mushrooms: Potential protein source from cellulosic residues. *Enzyme and Microbial Technology*, 5, 251-259.
- Bisaria, R., Madan, M., Bisaria, V.S. 1987. Biological efficiency and nutritive value of *Pleurotus sajor-caju* cultivated on different agro-wastes. *Biol. Wastes*, 19, 239-255.
- Bjerre, A.B., Olesen, A.B., Fernqvist, T. 1996. Pretreatment of wheat straw using combined wet oxidation and alkaline hydrolysis resulting in convertible cellulose and hemicellulose. *Biotechnol. Bioeng*, 49, 568-577.
- Brown, D., Shi, J., Li, Y. 2012. Comparison of solid-state to liquid anaerobic digestion of lignocellulosic feedstocks for biogas production. *Bioresour. Technol.*, 124 (2012) stocks for biogas production. *Bioresour. Technol.*, 124, 379-386.
- Cadoche, L., Lopez, G.D. 1989. Assessment of size reduction as a preliminary step in the production of ethanol from lignocellulosic wastes. *Biol. Wastes*, 30, 153-157.
- Chang, S.T., Wasser, S. 2017. *The Cultivation and Environmental Impact of Mushrooms*. Oxford: Oxford University Press, 273-274.
- Chang, S.T. 1999. World production of cultivated edible and medicinal mushrooms in 1997 with emphasis on *Lentinus edodes* (Berk.) Sing. in China. *International J. Med. Mush*, 1, 291300.
- Chang, S.T. 2005. Witnessing the development of the mushroom industry in China. *Acta Edulis Fungi*, 12, 3-19.
- Chang, V.S., Holtzapple, M.T. 2000. Fundamental factors affecting biomass enzymatic reactivity. *Appl. Biochem. Biotechnol*, 84, 5-37.
- Charcosset, C. 2014. Combining membrane processes with renewable energy technologies: perspectives on membrane desalination, biofuels and biogas production, and microbial fuel cells, in A. Gugliuzza, A. Basile (eds.), *Membranes for Clean and Renewable Power Applications*, 44-62.
- Chen, X.Y., Vinh-Thang, H., Ramirez, A.A., Rodrigue, D., Kaliaguine, S. 2015. Membrane gas separation technologies for biogas upgrading. *RSC Advances*, 5, 24399-24448.
- Cheung, P.C.K. 2010. The nutritional and health benefits of mushrooms. *Nutrition Bulletin*, 35(4), 292-299.
- Chinese Edible Fungus Association (CEFA). 2014
- Choi, Y., Ryu, J., Lee, S.R. 2020. Influence of carbon type and carbon to nitrogen ratio on the biochemical methane potential, pH, and ammonia nitrogen in anaerobic digestion. *J Anim Sci Technol*, 62, 74-83.
- Chosdu, R., Hilmy, N.E., Erlinda, T.B., Abbas, B. 1993. Radiation and chemical pretreatment of cellulosic waste. *Radiat. Phys. Chem*, 42, 695-698.
- Cioabla, A. E., Ionel, I., Dumitrel, G.A., Popescu, F. 2012. Comparative study on factors affecting anaerobic digestion of agricultural vegetal residues. *Biotechnol Biofuels*, 5, 39.
- Corrêa, R.C.G., da Silva, B.P, Castoldi, R., Kato, C.G., de Sá-Nakanishi, A.B., Peralta, R.A., de Souza, C.G.M., Bracht, A., Peralta, R.M. 2016. Spent mushroom substrate of *Pleurotus pulmonarius*: a source of easily hydrolyzable lignocellulose. *Folia Microbiol*, 61, 439-448.

- Dale, B.E., Moreira, M.J. 1982. A freeze-explosion technique for increasing cellulose hydrolysis. *Bioethanol. Bioeng. Symp.* 12, 31-43.
- Diamantopoulou, P., Philippoussis, A. 2015. Cultivated mushrooms: preservation and processing. In: Hui YH (ed) *Handbook of vegetable preservation and processing*. CRC press, Florida, 495–525.
- Dreve R. 2014. Giant enoki farm. *Mushroom Business*, 64, 40-41.
- Economou, C.N., Philippoussis, A.N., Diamantopoulou, P.A. 2020. Spent mushroom substrate for a second cultivation cycle of *Pleurotus* mushrooms and dephenolization of agro-industrial wastewaters. *FEMS Microbiol. Lett*, 367, 1–10.
- Economou, C.N., Diamantopoulou, P.A., Philippoussis, A.N. 2017. Valorization of spent oyster mushroom substrate and laccase recovery through successive solid state cultivation of *Pleurotus*, *Ganoderma*, and *Lentinula* strains. *Appl Microbiol Biotechnol*, 101, 5213–5222.
- Elshafei. A.M., Vega. J.L., Klasson. K.T., Clausen. E.C., Gaddy. J.L. (1991). The saccharification of corn stover by cellulase from *Penicillium funiculosum*. *Bioresource Technology*, 35, 73-80.
- Esteghlalian, A., Hashimoto, A.G., Fenske, J.J., Penner, M.H. 1997. Modeling and optimization of the dilute-sulfuric-acid pretreatment of corn stover, poplar and switchgrass. *Bioresour. Technol*, 59, 129-136.
- Fan, Lt., Gharpuray, M.M., Lee, YH. (1987). Acid Hydrolysis of Cellulose. In: Cellulose Hydrolysis. Biotechnology Monographs, vol 3. Springer, Berlin, Heidelberg.
- Feng, Q., Song, Y. C., Kim, Dong-Hyun, Kim, M.S., Kim, Dong-Hoon, 2019. Influence of the temperature and hydraulic retention time in bioelectrochemical anaerobic digestion of sewage sludge. *Int. J. Hydrogen Energy*, 44, 2170-2179.
- Ferry, J.G. 1993. Methanogenesis: ecology, physiology, biochemistry & genetics. *Springer*, 128-206.
- Fox, D.J., Gray, P.P., Dunn, N.W., Warwick, L.M. 1989. Comparison of alkali and steam (acid) pretreatments of lignocellulosic materials to increase enzymic susceptibility: Evaluation under optimized pretreatment conditions. *J. Chem. Tech. Biotech*, 44, 135-146.
- Galbe, M.; Zacchi, G. 2007. Pretreatment of lignocellulosic materials for efficient bioethanol production. *Adv. Biochem. Eng./Biotechnol*, 108, 41-65.
- Gao, X., Tang, X., Zhao, K., Balan, V., Zhu, Q. 2021. Biogas production from anaerobic codigestion of spent mushroom substrate with different livestock manure. *Energies*, 14, 570.
- Ghose, T.K., Das, D. 1982. Maximization of energy recovery in the biomethanation process. Part 2: use of mixed residue in batch system. *Process Biochem*, 17, 39-42.
- Grimm and Wösten. 2018. Mushroom cultivation in the circular economy. *Appl Microbiol Biotechnol*, 102, 7795– 7803.
- Hinman, N.D., Schell, D.J., Riley, C. J., Bergeron, P.W., Walter, P.J. 1992. Preliminary estimate of the cost of ethanol production for SSF technology. *Appl. Biochem. Biotechnol*, 3435, 639-649.
- Haq, I., Qaisar, K., Nawaz, A., Akram, F., Mukhtar, H., Zohu, X., Xu, Y., Mumtaz, M.W., Rashid, U., Ghani, W.A.W.A.K., Choong, T.S.Y. 2021. Advances in valorization of lignocellulosic biomass towards energy generation. *Catalysts*, 11, 309–334.
- ISO 8968-1. Milk–Determination of Nitrogen Content–Part 1: Kjeldahl Method. First Edition IDF 20-1. Available online: <https://www.iso.org/standard/35120.html> (accessed on 15 December 2001).

- Itoh, H., Wada, M., Honda, Y., Kuwahara, M., Watanabe, T. 2003. Bioorganosolve pretreatments for simultaneous saccharification and fermentation of beech wood by ethanolysis and white rot fungi. *J. Biotechnol*, 103, 273-280.
- Jagtap, S.S., Bedekar, A.A., Liu, J.-J., Jin, Y.-S., Rao, C.V. 2019. Production of galactitol from galactose by the oleaginous yeast *Rhodospiridium toruloides* IFO0880. *Biotechnol Biofuels*, 12, 250.
- Jagtap, S.S., Dhiman, S.S., Jeya, M., Kang, Y.C., Choi, J.-H., Lee, J.-K. 2012. Saccharification of poplar biomass by using lignocellulases from *Pholiota adiposa*. *Bioresour. Technol*, 120, 264-272.
- Jasinska, A. 2018. Spent mushroom compost (SMC) –retrieved added value product closing loop in agricultural production. *Acta Agraria. Debe*, 150, 185-202.
- Kåberger, T. 2018. Progress of renewable electricity replacing fossil fuels. *Glob Energy Interconnect*, 1, 48-52.
- Kalač, P. 2013. A review of chemical composition and nutritional value of wild-growing and cultivated mushrooms. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 93, 209–218
- Kaldis, P., Kontogeorgakos, D., Gardeli, C. 2002. Economic aspects of the emerging Greek mushrooms industry. *New Medit*, 1, 60-64.
- Kilzer, F.J.; Broido, A. 1965. Speculations on the nature of cellulose pyrolysis. *Pyrodynamics*, 2, 151-163.
- Kim, J.S., Lee, Y.Y., Kim, T.H. 2016. A review on alkaline pretreatment technology for bioconversion of lignocellulosic biomass. *Bioresource Technology*, 199, 42-48.
- Kong, F., Engler, C.R., Soltis, E.J. 1992. Effects of cell-wall acetate, xylan backbone, and lignin on enzymatic hydrolysis of aspen wood. *Appl. Biochem. Biotechnol*, 34, 23-35.
- Kumar, G., Ponnusamy, V.K., Bhosale, R.R., Shobana, S., Yoon, J.J., Bhatia, S.K., Rajesh Banu, J., Kim, S.H. 2019. A review on the conversion of volatile fatty acids to polyhydroxyalkanoates using dark fermentative effluents from hydrogen production. *Bioresour. Technol*, 287, 121427.
- Kumar, P., Kumar, V., Singh, J., Kumar, P. 2021. Electrokinetic assisted anaerobic digestion of spent mushroom substrate supplemented with sugar mill wastewater for enhanced biogas production. *Renewable Energy*, 179, 418-426.
- Kumar, P.; Barrett, D. M.; Delwiche, M. J.; Stroeve, P. 2009. Methods for pretreatment of lignocellulosic biomass for efficient hydrolysis and biofuel production. *Ind. Eng. Chem. Res*, 48(8), 3713-3729.
- Kumar, S., 2011. Composting of municipal solid waste. *Crit. Rev. Biotechnol*, 31(2), 112-136.
- Kumla, J., Suwannarach, N., Sujarit, K., Penkhrue, W., Kakumyan, P., Jatuwong, K., Vadthananat, S., Lumyong, S. 2020. Cultivation of mushrooms and their lignocellulolytic enzyme production through the utilization of agroindustrial waste. *Molecules*, 25, 2811–2852.
- Kwak, W.S., Jung, S.H., Kim, Y.I. 2008. Broiler litter supplementation improves storage and feed-nutritional value of sawdust-based spent mushroom substrate. *Bioresource Technology*, 99, 8046-8051.
- Lebuhn, M., Liu, F., Gronauer, A. 2008. Biogas production from mono-digestion of maize silage – long-term process stability and requirements. Proceedings of the 5th International Symposium on Anaerobic Digestion of Solid Wastes and Energy Crops, Hammamet, Tunisia.
- Lee, J.W., Gwak, K.S., Park, J.Y., Park, M.J., Choi, D.H., Kwon, M., Choi, I.G. 2007. Biological pretreatment of softwood *Pinus densiflora* by three white rot fungi. *J. Microbiol*, 45, 485-491.

- Lee, Y.H., Fan, L.T. 1982. Kinetic studies of enzymatic hydrolysis of insoluble cellulose: Analysis of the initial rates. *Biotechnol. Bioeng*, 24, 2383-2406.
- Lelley JI. 2014. State of the German mushroom industry. A brief summary. WSMBMP Bulletin 10: January 31, 2014.
- Li, Y. 2012. Present development situation and tendency of edible mushroom industry in China. *Mushroom Sci*, 6, 2961-2973.
- Li, Y.C., Wu, S.Y., Chu, C.Y., Huang, H.C. 2011. Hydrogen production from mushroom farm waste with a two-step acid hydrolysis process. *International Journal of Hydrogen Energy*, 36, 14245-14251.
- Lim, W.S., Lee, J.W. 2013. Influence of pretreatment condition on the fermentable sugar production and enzymatic hydrolysis of dilute acid pretreated mixed softwood. *Bioresource Technology*, 140, 306-311.
- Lin, Y., Ge, X., Li, Y. 2014. Solid-state anaerobic co-digestion of spent mushroom substrate with yard trimmings and wheat straw for biogas production. *Bioresource technology*, 169, 468474.
- Loow, Y., Wu, T.Y., Jahim, J.M., Mohammad, A.W., Teoh, W.H. 2016. Typical conversion of lignocellulosic biomass into reducing sugars using dilute acid hydrolysis and alkaline pretreatment. *Cellulose*, 23(3), 1491-1520.
- Lou, Z., Sun, Y., Bian, S., Ali Baig, S., Hu, B., Xu, X. 2017. Nutrient conservation during spent mushroom compost application using spent mushroom substrate derived biochar. *Chemosphere*, 169, 23-31.
- Luo, X., Yuan, X., Wang, S., Sun, F., Hou, Z., Hu, Q., Zhai, L., Cui, Z., Zou, Y. 2018. Methane production and characteristics of the microbial community in the co-digestion of spent mushroom substrate with dairy manure, *Bioresource Technology*, 250, 611-620.
- Ma, G., Yang, W., Zhao, L., Pei, F., Fang, D., Hu, Q. 2018. A critical review on the health promoting effects of mushrooms nutraceuticals. *Food Science and Human Wellness*, 7, 125–133
- MacDonald, D.G., Bakhshi, N.N., Mathews, J.F., Roychowdhury, A., Bajpai, P., Moo-Young, M. 1983. Alkali treatment of corn stover to improve sugar production by enzymatic hydrolysis. *Biotechnol. Bioeng*, 25, 2067-2076.
- McMillan, J.D. 1994. Pretreatment of lignocellulosic biomass. In: *Enzymatic conversion of biomass for fuels production*; Himmel, M.E., Baker, J.O., Overend, R.P., Eds. American Chemical Society: Washington, 292-324.
- Meegoda, J.N., Li, B., Patel, K., Wang, L.B. 2018. A Review of the processes, parameters, and optimization of anaerobic digestion. *Int J Environ Res Public Health*, 15, 2224.
- Meng, S., Bing, L., Katsunori, Y., Nguyen, T.H., Rajeev, G., Mitsuharu, T., Hidenari, Y. 2020. Effects of low pH conditions on decay of methanogenic biomass. *Water Research*, 179, 115883.
- Meng, X., Parikh, A., Seemala, B., Kumar, R., Pu, Y., Christopher, P., Wyman, C.E., Cai, C.M., Ragauskas, A.J. 2018. Chemical transformations of poplar lignin during cosolvent enhanced lignocellulosic fractionation process. *ACS Sust. Chem*, 6, 8711-8718.
- Mes-Hartree, M., Dale, B.E., Craig, W.K. 1988. Comparison of steam and ammonia pretreatment for enzymatic hydrolysis of cellulose. *Appl. Microbiol. Biotechnol*, 29, 462-468.
- Mosier, N.S., Wyman, C., Dale, B., Elander, R., Lee, Y.Y., Holtzapple, M., Ladisch, M.R. 2005. Features of promising technologies for pretreatment of lignocellulosic biomass. *Bioresour. Technol*, 96(6), 673-686.

- Mueller, H.W., Troesch, W. 1986. Screening of white rot fungi for biological pretreatment of wheat straw for biogas production. *Appl Microbiol Biotechnol*, 24, 180-185
- Neely, W.C. 1984. Factors affecting the pretreatment of biomass with gaseous ozone. *Biotechnol. Bioeng*, 26, 59-65.
- Nguyen, V.C.N., Klaus, F. 2012. Energy recovery from anaerobic co-digestion with pig manure and spent mushroom compost in the Mekong Delta. *Journal of Vietnamese Environment*, 3, 49.
- Okano, K., Kitagaw, M., Sasaki, Y., Watanabe, T. (2005). Conversion of Japanese red cedar (*Cryptomeria japonica*) into a feed for ruminants by white-rot basidiomycetes. *Animal Feed Sci. Technol*, 120(3-4), 235-243.
- Oriez, V., Peydecastaing, J., Pontalier, P.Y. 2020. Lignocellulosic biomass mild alkaline fractionation and resulting extract purification processes: conditions, yields, and purities. *Clean Technologies*, 2(1), 91-115.
- Paredes, C., Medina, E., Moral, R., Pérez-Murcia, M.D., Moreno-Caselles, J., Bustamante, M.A., Cecilia, J.A. 2009. Characterization of the different organic matter fractions of spent mushroom substrate. *Commun. Soil Sci. Plan*, 40, 150-161.
- Parthiba Karthikeyan, O., Trably, E., Mehariya, S., Bernet, N., Wong, J.W.C., Carrere, H. 2018. Pretreatment of food waste for methane and hydrogen recovery: a review. *Bioresour. Technol*, 249, 1025-1039.
- Patel, A.K., Singhanian, R.R., Sim, S.J., Pandey, A. 2019. Thermostable cellulases: current status and perspectives. *Bioresour. Technol*, 279, 385-392.
- Patinvoh, R.J., Osadolor, O.A., Chandolias, K., Sárvári Horváth, I., Taherzadeh, M.J. 2017. Innovative pretreatment strategies for biogas production. *Bioresour. Technol*, 224, 13-24.
- Phan, C.W., Sabaratnam, V. 2012. Potential uses of spent mushroom substrate and its associated lignocellulosic enzymes. *Appl Microbiol Biotechnol*, 96, 863-873.
- Philippoussis, A., Diamantopoulou, P., Israilides, C. 2007. Productivity of agricultural residues used for the cultivation of the medicinal fungus *Lentinula edodes*. *Int Biodeterior Biodegrad*, 59, 216-219.
- Philippoussis, A., Zervakis, G., Diamantopoulou, P. 2001. Bioconversion of lignocellulosic wastes through the cultivation of the edible mushrooms *Agrocybe aegerita*, *Volvariella volvacea* and *Pleurotus* spp. *World J Microbiol Biotechnol*, 17, 191-200.
- Qiao, J.J., Zhang, Y.F., Sun, L.F., Liu, W.W., Zhu, H.J., Zhang, Z. 2011. Production of spent mushroom substrate hydrolysates useful for cultivation of *Lactococcus lactis* by dilute sulfuric acid, cellulase and xylanase treatment. *Bioresour. Technol*, 102, 8046-8051.
- Root, D.F., Saeman, J.F., Harris, J.F. 1959. Kinetics of the acid catalyzed conversion of xylose to furfural. *Forest Prod. J*, 57, 14417-14427.
- Rozendaal J. 2012. Poland and Ukraine. *Mushroom Business*, 53, 12-14.
- Royse, DJ., Baars, J., Tan, Q. 2017. Current Overview of Mushroom Production in the World. *Edible and Medicinal Mushrooms*, 2, 5-13.
- Royse DJ. 2014. A global perspective on the high five: *Agaricus*, *Pleurotus*, *Lentinula*, *Auricularia* & *Flammulina*. Proceedings of the 8th International Conference on Mushroom Biology and Mushroom Products, New Delhi, India
- Saini, J.K., Patel, A.K., Adsul, M., Singhanian, R.R. 2016. Cellulase adsorption on lignin: a roadblock for economic hydrolysis of biomass. *Renew. Energy*. 98, 29-42.

- Sankaran, R., Parra Cruz, R.A., Pakalapati, H., Show, P.L., Ling, T.C., Chen, W.H., Tao, Y. 2019. Recent advances in the pretreatment of microalgal and lignocellulosic biomass: a comprehensive review. *Bioresour. Technol*, 298, 122476.
- Sárvári Horváth I., Tabatabaei M., Karimi K., Kumar R. 2016. Recent updates on biogas production - a review. *Biofuel Research*, 3, 394-402.
- Selig, M.J., Viamajala, S., Decker, S.R., Toker, M.P., Himmel, M.E. 2007. Deposition of lignin droplets produced during dilute acid pretreatment of maize stems retards enzymatic hydrolysis of cellulose. *Biotechnol. Prog*, 23, 1333-1339.
- Selvankumar, T., Sudhakar, C., Govindaraju, M., Selvam, K., Aroulmoji, V., Sivakumar, N., Govarathanan, M. 2017. Process optimization of biogas energy production from cow dung with alkali pre-treated coffee pulp. *3 Biotech*, 7, 254.
- Shafizadeh, F., Bradbury, A.G.W. 1979. Thermal degradation of cellulose in air and nitrogen at low temperatures. *Appl. Polym. Sci*, 23, 1431-1442.
- Shetty, D.J., Kshirsagar, P., Tapadia-Maheshwari, S., Lanjekar, V., Singh, S.K., Dhakephalkar, P.K. 2017. Alkali pretreatment at ambient temperature: A promising method to enhance biomethanation of rice straw. *Bioresource Technology*, 226, 80-88.
- Shrotri, A., Kobayashi, H., Kaiki, H., Ybushita, M., Fukuoka, A. 2017. Cellulose hydrolysis using oxidized carbon catalyst in a plug-flow slurry process. *Ind Eng Chem Res*, 56, 14471-14478
- Shu, C., Jaiswal, R., Kuo, M., Yu, B. 2022. Enhancing methane production in a two-stage anaerobic digestion of spent mushroom substrate and chicken manure via activation of sludge, optimization of temperature, and C/N ratio. *Frontiers in Environmental Science*, 169, 299-306.
- Sindhu, R., Binod, P., Mathew, A.K., Abraham, A., Gnansounou, E., Ummalyma, S.B., Thomas, L., Pandey, A. 2017. Development of a novel ultrasound-assisted alkali pretreatment strategy for the production of bioethanol and xylanases from chili post harvest residue. *Bioresour. Technol*, 242, 146-151.
- Singh, S., 2018. Designing tailored microbial and enzymatic response in ionic liquids for lignocellulosic biorefineries. *Biophys. Rev*, 10, 911-913.
- Sivers, M. V.; Zacchi, G. 1995. A techno-economical comparison of three processes for the production of ethanol from pine. *Bioresour. Technol*, 51(1), 43-52.
- ^aSluiter, A., Hames, B., Hyman, D., Payne, C., Ruiz, R., Scarlata, C., Sluiter, J., Templeton, D., Wolfe J. 2008. Determination of total solids in biomass and total dissolved solids in liquid process samples. Golden, CO: National Renewable Energy Laboratory. NREL/TP-510-42621
- ^bSluiter, A., Ruiz, R., Scarlata, C., Sluiter, J., Templeton, D. 2008. Determination of extractives in biomass. Golden, CO: National Renewable Energy Laboratory. NREL/TP-510-42619
- Sluiter, A., Hames, B., Ruiz, R., Scarlata, C., Sluiter, J., Templeton, D. 2005. Determination of Ash in Biomass. Golden, CO: National Renewable Energy Laboratory. NREL/TP-510-42622
- Sluiter, A., Hames, B., Ruiz, R., Scarlata, C., Sluiter, J., Templeton, D., Crocker, D. 2012. Determination of Structural Carbohydrates and Lignin in Biomass. Golden, CO: National Renewable Energy Laboratory. NREL/TP-510-42618
- Sorn, V., Chang, K.-L., Phitsuwan, P., Ratanakhanokchai, K., Dong, C.-D. 2019. Effect of microwave-assisted ionic liquid/acidic ionic liquid pretreatment on the morphology, structure, and enhanced delignification of rice straw. *Bioresour. Technol*, 293, 121929.
- Soto, M.L., Dominguez, H., Nunez, M.J., Lema, J.M. 1994. Enzymatic saccharification of alkali-treated sunflower hulls. *Bioresour. Technol*, 49, 53-59.

- Sumner, J.B. 1921. Dintrosalicylic acid: A reagent for the estimation of sugar in normal and diabetic urine. *Journal of Biological Chemistry*, 47, 5-9.
- Sun, Y., Cheng, J. 2002. Hydrolysis of lignocellulosic materials for ethanol production: A review. *Bioresour. Technol.*, 83, 1-11.
- Tang, L.Y., Xiao, L., Li, L., Guo, Q., Bian, Y. 2010. Analysis of genetic diversity among Chinese *Auricularia auricula* cultivars using combined ISSR and SRAP markers. *Curr. Microbiol.*, 61, 132-140.
- Umor, N.A., Ismail, S., Abdullah, S., Huzaifah, M.H.R., Huzir, N.M., Mahmood, N.A.N., Zahrim, A.Y. 2021. Zero waste management of spent mushroom compost. *Journal of Material Cycles and Waste Management*, 23, 1726-1736.
- United States Department of Agriculture (USDA). 2006. Mushrooms. National Agricultural Statistics Service, Agricultural Statistics Board.
- United States Department of Agriculture (USDA). 2015. Mushrooms. National Agricultural Statistics Service, Agricultural Statistics Board.
- United States International Trade Commission (USITC). 2010.
- Valverde, M. E., Hernández-Pérez, T., Paredes-López, O. 2015. Edible mushrooms: Improving human health and promoting quality life. *International Journal of Microbiology*, 2015, 1–14.
- Vaneeckhaute, C., Styles, D., Prade, T., Adams, P., Thelin, D., Rodhe, L., Gunnarsson, I., D'Hertefeldt, T. 2018. Closing nutrient loops through decentralized anaerobic digestion of organic residues in agricultural regions: a multi-dimensional sustainability assessment. *Resour. Conserv. Recycl.*, 136, 110-117.
- Venkiteshwaran, K., Bocher, B., Maki, J., Zitomer, D. 2016. Relating anaerobic digestion microbial community and process function. *Microbiol Insights*, 8,37-44.
- Vidal, P.F., Molinier, J. 1988. Ozonolysis of lignins - mprovement of in vitro digestibility of poplar sawdust. *Biomass*, 16, 1-17.
- Walker, M., Zhang, Y., Heaven, S., Banks, C. 2009. Potential errors in the quantitative evaluation of biogas production in anaerobic digestion processes. *Bioresource Technology*, 100, 6339-6346.
- Wang, H., Xu, J., Sheng, L., Liu, X., Zong, M., Yao, D. 2019. Anaerobic Digestion technology for methane production using deer manure under different experimental conditions. *Energies*, 12, 1819.
- Ward, A.J., Hobbs, P.J., Holliman, P.J., Jones, D.L. 2008. Optimisation of the anaerobic digestion of agricultural resources. *Bioresource Technology*, 99, 7928-7940.
- Wu, S., Lan, Y., Wu, Z., Peng, Y., Chen, S., Huang, Z., Xu, L., Gelbic, I., Guan, X., Zhang, L., Zou, S. 2013. Pretreatment of spent mushroom substrate for enhancing the conversion of fermentable sugar. *Bioresource Technology*, 148, 596-600.
- Xiao, Z., Lin, M., Fan, J., Chen, Y., Zhao, C., Liu, B. 2017. Anaerobic digestion of spent mushroom substrate under thermophilic conditions: performance and microbial community analysis. *Applied Microbiology and Biotechnolog*, 102, 499-507.
- Yadav, M., Joshi, C., Paritosh, K., Thakur, J., Pareek, N., Masakapalli, S., Vivekanand, V. 2022. Organic waste conversion through anaerobic digestion: A critical insight into the metabolic pathways and microbial interactions. *Metab. Eng.*, 69, 323-337.
- Yadvika, Santosh, Sreekrishnan T.R., Kohli S., Rana V. 2004. Enhancement of biogas production from solid substrates using different techniques – a review. *Bioresource Technology*, 95, 1-10.

- Yamanaka K. 2011. Mushroom cultivation in Japan. *World Society Mushroom Biology and Mushroom Products Bulletin*, 4, 1-10.
- Yat, S.C., Berger, A., Shonnard, D.R. 2008. Kinetic characterization of dilute surface acid hydrolysis of timber varieties and switchgrass. *Bioresour. Technol*, 99, 3855-3863.
- Yuliansyah, A.T., Hirajima, T. 2012. Efficacy of hydrothermal treatment for production of solid fuel from oil palm wastes, in V. Abrol, P. Sharma (eds.), *Resource Management for Sustainable Agriculture*, IntechOpen, London.
- Zeitsch, K.J. 2000. The chemistry and technology of furfural and its many by-products. *Sugar Series*, 13.
- Zha, Y., Westerhuis, J.A., Muilwijk, B., Overkamp, K.M., Nijmeijer, B.M., Coulier, L., Smilde, A.K., Punt, P.J. 2014. Identifying inhibitory compounds in lignocellulosic biomass hydrolysates using an exometabolomics approach. *BMC Biotechnology*, 14, 22.
- Zhang, K., Agrawal, M., Harper, J., Chen, R., Koros, W.J. 2011. Removal of the fermentation inhibitor, furfural, using activated carbon in cellulosic-ethanol production. *Industrial & Engineering Chemistry Research*, 50, 14055-14060.
- Zhu, J., Han, M., Zhang, G., Yang, L. 2015. Co-digestion of spent mushroom substrate and corn stover for methane production via solid-state anaerobic digestion. *Journal of Renewable and Sustainable Energy*, 7, 023135.
- Zhu, H.J., Liu, J.H., Sun, L.F., Hu, Z.F., Qiao, J.J. 2013. Combined alkali and acid pretreatment of spent mushroom substrate for reducing sugar and biofertilizer production. *Bioresource Technology*, 136, 257-266.
- Zied, D.C., Sánchez, J.E., Noble, R., Pardo-Giménez, A. 2020. Use of spent mushroom substrate in new mushroom crops to promote the transition towards a circular economy. *Agronomy*, 10, 1239.

Μάρη, Ι. 2000. Διαχείριση γεωργικών αποβλήτων: αναπνευσμετρική εκτίμηση της πορείας σταθεροποίησης οργανικών υποστρωμάτων υπό συνθήκες αερόβιας θερμοφίλης χώνευσης (composting).

Σιούλας, Κ, Seadi, AL., Rutz, D., Prassl, H., Kothner, M., Finsterwalder, T., Volk, S., Jansser, R. 2009. Εγχειρίδιο Βιοαερίου, Αθήνα: ΚΑΠΕ.

Στεφανάκης, Κ.Ζ. 1995. Τα μανιτάρια. Εκδόσεις Σταμούλη.

Φραντζεσκάκης, Ι.Α. 1990. Βιολογία και καλλιέργεια των βρώσιμων μανιταριών. Εκδόσεις Γαρταγάνη.