

ΕΘΝΙΚΟ ΜΕΤΣΟΒΙΟ ΠΟΛΥΤΕΧΝΕΙΟ

ΣΧΟΛΗ ΧΗΜΙΚΩΝ ΜΗΧΑΝΙΚΩΝ

Τομέας IV:

Τομέας Σύνθεσης και Ανάπτυξης Βιομηχανικών Διαδικασιών
ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΟ ΒΙΟΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑΣ



Διπλωματική Εργασία:

ΠΑΡΑΓΩΓΗ ΒΙΟΑΙΘΑΝΟΛΗΣ ΑΠΟ ΣΤΕΛΕΧΗ ΒΑΜΒΑΚΙΟΥ

ΚΩΝΣΤΑΝΤΙΝΟΣ ΔΗΜΟΣ

Επιβλέπων:

Δ. ΚΕΚΟΣ

Αθήνα

Ιούνιος 2015

Στον παππού μου,
Κωνσταντίνο Δήμο

Ευχαριστίες

Η παρούσα διπλωματική εργασία εκπονήθηκε στο Εργαστήριο Βιοτεχνολογίας της Σχολής Χημικών Μηχανικών του Εθνικού Μετσόβιου Πολυτεχνείου υπό την επίβλεψη του Καθηγητή Ε.Μ.Π. Δημήτριου Κέκου. Αρχικά, θα ήθελα να ευχαριστήσω τον υπεύθυνο της διπλωματικής μου εργασίας, Καθηγητή του Ε.Μ.Π., Δημήτριο Κέκο για την ανάθεση του θέματος και τις γνώσεις που μας μετέδωσε με την διδασκαλία του αυτά τα χρόνια. Επίσης οφείλω ένα πολύ μεγάλο ευχαριστώ στην Δρ. Διομή Μαμμά για την επιστημονική υποστήριξη, την καθοδήγηση και τις πολύτιμες συμβουλές της, καθ' όλη την διάρκεια πραγματοποίησής της διπλωματικής καθώς και για την υπομονή που έδειξε.

Φυσικά θα ήθελα να ευχαριστήσω και όλα τα υπόλοιπα μέλη του εργαστηρίου βιοτεχνολογίας για την άψογη συνεργασία και το ευχάριστο κλίμα που μου προσέφεραν. Τέλος, θα ήθελα να δώσω τις βαθύτερες ευχαριστίες μου στην οικογένειά μου, για την στήριξή της, όχι μόνο κατά την εκπόνηση της παρούσας εργασίας αλλά καθ' όλη την διάρκεια του κύκλου σπουδών μου.

	Σελ.
ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ	
ΠΕΡΙΛΗΨΗ	i
ABSTRACT	ii
ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΚΗ ΕΠΙΣΚΟΠΗΣΗ	1
1. Γενικά	2
2 Βιοαιθανόλη	3
2.1. Σύνθεση βιοαιθανόλης	4
3. Βιομάζα	5
3.1. Βιομάζα - βασικά χαρακτηριστικά - περιεκτικότητα σε υγρασία	7
3.2. Λιγνοκυτταρινούχες πηγές βιομάζας	9
3.2.1. Φύση και σύσταση λιγνοκυτταρινούχου βιομάζας	9
3.2.2. Κυτταρίνη	11
3.2.3. Ημικυτταρίνη	12
3.2.4 Λιγνίνη	14
3.3. Στελέχη βαμβακιού	15
4. Σταδία μετατροπής της λιγνοκυτταρινούχου βιομάζας σε αιθανόλη	17
4.1 Προκατεργασία της πρώτης ύλης	19
4.1.1 Μέθοδοι προκατεργασίας	19
4.1.2 Φυσικές μέθοδοι προκατεργασίας	20
4.1.2.1 Μηχανικός κατακερματισμός	20
4.1.2.2 Πυρόλυση	20
4.1.2.3 Ακτινοβόληση	20
4.1.3 Φυσικοχημικές μέθοδοι προκατεργασίας	21
4.1.3.1. Προκατεργασία με έκρηξη ατμού (steam explosion)	21
4.1.3.2. Υδροθερόλυση	22
4.1.3.3. Εκτόνωση ίνας με αμμωνία (Ammonia fiber explosion, AFEX)	23
4.1.3.4. Έκρηξη CO ₂	24
4.1.4. Χημικές μέθοδοι προκατεργασίας	25
4.1.4.1. Οζονόλυση	25
4.1.4.2 Αλκαλική προκατεργασία	25
4.1.4.3. Οξινή προκατεργασία	25
4.1.4.4. Προκατεργασία με οργανικούς διαλύτες	26
4.1.4.5. Προκατεργασία με άλλους διαλύτες	27
4.1.5. Βιολογικές μέθοδοι προκατεργασίας	27
4.1.6. Παραγόμενοι παρεμποδιστές	30
4.2. Μέθοδοι υδρόλυσης – Χημική και ενζυμική υδρόλυση	32
4.2.1. Χημική υδρόλυση	32
4.2.2. Ενζυμική Υδρόλυση της κυτταρίνης	32
4.2.3. Προϋποθέσεις για τη επίτευξη αποτελεσματικής ενζυμικής υδρόλυσης	35
4.3. Διεργασίες παραγωγής αιθανόλης	36
4.4. Μικροοργανισμοί για την παραγωγή αιθανόλης	39
4.5. Παρεμποδιστικοί παράγοντες της αλκοολικής ζύμωσης	40
ΜΕΘΟΔΟΙ ΚΑΙ ΥΛΙΚΑ	44
1. Μικροοργανισμοί	45
2. Πρώτες ύλες και χημικά αντιδραστήρια	45
3. Όργανα	45
4. Προκατεργασία στελεχών βαμβακιού	45
5. Ενζυμική υδρόλυση προκατεργασμένων στελεχών βαμβακιού	46
6. Παραγωγή αιθανόλης από προκατεργασμένα στελέχη βαμβακιού	46
7. Προσδιορισμός αιθανόλης	47
8. Προσδιορισμός αναγωγικών σακχάρων	47

9. Προσδιορισμός συγκέντρωσης γλυκόζης με τη χρήση ειδικού εμπορικού διαγνωστικού σκευάσματος (kit)	47
10. Προσδιορισμός ολικής ενεργότητας κυτταρινασών	48
11. Μέτρηση παραγόμενων παρεμποδιστών	48
12. Ανάλυση στερεού υπολείμματος – Μέθοδος NREL	48
13. Προσδιορισμός δείκτη κρυσταλλικότητας	48
ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ	51
1. Προκατεργασία στελεχών	52
2. Ενζυμική υδρόλυση προκατεργασμένων στελεχών βαμβακιού	61
2.1. <i>Ενζυμική υδρόλυση αλκαλικά στελεχών βαμβακιού: επίδραση του ενζυμικού φορτίου</i>	61
2.2. <i>Ενζυμική υδρόλυση υγρού κλάσματος και στερεού υπολείμματος υδροθερμικής προκατεργασίας παρουσία οξέος στελεχών βαμβακιού: επίδραση του ενζυμικού φορτίου</i>	75
2.3 <i>Ενζυμική υδρόλυση στερεού υπολείμματος υδροθερμικής προκατεργασίας παρουσία οξέος στελεχών βαμβακιού: επίδραση του ενζυμικού φορτίου</i>	82
2.4 <i>Συμπεράσματα ενζυμικής υδρόλυσης</i>	91
3.Βιομετατροπή προκατεργασμένων στελεχών βαμβακιού με εφαρμογή μη ισοθερμοκρασιακής ταυτόχρονης σακχαροποίησης και ζύμωσης (NSSF)	94
3.1 <i>Βιομετατροπή στερεού υπολείμματος υδροθερμικής προκατεργασίας παρουσία οξέος στελεχών βαμβακιού</i>	94
3.2 <i>Βιομετατροπή στερεού υπολείμματος αλκαλικής προκατεργασίας στελεχών βαμβακιού: επίδραση του ενζυμικού φορτίου</i>	95
3.3 <i>Βιομετατροπή στερεού υπολείμματος αλκαλικής προκατεργασίας στελεχών βαμβακιού: επίδραση του χρόνου προϋδρόλυσης</i>	101
3.4 <i>Συμπεράσματα βιομετατροπής</i>	104
ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ	108
ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ	113

Περίληψη

Σκοπός της παρούσας διπλωματικής εργασίας ήταν η μελέτη της επίδρασης του είδους της προκατεργασίας και του ενζυμικού φορτίου στην υδρόλυση και τη ζύμωση προς παραγωγή αιθανόλης στελεχών βαμβακιού. Ειδικότερα τα στελέχη βαμβακιού υποβλήθηκαν σε δυο ειδών προκατεργασίες: (α) αλκαλική προκατεργασία με 0-10% (β/β) NaOH και συγκέντρωση στερεού 10 και 15% β/ο στους 121°C για 60 min, όπου βρέθηκε ότι μέγιστη χρησιμοποιηθείσα συγκέντρωση αλκάλειας (10%, β/β) απομακρύνθηκε περίπου το 30% της περιεχόμενης λιγνίνης και στις δύο συγκεντρώσεις CS (10 και 15% β/ο) και (β) υδροθερμική προκατεργασία παρουσία θεικού οξέος με συγκέντρωση υποστρώματος 15% β/ο, παρουσία 2%, β/β H₂SO₄, για 10 min στους 210 °C όπου παρατηρήθηκε πλήρη απομάκρυνση της ημικυτταρίνης και απομάκρυνση ποσοστού 23% της κυτταρίνης και 1% λιγνίνης. Ακολούθησε μελέτη της επίδρασης του ενζυμικού φορτίου (από 1 έως και 80 FPU/gr κυτταρίνης) με χρήση του εμπορικού σκευάσματος Cellic[®] CTec2 της εταιρείας Novozymes στην υδρόλυση (α) του στερεού υπολείμματος της αλκαλικής και υδροθερμικής προκατεργασίας και (β) του υγρού και στερεού ρεύματος της υδροθερμικής προκατεργασίας. Σε όλες τις περιπτώσεις η αύξηση του ενζυμικού φορτίου οδηγεί σε αύξηση του ποσοστού υδρόλυσης της κυτταρίνης. Ειδικότερα στην περίπτωση του στερεού υπολείμματος αλκαλικής προκατεργασίας στελεχών βαμβακιού ο μέγιστος βαθμός υδρόλυσης της κυτταρίνης βρέθηκε ίσος με 74.68 %, ενώ στην περίπτωση του στερεού υπολείμματος υδροθερμικής προκατεργασίας καθώς και στην ταυτόχρονη υδρόλυση του υγρού και στερεού ρεύματος της υδροθερμικής προκατεργασίας οι τιμές ανήλθαν στο 77.17 και 45.33% αντίστοιχα.

Ακολούθως πραγματοποιήθηκε βιομετατροπή σε αιθανόλη του στερεού υπολείμματος αλκαλικής και υδροθερμικής προκατεργασίας στελεχών βαμβακιού, σε υψηλή συγκέντρωση στερεών (15%, β/ο) όπου μελετήθηκε η επίδραση του ενζυμικού φορτίου. Όπως και στην υδρόλυση η αύξηση του ενζυμικού φορτίου οδηγεί σε αύξηση της παραγόμενης αιθανόλης. Ειδικότερα στην περίπτωση του στερεού υπολείμματος υδροθερμικής προκατεργασίας η μέγιστη παραγομενη αιθανόλη ανήλθε στα 15.31 g/L (10.21 g/100 g προκατεργασμένων στελεχών βαμβακιού, 44.52% της μέγιστης θεωρητικής) ενώ στην περίπτωση του στερεού υπολείμματος αλκαλικής προκατεργασίας στελεχών βαμβακιού η αιθανόλη ανήλθε στα 15.95 g/L

(10.63 g/100 g προκατεργασμένων στελεχών βαμβακιού, 33.86% της μέγιστης θεωρητικής).

Η αύξηση του χρόνου προϋδρόλυσης από 6 σε 14 ώρες οδήγησε σε αύξηση της παραγόμενης αιθανόλης (21.85 g/L, 14.63 g/100 g προκατεργασμένων στελεχών βαμβακιού, 46.38% της μέγιστης θεωρητικής). Επιπλέον αυξάνοντας τη συγκέντρωση του υποστρώματος από 15 σε 20% και διατηρώντας το χρόνο προϋδρόλυσης στις 14 ώρες παρατηρήθηκε περαιτέρω αύξηση της παραγόμενης αιθανόλης (34.80 g/L, 17.40 g/100 g προκατεργασμένων στελεχών βαμβακιού, 55.40% της μέγιστης θεωρητικής).

Abstract

The aim of this thesis was to study the effect of pretreatment type and enzyme loading on hydrolysis and fermentation of cotton stalks. More specifically cotton stalks were subjected to: (a) alkaline pretreatment with 0-10% (w/w) NaOH, at solid concentration of 10 and 15% w/v, at 121°C for 60 min, where it was found that at maximum NaOH concentration (10% w/v), about 30% of the lignin was removed for both CS concentrations (10 and 15% w/v) tested and (b) hydrothermal pretreatment in the presence of dilute sulfuric acid (substrate concentration 15% w/v, 2% w/w H₂SO₄, for 10 min at 210°C) where almost complete removal of hemicellulose was achieved and also 23% cellulose and 1% lignin removal. The pretreated materials were subjected to enzymatic hydrolysis using the commercial cellulolytic preparation Cellic[®] CTec2 (Novozymes). The effect of different enzyme loadings (from 1 to 80 FPU / gr cellulose) was studied on (a) the solid residue of alkaline and hydrothermal pretreatment and (b) the liquid fraction and solid residue of hydrothermal pretreatment. In all cases the increase of the enzyme loading leads to an increase in cellulose hydrolysis rate. Particularly in the case of the solid residue of alkaline pretreatment of cotton stalks the maximum degree of hydrolysis of cellulose was equal to 74.68%, while in the case of the solid residue hydrothermal pretreatment and the simultaneous hydrolysis of the liquid and solid stream hydrothermal pretreatment values amounted to 77.17 and 45.33 % respectively.

Subsequently held bioconversion of the solid residue of alkaline and hydrothermal pretreatment of cotton stalks to ethanol at high solids concentration (15% w/v)

wherein the effect of the enzyme loading was studied. As in the case of hydrolysis the increase of the enzyme load leads to an increase of ethanol production. Particularly in the case of the solid residue hydrothermal pretreatment maximum produced ethanol amounted to 15.31 g/L (10.21 g/100 g pretreated cotton stalks, 44.52% of the maximum theoretical), while in the case of the residue of alkaline pretreatment ethanol amounted to 15.95 g/L (10.63 g/100 g pretreated cotton stalks, 33.86% of the maximum theoretical).

Increasing time of pre-hydrolysis from 6 to 14 hours led to an increase of produced ethanol (21.85 g / L, 14.63 g/100 g pretreated cotton stalks, 46.38% of the maximum theoretical). Further increasing the concentration of the substrate from 15 to 20% and maintaining time pre-hydrolysis at 14 hours there was further increase of produced ethanol (34.80 g / L, 17.40 g/100 g pretreated cotton stalks, 55.40% of the maximum theoretical).

Βιβλιογραφική επισκόπηση

1. Γενικά

Οι αυξανόμενες απαιτήσεις σε καύσιμα και η ανησυχία για τις περιβαλλοντικές επιπτώσεις των ορυκτών καυσίμων καθώς και η σταδιακή εξάντληση τους έχουν οδηγήσει στην αναζήτηση νέων πηγών ενέργειας, πιο φιλικών προς το περιβάλλον τα λεγόμενα βιοκαύσιμα. Ως βιοκαύσιμα χαρακτηρίζονται όλα τα στερεά, υγρά και αέρια καύσιμα που προέρχονται από τη βιομάζα. Ως βιομάζα ορίζεται το βιοαποικοδομήσιμο κλάσμα προϊόντων, αποβλήτων και κατάλοιπων που προέρχονται από τις αγροτικές δραστηριότητες, τις δασοκομικές και τις συναφείς βιομηχανικές δραστηριότητες καθώς και το βιοαποικοδομήσιμο κλάσμα βιομηχανικών αποβλήτων και αστικών λυμάτων και απορριμμάτων.

Η βιομάζα αποτελεί πηγή ενέργειας που ανανεώνεται συνεχώς λόγω της φωτοσυνθετικής ικανότητας των φυτικών οργανισμών.

Οι βασικοί λόγοι για τους οποίους επιβάλλεται η χρήση των βιοκαυσίμων είναι η προστασία του περιβάλλοντος αφού παρατηρείται μείωση των εκπομπών επικίνδυνων ρυπαντών αερίων που επηρεάζουν σημαντικά την υγεία και ευθύνονται για το φαινόμενο του θερμοκηπίου, η μείωση της εξάρτησης από τις εισαγωγές συμβατικών ορυκτών καυσίμων και η δημιουργία νέων ευκαιριών για τον αγροτικό τομέα και τη βιομηχανία.

Ως προϊόντα ανανεώσιμων πηγών ενέργειας τα βιοκαύσιμα είναι βιοαποικοδομήσιμα και μη τοξικά, δεν περιέχουν αρωματικές ενώσεις και οι εκπομπές των ρυπαντών οξειδίων του θείου, μονοξειδίου του άνθρακα, άκαυστων υδρογονανθράκων και αιθάλης που προέρχονται από την καύση τους είναι πολύ χαμηλές.

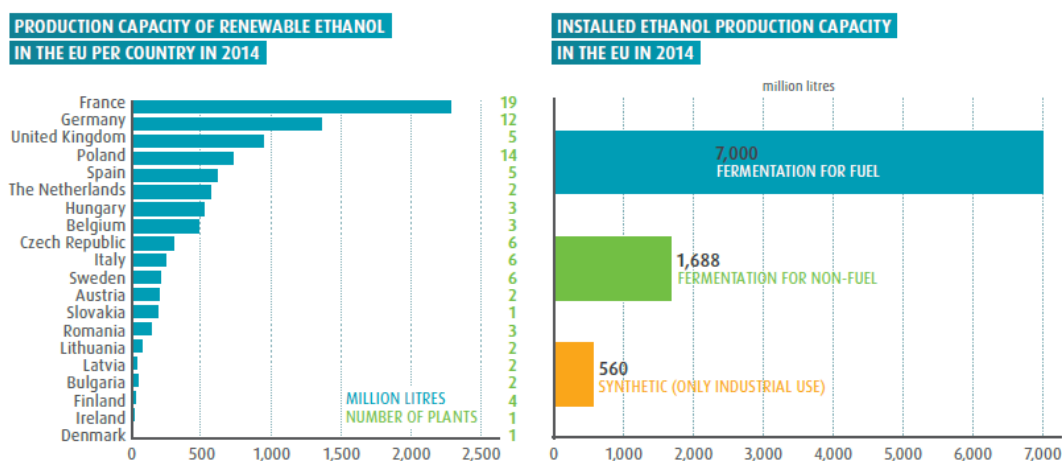
Παρόλα αυτά, η υποστήριξη της ανάπτυξης των βιοκαυσίμων σε πολλά κράτη ήρθε αντιμέτωπη με ανησυχίες για το περιβάλλον και την επάρκεια των τροφίμων. Η αλλαγή χρήσης των γεωργικών εκτάσεων για ενεργειακές καλλιέργειες έχει θεωρηθεί εν μέρει υπεύθυνη για την παγκόσμια έλλειψη τροφής και έχει συσχετιστεί με τις αυξανόμενες τιμές βασικών προϊόντων διατροφής όπως ο αραβόσιτος και το ρύζι. Για το λόγο αυτό η αναγνώριση εναλλακτικών πρώτων υλών για την παραγωγή βιοκαυσίμων αποτελεί προτεραιότητα.

Ως εναλλακτικές πρώτες ύλες μπορούν να χρησιμοποιηθούν λιγνοκυτταρινούχα υλικά όπου η χρήση τους πλεονεκτεί διότι εμφανίζουν χαμηλότερο κόστος.

2. Βιοαιθανόλη

Ο τομέας της βιοαιθανόλης στην Ε.Ε είναι μια νέα καινοτόμος ανερχόμενη βιομηχανία. Νέες τεχνολογίες και διεργασίες αναπτύσσονται συνεχώς που έχουν τη δυνατότητα να συμβάλουν στη μεγιστοποίηση χρήσης των φυσικών πόρων της Ευρώπης με απώτερο σκοπό ένα φιλικό προς το περιβάλλον καύσιμο. Παρά το γεγονός ότι η παραγωγή αιθανόλης στην ΕΕ και η κατανάλωση της συνεχώς αυξάνεται από το 2003, η Ευρώπη παραμένει σε σχετικά μέτριο επίπεδο παγκοσμίως. Στα 8,8 δισεκατομμύρια λίτρα παραγωγικής ικανότητας και μια τιμή αγοράς που πλησιάζει τα 8 δισεκατομμύρια, η ΕΕ είναι παγκοσμίως η τρίτη μεγαλύτερη παραγωγός αιθανόλης μετά τις ΗΠΑ και τη Βραζιλία. Οι κύριες ευρωπαϊκές χώρες που παράγουν αιθανόλη σύμφωνα με τα τελευταία στοιχεία του 2014 είναι η Γαλλία, Γερμανία και Αγγλία. Η Ελλάδα μέχρι στιγμής δεν παράγει καθόλου αιθανόλη ενώ σύμφωνα με την Ευρωπαϊκή οδηγία 2003/30/EK μέχρι το τέλος του 2010 το 5,75% της εγχώριας βενζίνης θα έπρεπε να αντικατασταθεί από βιοαιθανόλη ή άλλο συμβατό με τη βενζίνη πρόσθετο το οποίο εν έτη 2015 δεν έχει επιτευχθεί.

Σχήμα 2.1 Η παραγωγή βιοαιθανόλης στην ευρώπη

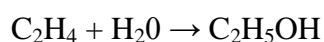


Η αιθανόλη είναι το πιο αποδοτικό και άμεσα διαθέσιμο καύσιμο για την μείωση των εκπομπών των αερίων του θερμοκηπίου στην Ευρώπη στον τομέα των μεταφορών, ο οποίος ευθύνεται σήμερα για πάνω από το ένα τέταρτο της συνολικής εκπομπής αερίων του θερμοκηπίου στην Ευρωπαϊκή Ένωση. Αυτή η μείωση εκτιμάται ότι μπορεί να φτάσει έως και 90% σε σχέση με τα ορυκτά καύσιμα.

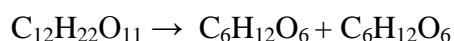
Η αιθανόλη είναι καύσιμο αριθμού οκτανίων 113 και με υψηλή περιεκτικότητα σε οξυγόνο (περίπου 35% κατά βάρος). Έτσι μπορεί να αυτοαναφλέγεται σε μεγαλύτερη συμπίεση από την βενζίνη επιτρέποντας στους κινητήρες να αποδίδουν πολύ μεγαλύτερη ισχύ. Μπορεί επομένως να χρησιμοποιηθεί και ως πρόσθετο αύξησης του αριθμού οκτανίων της βενζίνης. Με την ανάμιξή της με βενζίνη επιτυγχάνεται επίσης ο εμπλουτισμός του μίγματος του καυσίμου σε οξυγόνο, με αποτέλεσμα μια πιο ολοκληρωμένη καύση και κατά συνέπεια μειωμένες εκπομπές επικίνδυνων καυσαερίων. Η συνεισφορά της στο σχηματισμό οξειδίων του αζώτου είναι ασήμαντη (Vierhout, 2014).

2.1. Σύνθεση βιοαιθανόλης

Η συνθετική αιθανόλη παράγεται μέσω της καταλυτικής ενυδάτωσης (hydration) του αιθυλενίου, παράγωγου του πετρελαίου, σύμφωνα με την αντίδραση:



Η βιοαιθανόλη μπορεί να παραχθεί από πλήθος υδατανθράκων (με γενικό μοριακό τύπο: $(\text{CH}_2\text{O})_n$). Η ζύμωση της σακχαρόζης έχει πραγματοποιηθεί με τη χρήση εμπορικών ενζυμικών σκευασμάτων. Αρχικώς η σακχαρόζη υδρολύεται προς γλυκόζη και φρουκτόζη.



Στη συνέχεια, η γλυκόζη και η φρουκτόζη μετατρέπονται σε αιθανόλη.



Επίσης, το άμυλο μπορεί να μετατραπεί σε D-γλυκόζη, με τη βοήθεια του ενζύμου γλυκοαμυλάση. Αυτή η ενζυμική υδρόλυση ακολουθείται, στη συνέχεια, από τη ζύμωση, την απόσταξη και την αφυδάτωση με σκοπό την παραγωγή άνυδρης βιοαιθανόλης. Το καλαμπόκι, το οποίο περιέχει άμυλο σε ποσοστό 60-70%, αποτελεί τη βασική πρώτη ύλη παγκοσμίως για τη βιομηχανική παραγωγή βιοαιθανόλης από άμυλο.

Οι υδατάνθρακες (κυτταρίνη και ημικυτταρίνη) που βρίσκονται στα λιγνοκυτταρινούχα υλικά μπορούν να μετατραπούν σε βιοαιθανόλη αφού πρώτα λάβει χώρα η απολιγνινοποίηση, η επεξεργασία της ύλης με ατμό υπό πίεση και μία ελαφρά όξινη προ-υδρόλυση. Κατόπιν των σταδίων αυτών λαμβάνει χώρα η ενζυμική υδρόλυση και η ζύμωση. Το σημαντικότερο στάδιο της παραγωγής βιοαιθανόλης

αποτελεί το στάδιο της ενζυμικής επεξεργασίας της κυτταρίνης για την παραγωγή σακχάρων. Συνήθως του σταδίου αυτού προηγείται ένα στάδιο προκατεργασίας. Μέσω της υδρόλυσης διασπώνται οι δεσμοί υδρογόνου των ημικυτταρινών και κυτταρινών με αποτέλεσμα τη μετατροπή τους σε σάκχαρα: πεντόζες και εξόζες. Αυτά τα σάκχαρα μπορούν στη συνέχεια να υποστούν ζύμωση για την παραγωγή βιοαιθανόλης. Οι πιο συχνά χρησιμοποιούμενες μέθοδοι υδρόλυσης μπορούν να ταξινομηθούν σε δύο βασικές κατηγορίες: στη χημική υδρόλυση (με τη χρήση πυκνού ή αραιού οξέος) και στην ενζυμική υδρόλυση. Στη χημική υδρόλυση η προκατεργασία και η υδρόλυση μπορούν να υλοποιηθούν από κοινού σε ένα στάδιο (Sun & Cheng, 2002).

3. Βιομάζα

Βιομάζα είναι η οργανική ύλη, η οποία προέρχεται από ζώντες ή προσφάτως ζώντες οργανισμούς. Ως βιομάζα λογίζονται το ξύλο, τα ζωϊκά απόβλητα καθώς και τα φυτικά και δασικά υπολείμματα (κλαδοδέματα, άχυρα, ροκανίδια, καυσόξυλα, κουκούτσια). Η χημική σύσταση της βιομάζας παρουσιάζει γενικά υψηλή και μεταβλητή περιεκτικότητα σε υγρασία και ινώδη δομή, η οποία αποτελείται από λιγνίνη, υδατάνθρακες ή σάκχαρα και τέφρα.

Η βιομάζα αποτελείται από άνθρακα, υδρογόνο και οξυγόνο - επίσης μπορεί ακόμα να εμπεριέχει άζωτο και μικρές ποσότητες άλλων ατόμων, συμπεριλαμβανομένων των αλκαλίων, αλκαλικών γαιών και βαρέων μετάλλων.

Ένα από τα πιο σημαντικά θέματα στην παραγωγή βιοαιθανόλης είναι η διαθεσιμότητα των πρώτων υλών, η οποία μπορεί να ποικίλλει σημαντικά από εποχή σε εποχή και εξαρτάται από τη γεωγραφική τοποθεσία. Οι συχνές μεταβολές της τιμής των πρώτων υλών επηρεάζουν και το κόστος της παραγωγής βιοαιθανόλης, καθώς το κόστος των πρώτων υλών αποτελεί περισσότερο από το 1/3 του συνολικού κόστους παραγωγής (Tomás-Rejó *et al.* 2008, Kumar *et al.* 2008, Balat *et al.* 2008, Olofsson *et al.* 2008).

Υπάρχει μία ποικιλία φυτικών πηγών που μπορούν να παρέχουν τα σάκχαρα για την παραγωγή βιοαιθανόλης και κατηγοριοποιούνται με βάση τη σύστασή τους σε: (α) σακχαρούχες (όπως σακχαρότευτλο και σακχαροκάλαμο), (β) αμυλούχες (όπως σίτος, αραβόσιτος και κριθάρι) και (γ) λιγνινοκυτταρινούχες (Demirbaş 2005,

Sánchez & Cardona 2008, Balat *et al.* 2008, Tomás-Pejó *et al.* 2008). Στις τελευταίες κατατάσσονται :

1 Υπολείμματα απο την υλοτομία και τη βιομηχανία επεξεργασίας ξύλου

Τα ξυλώδη υπολείμματα που λαμβάνονται από την επεξεργασία του ξύλου (πριονίδι, ροκανίδι, θρύμματα ξύλου, κλπ.), καθώς και υπολείμματα ξυλείας που παράγονται κατά την υλοτόμηση των δέντρων είναι ακατάλληλα για περαιτέρω επεξεργασία, μπορούν να χρησιμοποιηθούν με διαφορετικούς τρόπους για την παραγωγή βιοενέργειας.

2 Υπολείμματα από τις γεωργικές δραστηριότητες

Αντίστοιχα με τα παραπροϊόντα της βιομηχανίας ξύλου, τα υπολείμματα από τις γεωργικές δραστηριότητες, όπως π.χ. το άχυρο, μπορεί να χρησιμοποιηθεί εναλλακτικά, για την παραγωγή φιλικής προς το περιβάλλον ενέργειας και καύσιμης ύλης. Εκτός από το άχυρο, τα κλαδέματα από τις δενδρώδεις καλλιέργειες μπορούν να αξιοποιηθούν και να μετατραπούν σε υψηλής ποιότητας βιοκαύσιμα, προσφέροντας, ταυτόχρονα, ένα επιπλέον έσοδο για τους παραγωγούς.

Οι καλλιέργειες ενεργειακών φυτών αποτελούν, επίσης, μια πρακτική παραγωγής βιομάζας. Είναι, δε, αρκετά διαδεδομένη, τα τελευταία χρόνια ακόμα και στη χώρα μας όπου πραγματοποιείται για την παραγωγή υγρών βιοκαυσίμων. Οι ενεργειακές καλλιέργειες μπορούν επίσης να χρησιμοποιηθούν για την παραγωγή ενέργειας, εναλλακτικών αέριων βιοκαυσίμων (βιοαέριο) καθώς και στερεών βιοκαυσίμων (pellets).

3 Υπολείμματα από τις κτηνοτροφικές δραστηριότητες

Το βασικό απόβλητο όλων των κτηνοτροφικών δραστηριοτήτων είναι η ζωική κοπριά. Το ζήτημα της αποτελεσματικής διαχείρισης της γίνεται ακόμα πιο έντονο κατά την μαζική εκτροφή ζώων (συνήθως βοοειδών, χοίρων και πουλερικών) σε περιορισμένους και συστεγασμένους χώρους.

Ο ιδανικότερος τρόπος διαχείρισης αυτών των αποβλήτων είναι η χρησιμοποίησή τους για την παραγωγή βιοενέργειας. Πιο συγκεκριμένα, με τη βοήθεια της τεχνολογίας της αναερόβιας χώνευσης τα υγρά ζωικά απόβλητα μετατρέπονται σε βιοαέριο, ένα εναλλακτικό και «πράσινο» βιοκαύσιμο.

Μετά την παραγωγή του, το βιοαέριο τροφοδοτείται σε σύστημα συμπαραγωγής ηλεκτρικής ενέργειας και θερμότητας, από την πώληση των οποίων προκύπτουν τα πολύ σημαντικά έσοδα της μονάδας βιοαερίου. Επιπλέον έσοδα μπορούν να

προκύψουν από την εμπορική εκμετάλλευση του χωνεμένου υπολείμματος της κοπριάς ως βιολογικό λίπασμα.

Η βιομάζα, συνεπώς, που λαμβάνεται από την εκτροφή ζώων ως απόβλητο, όχι μόνο δεν είναι άχρηστη, αλλά αποτελεί μια πολύ σημαντική πηγή εσόδων για τον παραγωγό καθώς και ένα τρόπο παραγωγής ηλεκτρικής ενέργειας με φιλικό για το περιβάλλον και τον άνθρωπο τρόπο. Συνιστά έναν ανεκμετάλλευτο πλούτο, τον οποίο έχουν αναγνωρίσει όλες οι αναπτυγμένες χώρες εδώ και χρόνια, γι αυτό και επενδύουν σε αυτόν διαρκώς.

4 Υπολείμματα από τη βιομηχανία παραγωγής τροφίμων

Τα απόβλητα των βιομηχανιών παραγωγής τροφίμων, είτε βρίσκονται σε στερεά ή σε υγρή μορφή, μπορούν να αξιοποιηθούν ενεργειακά, επίσης μέσω της τεχνολογίας της αναερόβιας χώνευσης και της παραγωγής βιοαερίου.

Έτσι, υγρά απόβλητα που φημίζονται για το υψηλό ρυπαντικό τους φορτίο (π.χ. απόβλητα σφαγείων, απόβλητα χυμοποιείων, ζυθοποιείων και βιομηχανιών επεξεργασίας φρούτων και λαχανικών) και την έντονη ρύπανση που προκαλούν κατά την ανεξέλεγκτη διάθεση τους, σταματούν, πλέον, να αποτελούν πρόβλημα για τους παραγωγούς καθώς μετατρέπονται σε ηλεκτρική ενέργεια. Με αυτόν τον τρόπο διαχείρισης των αποβλήτων προκύπτουν πολλαπλά οφέλη: διακόπτεται η περιβαλλοντική υποβάθμιση των υδάτινων αποδεκτών από την λειτουργία των ρυπογόνων βιομηχανιών με τρόπο που όχι μόνο δεν κοστίζει στον παραγωγό του αποβλήτου, αλλά του προσφέρει επιπλέον έσοδα από την πώληση της εναλλακτικής. Αντιστοίχως και για τα στερεά οργανικά απόβλητα βιομηχανιών τροφίμων, υπάρχουν αποτελεσματικές τεχνολογίες χρήσης τους για την παραγωγή βιοαερίου και ηλεκτρικής ενέργειας.

Οι ενεργειακές καλλιέργειες (όπως σόργο και switch grass) φαίνεται να αποτελούν την μεγαλύτερη, πολλά υποσχόμενη, μελλοντική πηγή βιομάζας για παραγωγή βιοκαυσίμων (Tomás-Rejón *et al.* 2008).

3.1. Βιομάζα - βασικά χαρακτηριστικά - περιεκτικότητα σε υγρασία

Ανεξαρτήτως της πηγής προέλευσής της, οι διεργασίες μετατροπής της βιομάζας σε ενέργεια επηρεάζονται από τα φυσικοχημικά χαρακτηριστικά της.

Οι τιμές των ιδιοτήτων αυτών δεν είναι σταθερές και μπορεί να διαφέρουν σημαντικά αναλόγως της πηγής προέλευσης της βιομάζας. Τα εν λόγω χαρακτηριστικά δεν

επηρεάζουν μόνο από τεχνικής πλευράς τα έργα αξιοποίησης της βιομάζας αλλά, τελικά, τη βιωσιμότητα ολόκληρης της επένδυσης. Κατά συνέπεια, η πλήρης κατανόηση της σημασίας τους είναι βασική για την εξέταση της κάθε διεργασίας ενεργειακής αξιοποίησης της βιομάζας.

Οι ιδιότητες που θεωρούνται περισσότερο καθοριστικές είναι:

- Η περιεκτικότητα σε υγρασία
- Η περιεκτικότητα σε τέφρα
- Η περιεκτικότητα σε πτητικά στερεά
- Η περιεκτικότητα σε αλκαλικά μέταλλα
- Η θερμογόνος δύναμη
- Η πυκνότητα

Περιεκτικότητα σε υγρασία

Η περιεκτικότητα σε υγρασία ορίζεται ως η ποσότητα νερού που βρίσκεται στη βιομάζα και μετράται ως ποσοστό επί του βάρους του υλικού. Η περιεκτικότητα σε υγρασία έχει πολύ βασική επίδραση στην ενεργειακή μετατροπή της βιομάζας, είτε πρόκειται για θερμοχημική μετατροπή (π.χ. καύση) ή για βιοχημική (π.χ. ζύμωση).

Η υγρασία μπορεί να κυμαίνεται από λιγότερο του 10%, για κάποια αγροτικά υπολείμματα όπως το άχυρο και τα τσόφλια, μέχρι πάνω από 60%, π.χ. για την βαγάσση. Το ξύλο, το οποίο είναι βασική πηγή μεγάλων ποσοτήτων βιομάζας, έχει κατά μέσο όρο υγρασία μεταξύ 40 και 50%. Η βιομάζα που προέρχεται από κτηνοτροφικά απόβλητα (π.χ. κοπριά) ή από οργανικά υγρά απόβλητα (π.χ. τυρόγαλα) έχει γενικά πολύ υψηλή υγρασία, γεγονός που την καθιστά ευκολότερη στην μεταφορά της μέσω αντλιών.

Οι βιοχημικές διεργασίες (π.χ. αναερόβια χώνευση) απαιτούν υλικά με υψηλή περιεκτικότητα σε υγρασία ώστε να επιτύχουν την αποδοτική μετατροπή τους σε ενέργεια, σε αντίθεση με τις θερμοχημικές (π.χ. καύση) όπου η υψηλή υγρασία έχει αρνητική επίδραση στην ενεργειακή τους απόδοση.

Αναφορικά με τη βιομάζα που λαμβάνεται από τη γεωργία (είτε αυτούσια ή ως παραπροϊόν) η περιεκτικότητα σε υγρασία της βιομάζας εξαρτάται σε μεγάλο βαθμό από τις καιρικές συνθήκες κατά την περίοδο συλλογής της. (www.biomassenergy.gr).

Στον πίνακα 3.1 παρουσιάζονται οι συνήθεις περιεκτικότητες σε υγρασία μερικών εκ των σημαντικότερων πηγών βιομάζας.

Πίνακας 3.1 Περιεκτικότητα σε υγρασία διαφόρων πηγών βιομάζας

Πηγή Βιομάζας	Περιεκτικότητα σε υγρασία (υγρή βάση)
Θρύμματα ξύλου	10-60 %
Pellets ξύλου	8-12 %
Άχυρο	20-30 %
Υπολείμματα βαμβακιού	10-20 %
Switchgrass	30-70 %
Βαγάση	40-60 %
Τυρόγαλα	93-97 %
Ενσίρωμα καλαμποκιού	65-75 %
Γλυκό σόργο	20-70 %
Αγριαγκινάρα	15-20 %

3.2. Λιγνοκυτταρινούχες πηγές βιομάζας

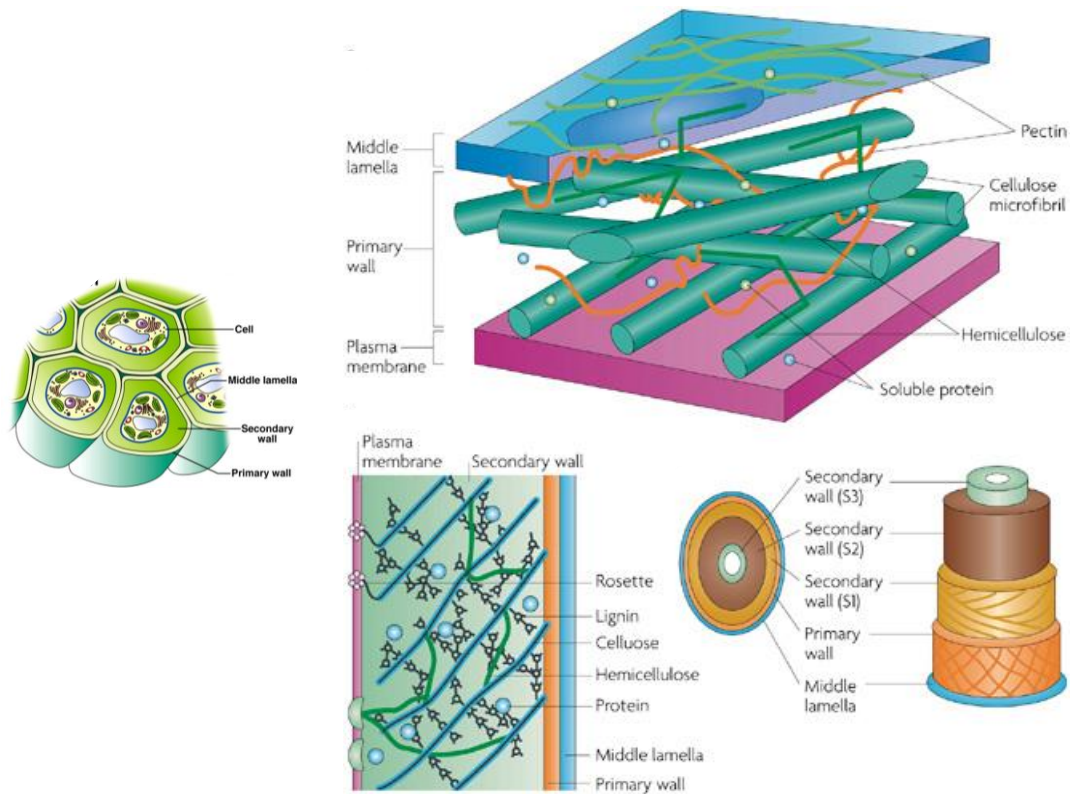
Οι λιγνινοκυτταρινούχες πρώτες ύλες συνιστούν ένα οικονομικό και ανανεώσιμο φυσικό πόρο, αποτελώντας το 50% της παγκόσμιας βιομάζας. Οι πηγές λιγνινοκυτταρινούχου βιομάζας είναι δασικά, αγροτικά κατάλοιπα και ενεργειακές καλλιέργειες, πηγές μη εδώδιμες, καθιστώντας το συγκεκριμένο κλάσμα της φυτικής βιομάζας ελκυστικό καθώς δεν ανταγωνίζεται τη βιομηχανία τροφίμων και επιπροσθέτως είναι αρκετά πιο φθινό από τις σακχαρούχες-αμυλούχες πρώτες ύλες.

3.2.1. Φύση και σύσταση λιγνοκυτταρινούχου βιομάζας

Η κατανόηση της λιγνοκυτταρινούχου βιομάζας, ιδιαίτερα της χημικής της σύνθεσης, αποτελεί προϋπόθεση για την ανάπτυξη αποτελεσματικών τεχνολογιών επεξεργασίας για την αποδόμηση της άκαμπτης δομής της, το σχεδιασμό ενζύμων για την απελευθέρωση των σακχάρων, ειδικά κυτταρινασών για την απελευθέρωση της γλυκόζης από την κυτταρίνη, καθώς και μικροοργανισμών για τη μετατροπή των σακχάρων σε αιθανόλη και άλλα βιο-χημικά προϊόντα.

Η λιγνοκυτταρινούχος βιομάζα συντίθεται κυρίως από το κυτταρικό τοίχωμα των φυτών, με τους δομικούς υδατάνθρακες (κυτταρίνη, ημικυτταρίνη και λιγνίνη) ως κύρια συστατικά της. Ωστόσο, το περιεχόμενό της ποικίλλει σημαντικά, ανάλογα με το είδος, την ποικιλία, το κλίμα, τη γονιμότητα του εδάφους και τη μέθοδο

καλλιέργειας της. Κατά μέσο όρο, για τα γεωργικά υπολείμματα, όπως κοτσάνια καλαμποκιού, σιταριού, βαμβακιού, άχυρο και ρύζι, τα κυτταρικά τους τοιχώματα περιέχουν περίπου 40% κυτταρίνη, ημικυτταρίνη 30% και 15% λιγνίνη (Pauly & Keegstra, 2008). Το χαρακτηριστικό των φυτικών κυτταρικών τοιχωμάτων είναι η δομή δύο μερών που έχουν, όπως απεικονίζεται στο Σχήμα 3.1. Ένα πρωτογενές κυτταρικό τοίχωμα αναπτύσσεται με την κυτταρική διαίρεση, και διευρύνεται κατά τη διάρκεια της ανάπτυξης του κύτταρου σε μια δομή με κρυσταλλικά μικροϊνδία κυτταρίνης που ενσωματώνονται σε μια μήτρα από πολυσακχαρίτες και πρωτεΐνες πχ ημικυτταρίνη. Τα πρωτεύοντα τοιχώματα των γειτονικών κυττάρων συγκρατούνται μεταξύ τους με μια κολλώδη στρώση που ονομάζεται middle lamella και αποτελείται από πηκτίνες.



Σχήμα 3.1 Δομή φυτικού κυτταρικού τοιχώματος

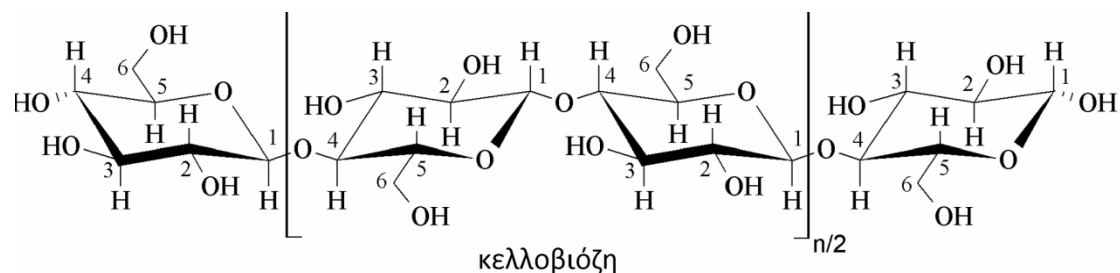
Όταν σταματάει η ανάπτυξη των κυττάρων ένα δευτερεύον κυτταρικό τοίχωμα σταδιακά αποτίθεται μεταξύ της μεμβράνης και του πρωτογενούς κυτταρικού τοιχώματος το οποίο αυξάνει τη μηχανική αντοχή μέσω της ενσωμάτωσης λιγνίνης, η οποία αντιπροσωπεύει το μεγαλύτερο μέρος της λιγνοκυτταρινούχου βιομάζας που

μπορεί να μετατραπεί σε βιο- καύσιμο. Μετά την νέκρωση αυτών των κυττάρων δημιουργείται ο ξυλώδης κορμός των δέντρων. Γενικά η κυτταρίνη προσδίδει την ακαμψία στους φυτικούς ιστούς. Για να παρέχει όμως την ακαμψία υπάρχουν και άλλα υλικά που πρέπει να επικοληθούν και να συνδέσουν κολλώντας τους πολυσακχαρίτες μαζί. Η ημικυτταρίνη παρέχει το υλικό επικόλλησης ενώ η λιγνίνη λειτουργεί σαν κόλλα.

3.2.2. Κυτταρίνη

Η κυτταρίνη αποτελεί το σημαντικότερο συστατικό των φυτικών κυτταρικών τοιχωμάτων. Αποτελεί ένα γραμμικό πολυμερές μονάδων D-γλυκόζης συνδεδεμένων μεταξύ τους με β -1,4 γλυκοζιτικό δεσμό.

Λόγω του δεσμού αυτού ο δισακχαρίτης κελλοβιόζη αποτελεί την επαναλαμβανόμενη δομική μονάδα της αλυσίδας της κυτταρίνης (Σχήμα 3.2)



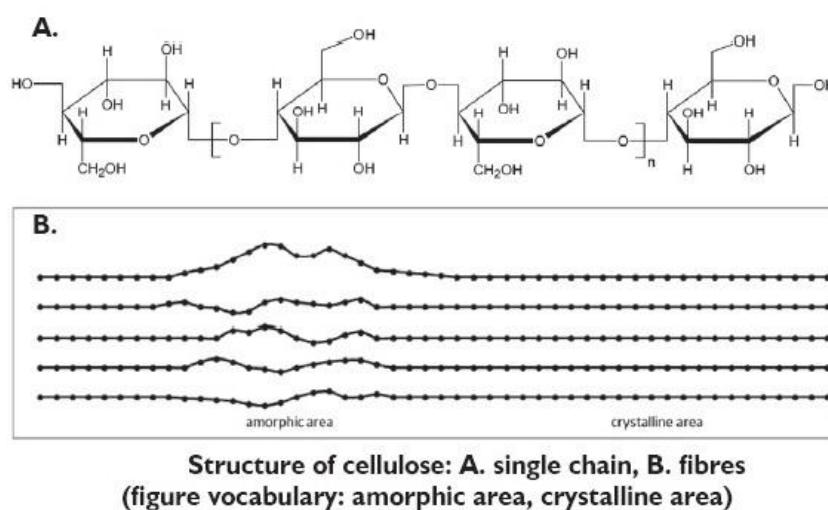
Σχήμα 3.2 Δομή κυτταρίνης

Ο βαθμός πολυμερισμού της κυτταρίνης κυμαίνεται από 7000 έως 15000 μονάδες γλυκόζης.

Τα πολυμερή κυτταρίνης παρουσιάζονται ως διατεταγμένες δομές (μικροϊνίδια) οι οποίες συγκρατούνται μεταξύ τους με διαμοριακούς δεσμούς υδρογόνου, καθώς και με διαμοριακές δυνάμεις van der Waals. Η κύρια λειτουργία τους είναι να εξασφαλίσουν την ακαμψία του κυτταρικού τοιχώματος των φυτών. Τα μικροϊνίδια έχουν διάμετρο 2-20 nm και μήκος 100-40000 nm και το καθένα περιέχει μέχρι 36 αλυσίδες κυτταρίνης. Η κυτταρίνη είναι ένας αδιάλυτος πολυσακχαρίτης που σχηματίζει κρυσταλλικές περιοχές. Αυτές σχηματίζονται από τους δεσμούς υδρογόνου που δημιουργούνται μεταξύ μορίων γλυκόζης της ίδιας αλυσίδας κυτταρίνης ($O3-H \rightarrow O5'$ και $O6 \rightarrow H-O2'$), καθώς και τους δεσμούς υδρογόνου που σχηματίζονται μεταξύ μορίων γλυκόζης που ανήκουν σε διαφορετικές αλυσίδες κυτταρίνης ($O6-H \rightarrow O3'$). Ένα μέρος της κυτταρίνης είναι άμορφο και

παρεμβάλλεται μεταξύ των κρυσταλλικών περιοχών. Οι αλυσίδες κυτταρίνης προσανατολίζονται παράλληλα σε πολύ κοντινές αποστάσεις μεταξύ τους λόγω των υδρογονικών δεσμών και δημιουργούνται έτσι συμπαγείς και δύσκολα αποικοδομήσιμες περιοχές οι κρυσταλλικές περιοχές. Έχουν βαθμό κρυσταλλικότητας περίπου 70%. Υπάρχουν όμως και κάποια σημεία όπου οι αλυσίδες δεν είναι διατεταγμένες παράλληλα. Αυτά τα σημεία λέγονται άμορφες περιοχές οι οποίες είναι πολύ υγροσκοπικές.(Jaworska & Vogt, 2013).

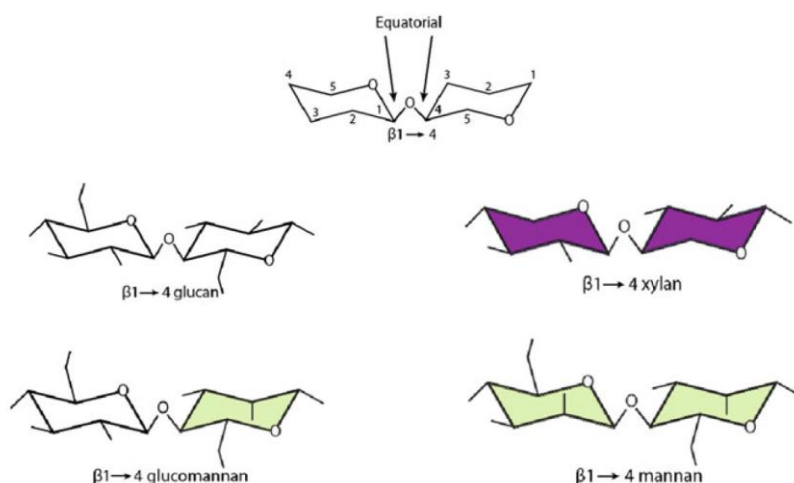
Cellulose and its derivatives



Σχήμα 3.3 Άμορφες και κρυσταλλικές περιοχές στην κυτταρίνη.(Jaworska & Vogt, 2013).

3.2.3. Ημικυτταρίνη

Η ημικυτταρίνη είναι ένας ετεροπολυσακχαρίτης που αποτελείται κυρίως από πεντόζες (C5) όπως D-ξυλόζη, αραβινόζη οι οποίες με τους β(1,4) δεσμούς σχηματίζουν την ραχοκοκαλιά και εξόζες όπως μαννόζη γλυκόζη και γαλακτόζη ως την επαναλαμβανόμενη μονάδα, οι οποίες έχουν την ίδια ισημερινή διαμόρφωση στα C1 και C4 όπως απεικονίζεται παρακάτω στο σχήμα 3.4.



Σχήμα 3.4 Επαναλαμβανόμενες μονάδες στην ημικυτταρίνη.

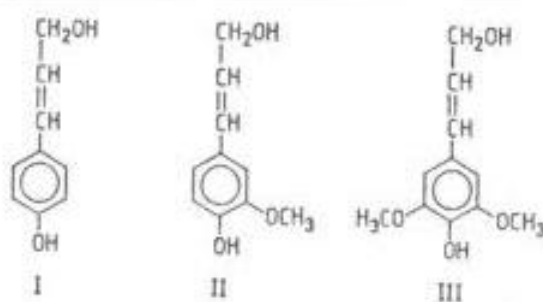
Η δομική ομοιότητα των ημικυτταρινών με τους β -1,4-γλυκοζιτικούς δεσμούς του μορίου της κυτταρίνης ενισχύεται από μια διαμορφωτική ομολογία, η οποία μπορεί να οδηγήσει σε μια ισχυρή μη ομοιοπολική σύνδεση με μικροϊνίδια κυτταρίνης. Σε αντίθεση με την κυτταρίνη η οποία είναι κρυσταλλική και ανθεκτική στην αποδόμηση, η ημικυτταρίνη είναι άμορφη, και έτσι εύκολα υδρολύεται προς μονομερή σάκχαρα. Ωστόσο, οι ημικυτταρίνες ενσωματώνονται και αλληλεπιδρούν με την κυτταρίνη και την λιγνίνη, οι οποίες αυξάνουν σημαντικά την αντοχή και τη σκληρότητα των φυτικών κυτταρικών τοιχωμάτων (Zhao, et al, 2011).

Η ξυλάνη αποτελεί το κυριότερο συστατικό της ημικυτταρίνης και αποτελεί το δεύτερο πιο άφθονο πολυσακχαρίτη στη φύση μετά την κυτταρίνη. Εντοπίζεται κυρίως στη ενδιάμεση περιοχή ανάμεσα στην κυτταρίνη και την λιγνίνη των δευτεροταγών κυτταρικών τοιχωμάτων αν και περιέχεται και στα πρωτοταγή κυτταρικά τους τοιχώματα. Ανεξάρτητα από το είδος του κυτταρικού τοιχώματος στο οποίο βρίσκεται η ξυλάνη αλληλεπιδρά με τα άλλα δομικά συστατικά του και συγκεκριμένα με μικροϊνίδια κυτταρίνης, πρωτεΐνες, πηκτινικούς πολυσακχαρίτες και τις περισσότερες φορές με λιγνίνη. Συνήθως συνδέεται με ομοιοπολικούς δεσμούς με την λιγνίνη μέσω φαινολικών οξέων και με μη ομοιοπολικούς δεσμούς (δεσμούς υδρογόνου) με τους άλλους πολυσακχαρίτες. Οι ξυλάνες ουσιαστικά λειτουργούν σαν συνδετικός ιστός ανάμεσα στην κυτταρίνη και τη λιγνίνη ώστε να εξασφαλιστεί η συνεκτικότητα και η ακεραιότητα των κυτταρικών τοιχωμάτων.

Η ξυλάνη αποτελείται από μια κεντρική αλυσίδα μορίων D-ξυλοπυρανόζης ενωμένων μεταξύ τους με β-1,4-γλυκοζιτικούς δεσμούς. Σε αντίθεση με την κυτταρίνη η δομή της ξυλάνης έχει μια εξαιρετική ποικιλομορφία και εξαρτάται από την πηγή προέλευσης της. Η δομή της μπορεί να είναι από μια απλή, σχεδόν γραμμική, μη υποκατεστημένη αλυσίδα, όπως σε μερικά ποώδη φυτά, μέχρι ένα πολύπλοκο σύμπλεγμα ετεροπολυσακχαριτών με πολύ υψηλό βαθμό διακλαδώσεων όπως αυτή που περιέχεται στους σπόρους των δημητριακών.

3.2.4. Λιγνίνη

Το σπουδαιότερο και πιο άφθονο (μετά την κυτταρίνη) συστατικό της φυτικής βιομάζας είναι η λιγνίνη. Η λιγνίνη είναι πολυμερές πολύ μεγάλου βαθμού πολυμερισμού (100.000-300.000), έντονα υδρόφοβη και ανθεκτική χημικά και θερμικά που αποτελεί τη βασική συγκολλητική ουσία του ξύλου. Η παρουσία της στη φύση είναι στενά συνδεδεμένη με την κυτταρίνη δεν βρίσκεται όμως σ' όλα τα φυτικά είδη (π.χ. βρύα, λειχήνες, φύκη). Το ποσοστό της στα είδη ξύλου ποικίλλει από 17-35% ωστόσο, σε ξύλο κωνοφόρων υπάρχει κατά κανόνα περίπου 20-30% περισσότερη λιγνίνη απ' ότι σε ξύλο πλατυφύλλων. Αν και αποτελεί σημαντικό υπόλειμμα σε βιομηχανικές διεργασίες (π.χ. παραγωγή χαρτοπολτού και σακχάρων), η αξιοποίηση της λιγνίνης είναι πολύ περιορισμένη. Είναι πολύπλοκο τρισδιάστατο πολυμερές με βασική δομική μονάδα το φαινυλοπροπάνιο. Υπάρχουν τρία διαφορετικά φαινυλοπροπάνια στη λιγνίνη κι αυτό κάνει τη χημική διαφορά μεταξύ κωνοφόρων & πλατυφύλλων.



Σχήμα 3.5 Φαινυλοπροπάνια της λιγνίνης

Οι δεσμοί στη λιγνίνη είναι αιθερικοί δεσμοί καθώς και δεσμοί άνθρακα-άνθρακα. Η λιγνίνη ενώνεται με χημικούς δεσμούς και με τις ημικυτταρίνες και με την κυτταρίνη. Η διάγκωσή της είναι χαμηλή. Υδρολύεται δύσκολα κυρίως με 24 αλκαλικά

διαλύματα σε υψηλές θερμοκρασίες (150-180). Τέλος, πρέπει να σημειωθεί ότι η λιγνίνη προσδίδει υψηλή αντοχή σε κάμψη, θλίψη και κρούση.

Πίνακας 3.2 Σύσταση λιγνινοκυτταρινούχων υλικών (% , ξηρό β/β).

Πρώτη ύλη	Κυτταρίνη	Ημικυτταρίνη	Λιγνίνη
Λεύκα ^[1]	44	22	26
Πεύκο ^[3]	44	22	28
Switch grass ^[3]	32	25	18
Φλοιός ρυζιού ^[2]	36	15	19
Άχυρο σίτου ^[1]	30	22	17
Άχυρο κριθαριού ^[2]	40	20	15
Στέλεχος αραβόσιτου ^[1]	38	30	23
Σπάδικας αραβόσιτου ^[2]	42	39	14
Στέλεχος βαμβακιού ^[4]	37.96	14.74	25.79

^[1] Tomás-Pejó *et al.* 2008, ^[2] Chandel *et al.* 2007, ^[3] Balat *et al.* 2008, ^[4] Παρούσα εργασία

3.3. Στελέχη βαμβακιού

Το βαμβάκι ανήκει στην οικογένεια *Malvaceae* και το γένος *Gossypium*. Στο γένος *Gossypium* έχουν εντοπιστεί 36 διαφορετικά είδη, 32 αυτοφυή και 4 καλλιεργούμενα (Αυγουλάς, 1995)

Καλλιεργείται σε περισσότερες από 90 χώρες. Για πολλές από αυτές αποτελεί κύρια πηγή εργασίας και συναλλάγματος. Σύμφωνα με τον Food and Agriculture Organization of the United Nations (FAO, 2013), οι κυριότερες χώρες παραγωγής βαμβακιού είναι η Κίνα, η Ινδία, οι Ηνωμένες Πολιτείες, το Πακιστάν, η Βραζιλία, το Ουζμπεκιστάν, η Τουρκία, η Συρία και το Τουρκμενιστάν ακολουθούν το Μεξικό, το Σουδάν, η Ελλάδα, η Αίγυπτος, η Τανζανία κ.α. (Πίνακας 3.3).

Στην Ελλάδα, στους νομούς Βοιωτίας, Φθιώτιδας, Λάρισας, Καρδίτσας, Τρικάλων, Θεσσαλονίκης, Σερρών, Ροδόπης και Ξάνθης πάνω από 100.000 γεωργικές εκμεταλλεύσεις ασχολούνται με την καλλιέργεια του βάμβακος.

Πίνακας 3.3. Παγκόσμια παραγωγή βάμβακος (FAO, 2013)

Country	Value (tonnes)
Afghanistan	13917
Angola	1000
Argentina	190000
Albania	230
Australia	898000
Bangladesh	18400
Bolivia (Plurinational State of)	29000
Botswana	300
Brazil	1127675
Myanmar	135000
Burundi	946
Central African Republic	8000
Chad	36000
Cameroon	78000
China, mainland	6298989
Colombia	23800
Costa Rica	240
Azerbaijan	14900
Benin	107000
Egypt	106000
El Salvador	266
Ecuador	1430
Ghana	5600
Greece	280000
Guatemala	790
Honduras	820
India	6052000
Indonesia	1198
Guinea	15000
Iran (Islamic Republic of)	67000
Iraq	12500
Kazakhstan	190900
Israel	14000
Côte d'Ivoire	133500
Kyrgyzstan	21800
Kenya	4150
Democratic People's Republic of Korea	13000

Σύμφωνα με τα πρώτα στοιχεία της διαχειριστικής επιτροπής υφαντικών ινών της Ευρωπαϊκής Ένωσης η καλλιεργηθείσα έκταση με βαμβάκι εμφανίζεται αυξημένη τόσο στη χώρα μας, όσο και στην Ισπανία. Οι εκτιμήσεις της επιτροπής ανεβάζουν

την ελληνική καλλιεργηθείσα έκταση με βαμβάκι στα 2.800.000 - 3.000.000 στρέμματα το 2010, έναντι 2.360.000 στρεμμάτων το 2009 και 2.670.000 στρεμμάτων το 2007.

Τα παραπάνω επιβεβαιώνονται και από τη μηνιαία έκθεση της Διεθνούς Συμβουλευτικής επιτροπής Βάμβακος (ICAC), σύμφωνα με την οποία η Ελλάδα, η Τουρκία, οι χώρες της κεντρικής Ασίας και οι ΗΠΑ, προβλέπεται να εμφανίσουν αυξημένη συγκομιδή το 2010/2011 για πρώτη φορά μετά από πέντε συναπτά έτη. Στην έκθεση αναφέρεται ότι η συνολική παγκόσμια έκταση με βαμβάκι θα αυξηθεί επίσης για πρώτη φορά μετά από τέσσερα συνεχή έτη, φτάνοντας τα 327 εκατ. στρέμματα. Η ετήσια παραγωγή συσπόρου βαμβακιού στην Ελλάδα το έτος 2000 σύμφωνα με στοιχεία του Οργανισμού Βάμβακος ήταν 1.230.000 τόνοι. Η ετήσια παραγωγή των στελεχών βαμβακιού υπολογίζεται σε 984.000 τόνους περίπου (80% του βάρους του συσπόρου βαμβακιού). Τα στελέχη αυτά συνήθως δέναξιοποιούνται γιατί ενσωματώνονται στο έδαφος με το όργωμα. Τα στελέχη βαμβακόφυτου θεωρούνται υπολείμματα γεωργικής ύλης και χαρακτηρίζονται ως λιγνοκυτταρινούχα βιομάζα, λόγω της σύστασής τους

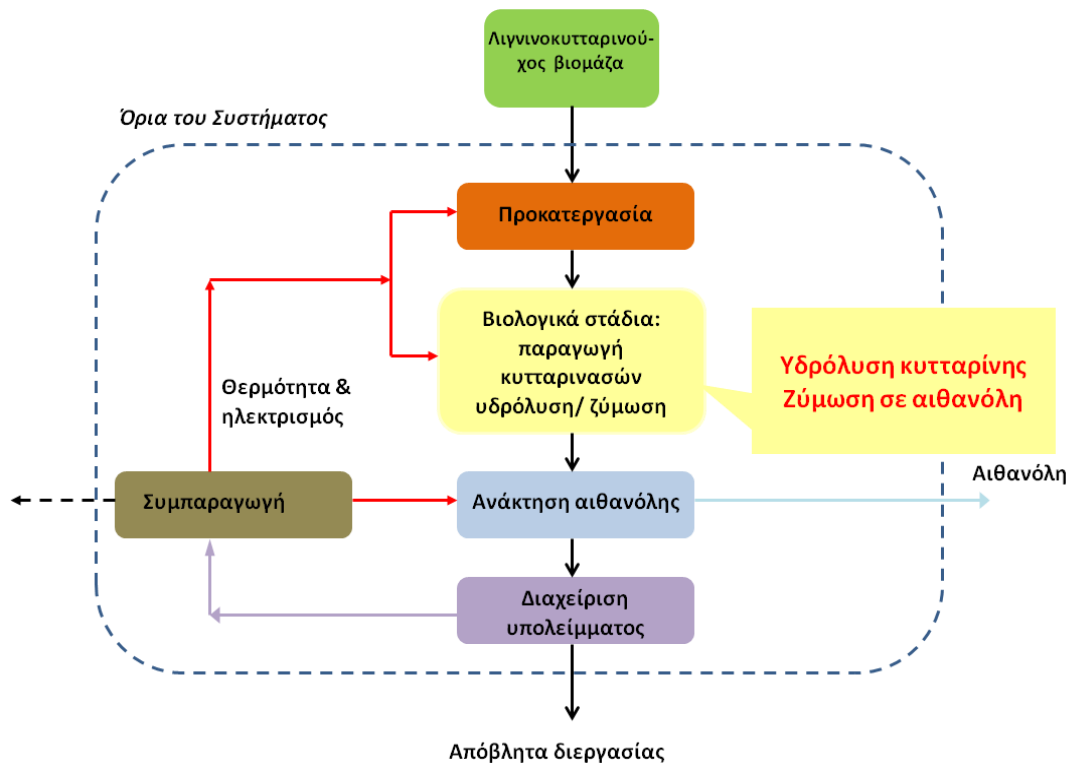
4. Σταδία μετατροπής της λιγνοκυτταρινούχου βιομάζας σε αιθανόλη

Η βιομετατροπή των λιγνινοκυτταρινούχων υλικών προς βιοαιθανόλη περιλαμβάνει συνήθως διεργασίες πολλών σταδίων (Σχήμα 4.1). Τα στάδια αυτά περιλαμβάνουν τα εξής: (α) προκατεργασία (φυσική, χημική, βιολογική) για την απελευθέρωση της κυτταρίνης και ημικυτταρίνης από τη λιγνίνη, (β) ενζυμική υδρόλυση των πολυμερών για την παραγωγή άμεσα μεταβολίσιμων σακχάρων (εξόζες και πεντόζες), (γ) βιομετατροπή (ζύμωση) των παραγόμενων σακχάρων σε αιθανόλη και (δ) διαχωρισμός, καθαρισμός και απόσταξη της αιθανόλης (Demirbaş 2009, Mosier *et al.* 2005, Hamelinck *et al.* 2005, Chandel *et al.* 2007, Cardona & Sánchez 2007, Balat *et al.* 2008, Margeot *et al.* 2009).

Η διεργασία παραγωγής βιοαιθανόλης από λιγνινοκυτταρινούχα υλικά έχει ομοιότητες με τις αντίστοιχες διεργασίες από άμυλο, συνοδεύεται όμως από τεράστιες τεχνικο-οικονομικές προκλήσεις. Σήμερα είναι διαθέσιμες διάφορες τεχνολογίες για όλα τα στάδια που εμπλέκονται στη βιομετατροπή των λιγνινοκυτταρινούχων υλικών προς αιθανόλη. Ανεξάρτητα από ποια θα επιλεγεί, τα παρακάτω χαρακτηριστικά θα πρέπει να εκτιμηθούν σε σύγκριση με τις εδραιωμένες

τεχνολογίες παραγωγής βιοαιθανόλης από σακχαρούχα και αμυλούχα υποστρώματα (Hahn-Hagerdal *et al.* 2006, Balat *et al.* 2008).

- Αποτελεσματικός αποπολυμερισμός της κυτταρίνης και ημικυτταρίνης σε διαλυτά σάκχαρα.
- Αποτελεσματική ζύμωση του μίγματος σακχάρων μετά την υδρόλυση, που περιέχει εξόζες, πεντόζες αλλά και παρεμποδιστικές ενώσεις.
- Προηγμένος σχεδιασμός ενοποίησης των διεργασιών ώστε να μειωθούν οι ενεργειακές ανάγκες.
- Η μικρότερη περιεκτικότητα των πρώτων υλών σε λιγνίνη μειώνει το κόστος της βιοαιθανόλης.



Σχήμα 4.1: Διαδικασία ροής για μετατροπή της λιγνοκυτταρινούχου βιομάζας σε αιθανόλη

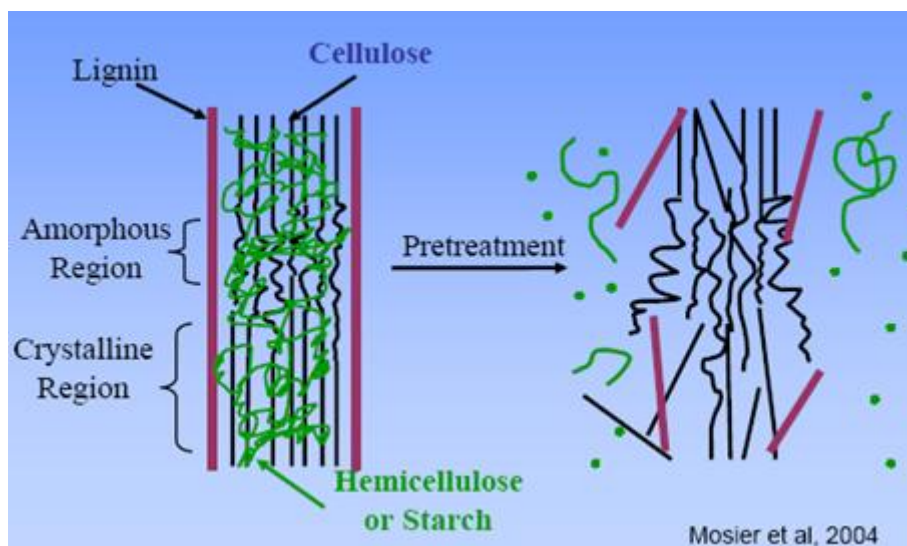
Ένα από τα πλεονεκτήματα της βιομετατροπής λιγνινοκυτταρινούχων υλικών είναι και η δυνατότητα δημιουργίας ενός βιοδυλιστηρίου, αξιοποιώντας το σύνολο των συστατικών τους για παραγωγή προϊόντων υψηλής προστιθέμενης αξίας, παράλληλα με την παραγωγή βιοαιθανόλης, αυξάνοντας έτσι τη συνολική δυνατότητα κέρδους

και παραγωγικότητας από τα λιγνινοκυτταρινούχα υλικά (Balat *et al.* 2008, Carvalhiero *et al.* 2008, Hayes 2009, Octave & Thomas 2009).

4.1. Προκατεργασία της πρώτης ύλης

Η επίδραση της προκατεργασίας των λιγνοκυτταρινούχων υλικών έχει αναγνωριστεί εδώ και πολύ καιρό (McMillan, 1994). Ο σκοπός της προεπεξεργασίας είναι η απομάκρυνση της λιγνίνης και της ημικυτταρίνης, η μείωση της κρυσταλλικότητας της κυτταρίνης και η αύξηση του πορώδους των υλικών. Η προεπεξεργασία πρέπει να πληροί τις ακόλουθες απαιτήσεις (Sun & Cheng, 2002):

1. να βελτιώσει το σχηματισμό σακχάρων ή την ικανότητα να σχηματιστούν στη συνέχεια τα σάκχαρα από την ενζυμική υδρόλυση
2. την αποφυγή της υποβάθμισης ή απώλειας των υδατανθράκων
3. την αποφυγή του σχηματισμού παραπροϊόντων στην διαδικασία της υδρόλυσης και της ζύμωσης τα οποία αναστέλλουν την ανάπτυξη των μικροοργανισμών ζύμωσης,
4. να είναι οικονομικά αποδοτική.



Σχήμα 4.2 Στόχος της προκατεργασίας (Mosier *et al.*, 2004)

4.1.1. Μέθοδοι προκατεργασίας

Ένα πλήθος από διαφορετικές μεθόδους προκατεργασίας έχουν προταθεί τις τελευταίες δεκαετίες. Μπορούν να διαχωριστούν σε τέσσερις διαφορετικές κατηγορίες :

1. φυσικές (άλεσμα, ακτινοβόληση)
2. χημικές (άλκαλι, αραιά οξέα, οξειδωτικά και οργανικοί διαλύτες)
3. φυσικοχημικές (προκατεργασία με ατμό/αυτοϋδρόλυση, υδροθερμόλυση και υγρή οξείδωση) και
4. βιολογικές ή συνδυασμοί αυτών.

4.1.2. Φυσικές μέθοδοι προκατεργασίας

4.1.2.1. Μηχανικός κατακερματισμός

Τα υλικά που προορίζονται για απόβλητα μπορούν να θρυμματιστούν, να λειανθούν και να άλεστούν για να μειωθεί η κρυσταλλικότητα της κυτταρίνης. Το μέγεθος των υλικών είναι συνήθως 10-30 mm μετά το θρυμματισμό και 0.2-2 mm μετά το άλεσμα. Η δονούμενη μπάλα άλεσης έχει βρεθεί ότι είναι πιο αποτελεσματική στην κατάρριψη της κρυσταλλικότητας της και τη βελτίωση της ομοιογένειας στους κόκκους της προκύπτουσας βιομάζας από τη συνηθισμένη μπάλα άλεσης (Millet et al., 1976).

4.1.2.2. Πυρόλυση

Η πυρόλυση έχει χρησιμοποιηθεί για την προκατεργασία των λιγνοκυτταρινούχων υλικών. Όταν τα υλικά υπόκεινται σε θερμοκρασίες μεγαλύτερες από 300°C, η κυτταρίνη αποσυντίθεται ταχέως και παράγει αέρια προϊόντα (Kilzer & Broido, 1965, Shafizadeh & Brad-bury, 1979). Η αποσύνθεση είναι πολύ πιο αργή και λιγότερα πτητικά προϊόντα σχηματίζονται σε χαμηλότερες θερμοκρασίες. Ήπια όξινη υδρόλυση (1 N H₂SO₄, 97°C, 2,5 h) του υπολείμματος της προεπεξεργασίας με πυρόλυση έχει ως αποτέλεσμα 80-85% μετατροπή της κυτταρίνης σε αναγωγικά σάκχαρα με περισσότερο από 50% γλυκόζη (Fan et al., 1987). Η διαδικασία μπορεί να ενισχυθεί με την παρουσία οξυγόνου (Shafizadeh and Bradbury, 1979). Όταν προστεθεί χλωριούχος ψευδάργυρος ή ανθρακικό νάτριο ως καταλύτης, η αποσύνθεση της καθαρής κυτταρίνης μπορεί να πραγματοποιηθεί σε χαμηλότερη θερμοκρασία (Shafizadeh and Lai, 1975).

4.1.2.3. Ακτινοβόληση

Η ακτινοβόληση με ακτίνες γ, δέσμη ηλεκτρονίων και μικροκύματα μπορούν να βελτιώσουν την ενζυμική υδρόλυση. Ο συνδυασμός της ακτινοβολίας με κάποια άλλη

μέθοδο όπως η όξινη προκατεργασία μπορεί να επιταχύνει την ενζυμική υδρόλυση (Galbe, 2007). Η συγκεκριμένη μέθοδος είναι υψηλού κόστους και υπάρχουν δυσκολίες στη βιομηχανική της εφαρμογή (Hayes, 2009).

4.1.3. Φυσικοχημικές μέθοδοι προκατεργασίας

4.1.3.1. Προκατεργασία με έκρηξη ατμού (steam explosion)

Είναι μία υδροθερμική προκατεργασία στην οποία το υλικό υπόκειται σε ατμό υψηλής πίεσης για ένα χρονικό διάστημα (από δευτερόλεπτα μέχρι και λεπτά) και μετά απότομα αποσυμπιέζεται. Το υλικό που προκύπτει είναι πιο επιδεκτικό σε ενζυμική υδρόλυση εξαιτίας της υδρόλυσης της ημικυτταρίνης (η οποία καταλύεται από το οξικό και άλλα οξέα τα οποία απελευθερώνονται από τον ατμό και επίσης και το νερό δρα καταλυτικά σαν οξύ σε υψηλές θερμοκρασίες). Σε συνδυασμό με την υδρόλυση και την διαλυτοποίηση της ημικυτταρίνης, η λιγνίνη απομακρύνεται μέχρι ένα βαθμό. Η απομάκρυνση της ημικυτταρίνης αυξάνει την ενεργή επιφάνεια της κυτταρίνης και αυξάνει την προσβασιμότητα των ενζύμων στα ινίδια κυτταρίνης. Τα πλεονεκτήματα αυτής της διεργασίας σχετικά με άλλες προκατεργασίες είναι: α) λιγότερες περιβαλλοντικές επιπτώσεις, β) χαμηλότερο κεφάλαιο επένδυσης, γ) περισσότερες δυνατότητες για ενεργειακή αποδοτικότητα, δ) πλήρης ανάκτηση των σακχάρων και λιγότερες επικίνδυνες διεργασίες με χημικά. Ωστόσο, με την προσθήκη όξινου καταλύτη η επιδεκτικότητα της κυτταρίνης σε ένζυμα αυξάνεται, η υδρόλυση της ημικυτταρίνης βελτιώνεται και, ανάλογα με την θερμοκρασία, ο σχηματισμός προϊόντων αποικοδόμησης μειώνεται.

Με σκοπό να μεγιστοποιηθεί η ανάκτηση των σακχάρων έχει προταθεί μία μέθοδος προκατεργασίας σε δύο στάδια. Στο πρώτο, η προκατεργασία πραγματοποιείται σε χαμηλή θερμοκρασία ώστε να διαλυτοποιηθεί το κλάσμα της ημικυτταρίνης και το κλάσμα της κυτταρίνης υπόκειται, στο δεύτερο στάδιο της προκατεργασίας, σε θερμοκρασίες άνω των 210 °C. Με αυτόν τον τρόπο προκύπτουν υψηλότερες αποδόσεις αιθανόλης και στην ενζυμική υδρόλυση απαιτούνται μικρότερες ποσότητες ενζύμων. Τα μειονεκτήματα αυτής της μεθόδου είναι η μερική αποικοδόμηση της ημικυτταρίνης και η παραγωγή μερικών τοξικών ενώσεων (ανάλογα με την πρώτη ύλη και τις συνθήκες της προκατεργασίας) που μπορεί να επηρεάσουν τα στάδια της υδρόλυσης και της ζύμωσης. Οι κυριότεροι παρεμποδιστές είναι παράγωγα φουρανίου, φαινολικές ενώσεις και ασθενή οξέα. Η φουρφουράλη και η 5-

υδροξυμεθυλοφουρφουράλη είναι τα κύρια παράγωγα του φουρανίου, τα οποία σχηματίζονται από την αποικοδόμηση των πεντοζών και των εξοζών, αντίστοιχα. Και τα δύο θεωρούνται ότι παρατείνουν την λανθάνουσα φάση στο στάδιο της ζύμωσης. Τα ασθενή οξέα που σχηματίζονται κατά την διάρκεια της προκατεργασίας είναι κυρίως οξικά οξέα που προέρχονται από το κλάσμα της ημικυτταρίνης και οξέα όπως το μυρμηκικό που προέρχεται από περαιτέρω αποικοδόμηση της φουρφουράλης. Οι φαινολικές ενώσεις που σχηματίζονται προέρχονται από την διάσπαση της λιγνίνης και ποικίλλουν ανάλογα με την πρώτη ύλη. (Alvira et al. 2009, Eklund et al. 1995). Η έκρηξη ατμού μπορεί να πραγματοποιηθεί με την προσθήκη διοξειδίου του θείου με σκοπό την βελτίωση της ανάκτησης των κλασμάτων κυτταρίνης και ημικυτταρίνης. Η προκατεργασία πραγματοποιείται με την προσθήκη διαλύματος SO₂ περιεκτικότητας 1-4%(w/w υποστρώματος) σε θερμοκρασίες 160-230 °C για 10 λεπτά (Charles E. Ophardt, Elmherst College, 2003).

4.1.3.2. Υδροθερμόλυση

Πρόκειται για μία υδροθερμική κατεργασία που δεν απαιτεί ραγδαία αποσυμπίεση και δεν χρησιμοποιεί κανένα καταλύτη. Πίεση εφαρμόζεται για την διατήρηση του νερού σε υγρή μορφή σε υψηλές θερμοκρασίες (160-240o C) και προκαλεί μετατροπές στη δομή του υλικού. Ο στόχος αυτής της προκατεργασίας είναι η διαλυτοποίηση της ημικυτταρίνης, η αύξηση της προσβασιμότητας της κυτταρίνης και η αποφυγή του σχηματισμού παρεμποδιστών. Το μίγμα που προκύπτει μετά την προκατεργασία μπορεί να φιλτραριστεί για την ανάκτηση δύο κλασμάτων: ένα στερεό κλάσμα πλούσιο σε κυτταρίνη και ένα υγρό κλάσμα πλούσιο σε σάκχαρα που προέρχονται από την ημικυτταρίνη (κυρίως ξυλόζη). Για την αποφυγή του σχηματισμού παρεμποδιστών το pH πρέπει να διατηρείται στο 4-7. Η προκατεργασία με θερμό νερό απομακρύνει μέχρι και το 80% της ημικυτταρίνης και ενισχύει την ενισχύει την επιδεκτικότητα του υλικού σε ένζυμα. Η λιγνίνη αποπολυμερίζεται και διαλυτοποιείται μερικώς κατά την προκατεργασία αλλά η απολιγνινοποίηση μόνο με θερμό νερό δεν είναι δυνατή εξαιτίας της ανασυμπύκνωσης διαλυτών ενώσεων που προέρχονται από τη λιγνίνη. Γενικά, η προκατεργασία με θερμό νερό είναι ελκυστική εξαιτίας του χαμηλού κόστους της. Δεν απαιτείται καταλύτης και το κόστος κατασκευής και συντήρησης είναι χαμηλό αφού υπάρχει χαμηλός κίνδυνος για διάβρωση. Έχει επίσης το μεγάλο πλεονέκτημα της μειωμένης συγκέντρωσης

αποικοδομήσιμων προϊόντων και αυτό οφείλεται στο ότι τα διαλυμένα προϊόντα της ημικυτταρίνης και της λιγνίνης βρίσκονται σε χαμηλή συγκέντρωση εξαιτίας των υψηλών ποσοτήτων νερού που χρησιμοποιούνται. Ωστόσο, αυτή η διεργασία απαιτεί υψηλές ποσότητες νερού και περισσότερη ενέργεια από ότι διεργασίες που όπως η προκατεργασία με εκτόνωση ατμού. (Alvira et al. 2009, Eklund et al. 1995).

4.1.3.3. Εκτόνωση ίνας με αμμωνία (Ammonia fiber explosion, AFEX)

Η εκτόνωση ίνας με αμμωνία (AFEX) είναι ένα άλλο είδος φυσικο-χημικής προεπεξεργασίας στην οποία τα λιγνοκυτταρινούχα υλικά εκτίθενται σε υγρή αμμωνία σε υψηλή θερμοκρασία και πίεση για ένα χρονικό διάστημα, και στη συνέχεια η πίεση μειώνεται γρήγορα. Η έννοια της AFEX είναι παρόμοια με την έκρηξη ατμού. Σε μια τυπική διαδικασία AFEX, η δοσολογία της υγρής αμμωνίας είναι 1-2 kg αμμωνίας / kg ξηρής βιομάζας, θερμοκρασία 90° C και χρόνος παραμονής 30 λεπτά. Η AFEX μπορεί να βελτιώσει σημαντικά τα ποσοστά σακχαροποίησης των διαφόρων υλικών που πρόκειται να υποστούν προκατεργασία. Σε αυτήν την μέθοδο πραγματοποιείται εκτονωτική αποσυμπίεση με αποτέλεσμα την ραγδαία διαστολή της αμμωνίας (σε αέρια φάση) που προκαλεί την διόγκωση των πόρων του υλικού, την μηχανική διαταραχή των ινών του υλικού και μείωση της κρυσταλλικότητας της κυτταρίνης. Να σημειωθεί ότι σε αντίθεση με άλλες μεθόδους, το προκατεργασμένο υλικό που προκύπτει με αυτή τη διεργασία είναι στερεό. Κατά την διεργασία μόνο ένα μικρό μέρος του στερεού υλικού διαλυτοποιείται, κυρίως ημικυτταρίνη και λιγνίνη. Η ανάκτηση και η ανακύκλωση της αμμωνίας είναι εφικτή εξαιτίας της υψηλής της πτητικότητας όμως η πολυπλοκότητα και το κόστος για αυτές τις διεργασίες είναι σημαντικά. Ένα σημαντικό πλεονέκτημα αυτής της μεθόδου είναι ότι δεν παρατηρείται σχηματισμός παρεμποδιστών. Ωστόσο, αυτή η μέθοδος είναι περισσότερο αποτελεσματική σε υλικά με χαμηλή περιεκτικότητα σε λιγνίνη. Μπορεί να χρησιμοποιηθεί για την προεπεξεργασία πολλών λιγνοκυτταρινούχων υλικών όπως άχυρο σίτου, (MES-Hartree et al., 1988), άχυρο κριθαριού, κοτσάνια καλαμποκιού, ρύζι (Vlasenko et al., 1997), τα αστικά στερεά απόβλητα, μαλακό ξύλο, switchgrass (Reshamwala et al., 1995) και βαγάσσης (Holtzaple et al., 1991). Η προεπεξεργασία AFEX δεν είναι τόσο αποδοτική στη διαλυτοποίηση της ημικυτταρίνης σε σύγκριση με την όξινη προκατεργασία και όξινη-καταλυόμενη με έκρηξη ατμού (Mes-Hartree et al, 1988 Vlasenko et al, 1997). Συγκρίνοντας μάλιστα

την προκατεργασία με έκρηξη ατμού και την AFEX για την ενζυμική υδρόλυση άχυρου σίτου, aspenwood και στελεχών τριφυλλίου διαπιστώθηκε ότι η έκρηξη ατμού διαλυτοποίησε την ημικυτταρίνη ενώ η AFEX όχι. Η σύνθεση των υλικών μετά την AFEX ήταν ουσιαστικά η ίδια με την αρχική.

4.1.3.4. Έκρηξη CO₂

Αυτή η μέθοδος προκατεργασίας βασίζεται στην χρησιμοποίηση του CO₂ ως υπερκρίσιμου ρευστού δηλαδή ενός ρευστού που είναι σε αέρια μορφή που όμως έχει συμπιεστεί σε θερμοκρασίες πάνω από το κρίσιμο σημείο του με αποτέλεσμα η πυκνότητά του να είναι σαν υγρού ρευστού. Οι συνθήκες που απαιτούνται για να φτάσει το ρευστό σε υπερκρίσιμη κατάσταση απομακρύνουν αποτελεσματικά την λιγνίνη. Η προσθήκη διαλυμάτων όπως η αιθανόλη βελτιώνει την απολιγνινοποίηση. Σε υδατικά διαλύματα το CO₂ σχηματίζει οργανικά οξέα τα οποία ευνοούν το μετέπειτα στάδιο της υδρόλυσης. Το μέγεθος των μορίων CO₂ είναι ισοδύναμο με το μέγεθος των μορίων νερού και αμμωνίας και μπορούν να εισχωρήσουν με τον ίδιο τρόπο στους πόρους του υλικού. Αυτός ο μηχανισμός διευκολύνεται από τις υψηλές πιέσεις που χρησιμοποιούνται σε αυτή τη μέθοδο. Μετά την εκτονωτική αποσυμπίεση του CO₂ επέρχεται διαταραχή στη δομή της κυτταρίνης και της ημικυτταρίνης με αποτέλεσμα την αύξηση της ενεργής επιφάνειας του υλικού. Σε σύγκριση με άλλες μεθόδους αυτή η μέθοδος λειτουργεί σε χαμηλές θερμοκρασίες και ως εκ τούτου δεν παρατηρείται αποικοδόμηση μονοσακχαριτών αλλά σε σύγκριση με την έκρηξη ατμού ή την έκρηξη αμμωνίας οι αποδόσεις των σακχάρων που ανακτούνται είναι χαμηλότερες. Επίσης απαιτούνται ιδιαίτερα υψηλές πιέσεις. Ωστόσο είναι οικονομικά αποδοτικότερο από την προκατεργασία με έκρηξη αμμωνίας και έχει χαμηλότερο σχηματισμό παρεμποδιστών από την προκατεργασία με έκρηξη ατμού. Επίσης η χρησιμοποίηση του CO₂ είναι ελκυστική εναλλακτική για την μείωση του κόστους αφού παράγεται ούτως ή άλλως στο στάδιο της ζύμωσης. Άλλα πλεονεκτήματα του CO₂ είναι ότι είναι μη τοξικό, μη εύφλεκτο και ανακτάται εύκολα (Alvira et al. 2009).

4.1.4. Χημικές μέθοδοι προκατεργασίας

4.1.4.1. Οζονόλυση

Το όζον μπορεί να χρησιμοποιηθεί για να διαλυτοποιήσει τη λιγνίνη και την ημικυτταρίνη σε πολλά λιγνοκυτταρινούχα υλικά όπως το άχυρο σίτου (Ben-Ghedalia & Miron, 1981), υπολείμματα ζαχαροκάλαμου το βαμβάκι (Ben-Ghedalia and Shefet, 1983) και άλλα. Η οζονόλυση έχει τα ακόλουθα πλεονεκτήματα: (1) απομακρύνει αποτελεσματικά τη λιγνίνη (2) δεν παράγει τοξικά κατάλοιπα και (3), οι αντιδράσεις διεξάγονται σε θερμοκρασία δωματίου και πίεση (Vidal & Molinier, 1988). Ωστόσο, ένα μεγάλο ποσό όζοντος απαιτείται, καθιστώντας τη διαδικασία δαπανηρή.

4.1.4.2 Αλκαλική προκατεργασία

Η αλκαλική προκατεργασία αυξάνει την επιδεκτικότητα της κυτταρίνης σε ένζυμα, εμφανίζει μικρά ποσοστά διαλυτοποίησης κυτταρίνης συγκριτικά με την όξινη προκατεργασία ή τις υδροθερμικές προκατεργασίες. Αυτή η μέθοδος χρησιμοποιεί χαμηλότερες θερμοκρασίες και πιέσεις σε σχέση με άλλες μεθόδους προκατεργασίας. Η αλκαλική προκατεργασία μπορεί να πραγματοποιείται σε συνθήκες περιβάλλοντος αλλά ο χρόνος προκατεργασίας κυμαίνεται από ώρες μέχρι και μέρες. Η κατεργασία με NaOH προκαλεί την διόγκωση των πόρων του υλικού που οδηγεί σε αύξηση της εσωτερικής επιφάνειας επιτρέποντας έτσι την διείσδυση μορίων νερού σε εσωτερικά στρώματα και στην διάσπαση των δεσμών μεταξύ της ημικυτταρίνης και υδρογονανθράκων της λιγνίνης, σε μείωση της κρυσταλλικότητας της κυτταρίνης και στην διαταραχή της δομής της λιγνίνης. Επιπροσθέτως, η αλκαλική προκατεργασία απομακρύνει διάφορους υποκαταστάτες της ημικυτταρίνης που μειώνουν την προσβασιμότητα των ενζύμων στην επιφάνεια της ημικυτταρίνης και της κυτταρίνης. (Alvira et al. 2009, Eklund et al. 1995).

4.1.4.3. Όξινη προκατεργασία

Ο κύριος στόχος της όξινης προκατεργασίας είναι η διαλυτοποίηση του κλάσματος ημικυτταρίνης της βιομάζας και η αύξηση της επιδεκτικότητας της κυτταρίνης σε ένζυμα. Σε αυτήν την μέθοδο προκατεργασίας μπορεί να χρησιμοποιηθεί και πυκνό και αραιό οξύ αλλά το πυκνό οξύ είναι λιγότερο ελκυστικό όταν πρόκειται για παραγωγή αιθανόλης εξαιτίας του σχηματισμού παρεμποδιστών. Επιπλέον, με τη

χρησιμοποίηση πυκνών οξέων στην προκατεργασία η ανάκτηση του οξέος καθώς και τα προβλήματα διάβρωσης του εξοπλισμού είναι σημαντικά μειονεκτήματα. Τα υψηλό λειτουργικό κόστος και το υψηλό κόστος συντήρησης είναι ανασταλτικοί παράγοντες στην εφαρμογή της όξινης προκατεργασίας με την χρησιμοποίηση πυκνών οξέων σε εμπορική κλίμακα. Καταλληλότερη μέθοδος για βιομηχανικές εφαρμογές είναι η προκατεργασία με την χρήση αραιού οξέος (κυρίως θεικού οξέος). Μπορεί να πραγματοποιηθεί σε υψηλές θερμοκρασίες (180° C) για μικρό χρονικό διάστημα ή σε χαμηλές θερμοκρασίες (120° C) για μεγαλύτερα χρονικά διαστήματα (30-90 min). Γενικά, υψηλότερες θερμοκρασίες προκατεργασίας και μικρότεροι χρόνοι παραμονής έχουν ως αποτέλεσμα υψηλότερα ποσοστά ανάκτησης ξυλόζης. Εκτός από την διαλυτοποίηση της ημικυτταρίνης αυτή η μέθοδος έχει το πλεονέκτημα της μετατροπής της διαλυμένης ημικυτταρίνης σε ζυμώσιμα σάκχαρα. Ωστόσο ανιχνεύονται ενώσεις από την αποικοδόμηση σακχάρων (όπως η φουρφουράλη), οι οποίες στο στάδιο της ζύμωσης επηρεάζουν τον μεταβολισμό των μικροοργανισμών.

Ένα άλλο ζήτημα με την χρησιμοποίηση οξέων είναι η ρυθμιστική ικανότητα του υλικού και η χρήση προσθέτων που θα εξουδετερώσουν την οξύτητα του μίγματος πριν την υδρόλυσή του. Επιπροσθέτως, πρέπει να επισημανθεί και η επίδραση που έχει η όξινη προκατεργασία στην κυτταρίνη. Μερικές άμορφες περιοχές της κυτταρίνης είναι πιθανόν να υδρολυθούν με αποτέλεσμα την μείωση του βαθμού πολυμερισμού της κυτταρίνης. (Alvira et al. 2009). Τέλος αν και η προεπεξεργασία με αραιό οξύ μπορεί να βελτιώσει σημαντικά την υδρόλυση της κυτταρίνης, το κόστος της είναι συνήθως υψηλότερο από ότι κάποια φυσικο-χημική προεπεξεργασία όπως η εκρήξη ατμού ή η AFEX.

4.1.4.4. Προκατεργασία με οργανικούς διαλύτες

Σε αυτή την προκατεργασία μπορούν να χρησιμοποιηθούν διάφορα οργανικά ή υδατικά διαλύματα, όπως η μεθανόλη, η αιθανόλη, η ακετόνη, η γλυκόλη και η τετραϋδροφουρφυρική αλκοόλη, με σκοπό την διαλυτοποίηση της λιγνίνης και την παραγωγή προκατεργασμένης κυτταρίνης καταλληλότερη για ενζυμική υδρόλυση.

Σε διάφορες μελέτες αυτά τα διαλύματα συνδυάστηκαν με την δράση όξινων καταλυτών (HCL, H₂SO₄, οξαλικό ή σαλικυλικό οξύ) για την διάσπαση των

ημικυτταρινικών δεσμών. Μπορεί να επιτευχθεί υψηλή απόδοση ανάκτησης ξυλόζης με την προσθήκη κάποιου οξέος. Αυτή η μέθοδος μπορεί να συνδυαστεί με όξινη υδρόλυση για τον διαχωρισμό της ημικυτταρίνης και της λιγνίνης σε έναν κλασματικό διαχωρισμό δύο σταδίων (το στάδιο της όξινης υδρόλυσης προηγείται του σταδίου προκατεργασίας με οργανικούς διαλύτες). Η απομάκρυνση των διαλυτών είναι απαραίτητη, χρησιμοποιώντας κατάλληλες μεθόδους διαχωρισμού όπως η εξάτμιση και η συμπύκνωση και ανακυκλώνονται έτσι ώστε να μειωθεί το λειτουργικό κόστος. Οι διαλύτες πρέπει να διαχωρίζονται γιατί μπορεί να δρουν σαν παρεμποδιστές στην ενζυμική υδρόλυση και στην ζύμωση. Η υψηλή εμπορική αξία των διαλυτών είναι ένας ακόμη σημαντικός παράγοντας που πρέπει να εξεταστεί για την εφαρμογή αυτή της μεθόδου σε βιομηχανική κλίμακα (προτιμούνται αλκοόλες με χαμηλό μοριακό βάρος και με χαμηλό σημείο βρασμού όπως η αιθανόλη και η μεθανόλη) (Alvira et al. 2009).

4.1.4.5. Προκατεργασία με άλλους διαλύτες

Το υπεροξειδίο του υδρογόνου, η γλυκερόλη και η φαινόλη είναι μερικοί διαλύτες που έχουν δείξει ότι μπορεί να συνεισφέρουν στην μείωση της κρυσταλλικότητας και του βαθμού πολυμερισμού της κυτταρίνης. Τα ILs είναι άλατα τα οποία αποτελούνται από ένα μεγάλο οργανικό κατιόν και ένα μικρό ανόργανο ανιόν και τα οποία είναι σε υγρή μορφή σε σχετικά χαμηλές θερμοκρασίες (συνήθως σε θερμοκρασία δωματίου). Αυτοί οι διαλύτες έχουν χημική και θερμική σταθερότητα, δεν είναι εύφλεκτοι, έχουν χαμηλή τάση ατμών και παραμένουν υγροί σε ένα ευρύ εύρος θερμοκρασιών. Αφού δεν σχηματίζονται τοξικά ή εκρηκτικά αέρια τα ILs καλούνται «πράσινοι» διαλύτες. Για την εφαρμογή τους σε βιομηχανική κλίμακα πρέπει να διεξαχθεί περαιτέρω έρευνα για την μείωση του κόστους της διεργασίας, αφού οι ILs είναι ακριβοί και δεν έχουν αναπτυχθεί ακόμη αποτελεσματικές μέθοδοι για την ανάκτησή τους.

4.1.5. Βιολογικές μέθοδοι προκατεργασίας

Οι βιολογικές μέθοδοι προκατεργασίας χρησιμοποιούν μύκητες που προκαλούν καστανή λευκή και μαλακή σύψη για την αποικοδόμηση της λιγνίνης και της ημικυτταρίνης καθώς και τη μείωση του βαθμού πολυμερισμού της κυτταρίνης. Στα πλεονεκτήματα των βιολογικών μεθόδων προκατεργασίας συγκαταλέγεται η φιλικότητα προς το περιβάλλον καθώς και οι μικρές ενεργειακές απαιτήσεις. Στα

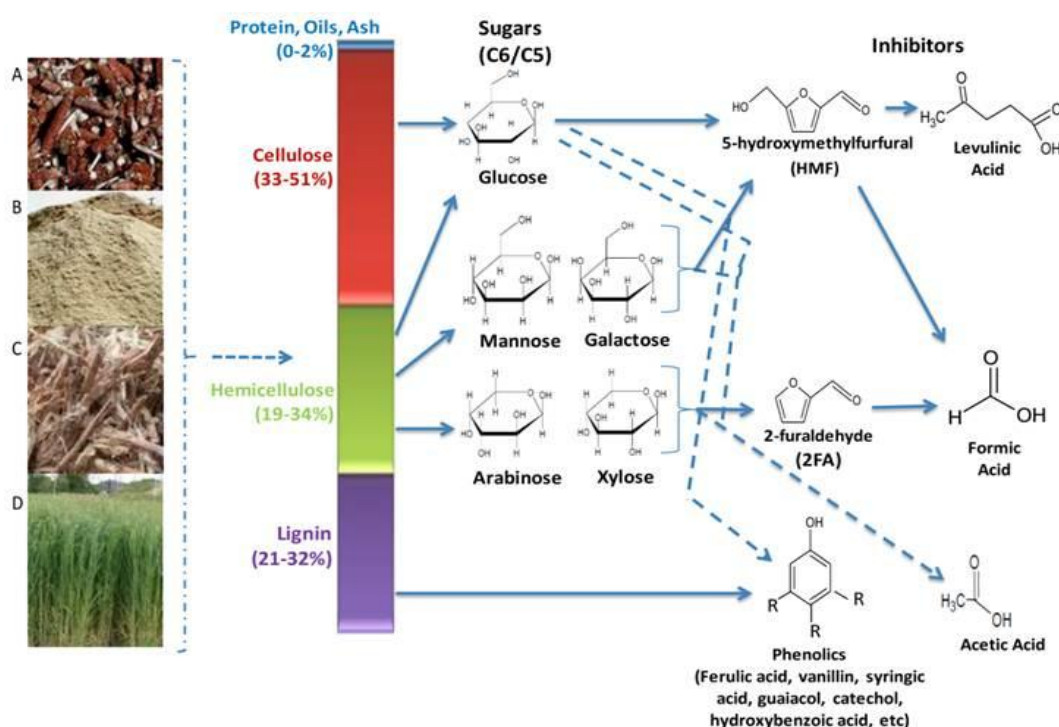
μειονεκτήματα συγκαταλέγονται ο πολύ αργός ρυθμός υδρόλυσης από τα ένζυμα που παράγονται από τους μύκητες που χρησιμοποιούνται η παρεμπόδιση ανάπτυξης των μικροοργανισμών από παράγωγα της λιγνίνης και η σημαντική απώλεια ξυλάνης και μαννάνης. Οι βιολογικές μέθοδοι μπορούν να θεωρηθούν αποδοτικές ως προς το κόστος εάν συνδυαστούν με άλλες φυσικές ή χημικές μεθόδους. Στον Πίνακα 4.1 που ακολουθεί συνοψίζονται οι σημαντικότερες μέθοδοι προκατεργασίας όπου συγκρίνονται.

Πίνακας 5.1 Σύνοψη των μεθόδων προκατεργασίας (Singh et al, 2014)

Προκατεργασία	Τρόπος Δράσης	Απόδοση σακχάρων	Δημιουργία παρεμποδιτών	Στερεό υπόλειμμα	Ανακύκλωση χημικών
Μηχανική		-	++	++	++
Αραιό οξύ	Απομάκρυνση ημικυτταρίνης (κύριο) Αλλαγή της δομής της λιγνίνης (δευτερεύον)	++			
Πυκνό οξύ	Υδρόλυση κυτταρίνης και ημικυτταρίνης	++	-	-	-
Αλκαλική	Απομάκρυνση λιγνίνης (κύριο) και ημικυτταρίνης (δευτερεύον)	++	-	-	-
Υγρή οξείδωση	Απομάκρυνση λιγνίνης Διαλυτοποίηση ημικυτταρίνης Μείωση κρυσταλλικότητας κυτταρίνης	+/-	++	+	++
Υδροθερμόλυση	Απομάκρυνση ημικυτταρίνης	++	-	++	++
Έκρηξη ατμού	Απομάκρυνση ημικυτταρίνης (κύριο) Αλλαγή της δομής της λιγνίνης (δευτερεύον)	+	-	+	++
AFEX	Απομάκρυνση λιγνίνης (κύριο) και ημικυτταρίνης (δευτερεύον)	++	++		-
+ : θετικό χαρακτηριστικό					
-: αρνητικό χαρακτηριστικό					

4.1.5. Παραγόμενοι παρεμποδιστές

Ορισμένες ουσίες που είτε απελευθερώνονται κατά την προκατεργασία, είτε προϋπάρχουν στο αρχικό υλικό, όπως το οξικό οξύ, ή σχηματίζονται κατά την προκατεργασία, δρουν παρεμποδιστικά για τους μικροοργανισμούς. Οι κυριότερες παρεμποδιστικές ενώσεις που ανιχνεύονται στην υγρή φάση μετά την κατεργασία είναι η φουρφουράλη ή 2-φουραλεϋδη (furfural, FF) και η υδροξυμεθυλ-φουρφουράλη ή 5-υδροξυμεθυλ-2-φουραλεϋδη (hydroxymethyl-furfural, HMF), οι οποίες προκύπτουν από την αποικοδόμηση των πεντοζών και εξοζών, αντίστοιχα (Σχήμα 4.3).

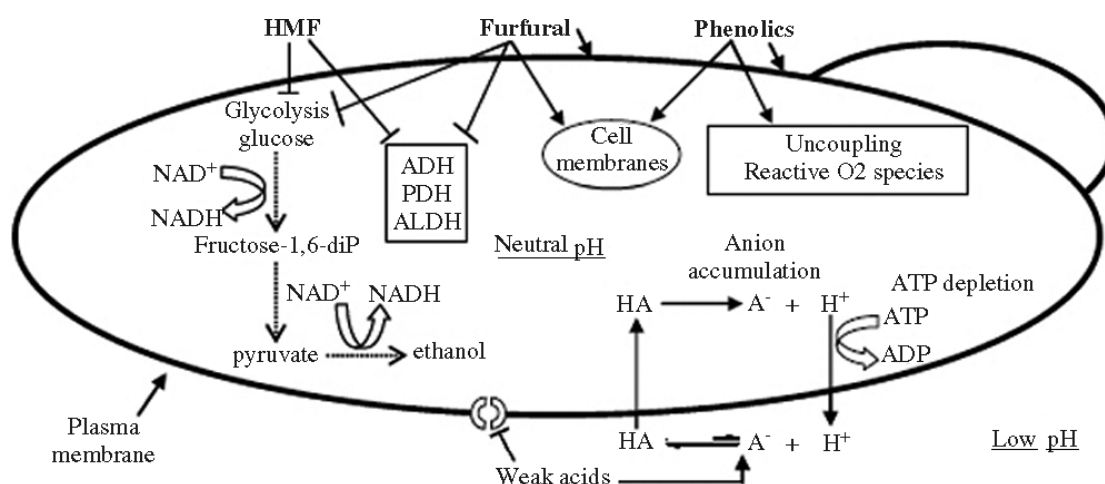


Σχήμα 4.3. Αντιδράσεις αποικοδόμησης των σακχάρων κατά την προκατεργασία λιγνινο-κυτταρινούχων υλικών (Galbe & Zacchi 2007).

Η φουρφουράλη μπορεί να αντιδράσει περαιτέρω παράγοντας μυρμηγκικό οξύ (formic acid), ή πολυμερίζεται. Η υδροξυμεθυλ-φουρφουράλη μετατρέπεται σε μυρμηγκικό και λεβουλνικό οξύ (levulinic acid). Κατά την αποικοδόμηση της λιγνίνης παράγονται διάφορες φαινολικές ενώσεις (Galbe & Zacchi 2007, Almeida *et al.* 2007, Thomsen *et al.* 2009).

Η παρουσία φουρφουράλης και HMF ελαττώνει την απόδοση και παραγωγικότητα της αιθανόλης, παρεμποδίζει την ανάπτυξη των μικροοργανισμών ή αυξάνει τη

διάρκεια της λανθάνουσας φάσης ανάπτυξής τους (Brandberg *et al.* 2004, Almeida *et al.* 2007, Heer & Sauer 2008) (Σχήμα 4.4).. Οι φουρφουράλες παρεμποδίζουν ενδοκυτταρικά ένζυμα, όπως η αλκοολική αφυδρογονάση (alcohol dehydrogenase, ADH), η αλδεϋδική αφυδρογονάση (aldehyde dehydrogenase, ALDH) και η πυροσταφυλική αφυδρογονάση (pyruvate dehydrogenase, PDH) (Modig *et al.* 2002), καθώς και δύο σημαντικά ένζυμα του μονοπατιού της γλυκόλυσης, την εξωκινάση και την αφυδρογονάση της 3-φωσφορικής γλυκεραλδεϋδης (Banerjee *et al.* 1981). Γενικά, οι μικροοργανισμοί μετατρέπουν την φουρφουράλη και την HMF σε λιγότερο δραστικές ενώσεις χρησιμοποιώντας NAD(P)H-εξαρτώμενες αντιδράσεις αναγωγής, εξαντλώντας όμως τα αποθέματα σε ενέργεια και συμπαραγόντες και οδηγώντας έτσι σε αύξηση της λανθάνουσας φάσης, που απαιτείται για την ανάκαμψη των κυττάρων (Palmqvist *et al.* 1999, Almeida *et al.* 2007).



Σχήμα 4.4 Μηχανισμός παρεμπόδισης (Almeida *et al.*, 2007)

Έχουν χρησιμοποιηθεί αρκετές στρατηγικές για την αντιμετώπιση της παρεμπόδισης των μικροοργανισμών από τις φουρφουράλες. Αυτές περιλαμβάνουν την αποτοξικοποίηση του μέσου που πρόκειται να υποστεί ζύμωση (Mussatto & Roberto 2004, Huang *et al.* 2008, Sánchez & Cardona 2008) ή την αξιοποίηση της εγγενούς ικανότητας αποτοξικοποίησης των μικροοργανισμών (Taherzadeh *et al.* 2000, Liu *et al.* 2004, Nichols *et al.* 2008, Sánchez & Cardona 2008). Εναλλακτικά, το μέσο της ζύμωσης μπορεί να ενισχυθεί με ενώσεις που προσφέρουν στους μικροοργανισμούς προστασία από τις οξειδωτικές βλάβες που προκαλούν οι φουρφουράλες, όπως η τρεχαλόζη (Arguelles 2000, Benaroudj *et al.* 2001, Alvarez-Peral *et al.* 2002) και η

γλουταθειόνη (Grant *et al.* 1996, Sigler *et al.* 1999, Heeren *et al.* 2004), όμως η προστασία τους έναντι των φουρφουραλών δεν έχει ακόμα μελετηθεί.

4.2. Μέθοδοι υδρόλυσης – Χημική και ενζυμική υδρόλυση

Η υδρόλυση περιλαμβάνει διάσπαση των πολυμερών της κυτταρίνης και της ημικυτταρίνης σε μονομερή τους. Η ολοκληρωμένη υδρόλυση της κυτταρίνης δίνει γλυκόζη, ενώ η ημικυτταρίνη δίνει πεντόζες και εξόζες. Ενώ η ημικυτταρίνη αποτελείται κυρίως από μαννόζη, το κυρίαρχο σάκχαρο στην ημικυτταρίνη του σκληρού ξύλου ή των υπολειμμάτων της συγκομιδής είναι συνήθως η ξυλόζη.

4.2.1. Χημική υδρόλυση

Η χημική υδρόλυση περιλαμβάνει έκθεση του υλικού σε ένα χημικό για μια χρονική περίοδο σε μια συγκεκριμένη θερμοκρασία, και οδηγεί σε μονομερή σάκχαρα. Τα οξέα εφαρμόζονται κατά κύριο λόγο σε χημικές υδρολύσεις. Το θειικό οξύ είναι το πιο ευρέως χρησιμοποιημένο, αν και άλλα οξέα όπως το HCl έχουν επίσης χρησιμοποιηθεί. Οι υδρολύσεις οξέος μπορούν να χωριστούν σε δύο ομάδες : α) την υδρόλυση με χρήση πυκνού οξέος και β) την - υδρόλυση με χρήση αραιού οξέος. Μεταξύ των δύο μεθόδων της χημική υδρόλυσης, η αραιή - όξινη υδρόλυση συνήθως εφαρμόζεται. Είναι μια μέθοδος που μπορεί να χρησιμοποιηθεί είτε ως προκατεργασία και προηγείται της ενζυμικής υδρόλυσης, ή ως πραγματική μέθοδος υδρόλυσης (Steffien, 2014).

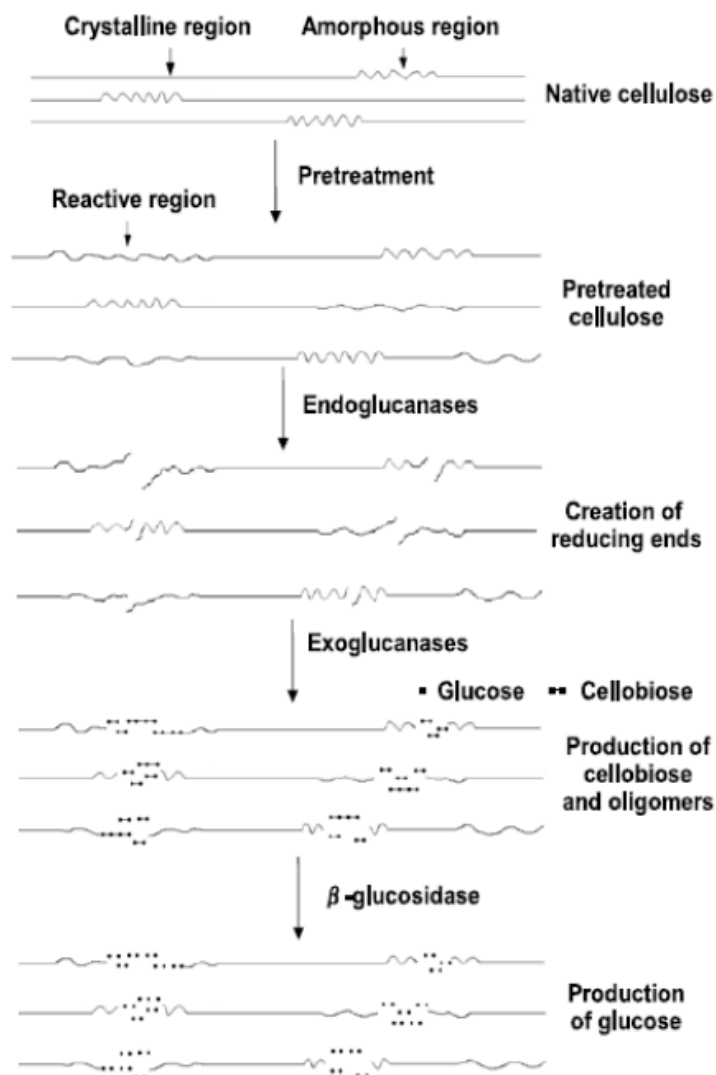
4.2.2. Ενζυμική Υδρόλυση της κυτταρίνης

Μετά την προεπεξεργασία, ενζυμική υδρόλυση είναι απαραίτητη για τον περαιτέρω αποπολυμερισμό της κυτταρίνης σε γλυκόζη, η οποία μπορεί να χρησιμοποιηθεί για τη ζύμωση προς παραγωγή αιθανόλης μαζί με τα σάκχαρα που απελευθερώνονται από την υδρόλυση της ημικυτταρίνης κατά τη διάρκεια της προκατεργασίας. Παρά την εντατική έρευνα και ανάπτυξη σε όλο τον κόσμο εδώ και δεκαετίες, δύο εμπόδια εξακολουθούν να υπάρχουν που εμποδίζουν την ανάπτυξη βιώσιμων διαδικασιών για να κάνουν τη βιοαιθανόλη οικονομικά ανταγωνιστική.

Η ενζυμική υδρόλυση της κυτταρίνης είναι μία αρκετά ελκυστική μέθοδος λόγω της χαμηλής παραγωγής παραπροϊόντων κατά την υδρολυτική διαδικασία, τις χαμηλές

ενεργειακές απαιτήσεις και τις ήπιες συνθήκες λειτουργίας. Τρία είδη ενζύμων δρουν συνεργιστικά για την υδρόλυση της κυτταρίνης (κατά UIPAC):

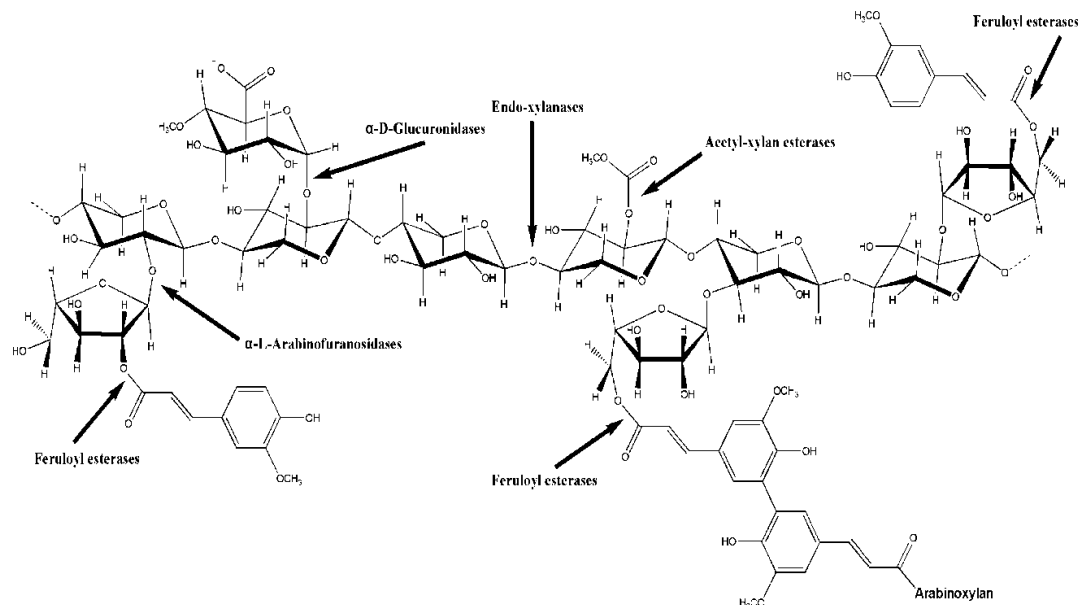
1. Ενδογλυκανάσες ή ένδο-1,4-β-D-γλυκάνο γλυκανοϋδρολάσες: Οι ενδογλυκανάσες διασπούν το γλυκοζιτικό δεσμό σε τυχαίες θέσεις στο εσωτερικό της αλυσίδας της κυτταρίνης και σε άμορφες περιοχές (μη κρυσταλλικές, δηλαδή περιοχές που η δομή των αλυσίδων είναι πιο άτακτη). Παράγουν διαλυτούς ολιγοσακχαρίτες με διάφορα μεγέθη και δημιουργούν νέα άκρα στην κυτταρινική αλυσίδα. Είναι δραστικές έναντι άμορφης κυτταρίνης και διαλυτά παράγωγα κυτταρίνης όπως η καρβοξυμεθυλοκυτταρίνη (CMC).
2. Εξωγλυκανάσες ή 1, 4-β-D- ολιγογλυκανο κελλοβιοϋδρολάσες: Είναι γνωστές και ως κελλοδεξτρινάσες, και καταλύουν την παραγωγή κελλοβιόζης από κελλοολιγοσακχαρίτες (δηλαδή διαλυτά ολιγομερή της κυτταρίνης, όπως αυτά που παράγονται από τις ενδογλυκανάσες) αλλά δεν είναι δραστικές έναντι της άμορφης κυτταρίνης ή της καρβοξυμεθυλοκυτταρίνης.
3. β-γλυκοσιδάσες ή β-D-γλυκοσιδο γλυκοϋδρολάσες: Υδρολύουν την κελλοβιόζη και τις διαλυτές κελλοδεξτρίνες παράγοντας γλυκόζη, ενώ δεν είναι δραστικές έναντι της κρυσταλλικής ή της άμορφης κυτταρίνης. (Guo et al., 2013).



Σχήμα 4.5 Ενζυμική υδρόλυση της κυτταρίνης

Για την αποτελεσματική αξιοποίηση των λιγνινοκυτταρινούχων υλικών απαιτείται η αποικοδόμηση τόσο της κυτταρίνης όσο και της ημικυτταρίνης (Lee *et al.* 2008). Η ξυλάνη, το βασικό πολυμερές της ημικυτταρίνης, υδρολύεται σε ξυλο-ολιγοσακχαρίτες από ενδο- β -1,4-ξυλανάσες (endoxylanases, EC 3.2.1.8) και στη συνέχεια οι β -ξυλοζιδάσες (β -xylosidases, EC 3.2.1.37) υδρολύουν τους ξυλο-ολιγοσακχαρίτες (κυρίως την ξυλοβιόζη) σε μόρια ξυλόζης (Σχήμα 4.6). Άλλα ένζυμα που συνεισφέρουν στην αποικοδόμηση της ημικυτταρίνης είναι οι α -γλυκουρονιζάσες (α -glucuronidases), οι α -L-αραβινοφουρανοζιδάσες (α -L-arabinofuranosidases), οι ακετυλ-εστεράσες και οι εστεράσες του φερουλικού οξέος. Η αποικοδόμηση των γλυκομαννάνων γίνεται από β -μαννανάσες (β -mannanases) και

β -μαννοζιδάσες (β -mannosidases) (Howard *et al.* 2003, Gray *et al.* 2006, Kumar *et al.* 2008, Carvalhiero *et al.* 2008).



Σχήμα 4.6: Ενζυμική υδρόλυση ημικυτταρίνης

4.2.3. Προϋποθέσεις για τη επίτευξη αποτελεσματικής ενζυμικής υδρόλυσης.

Τα χαρακτηριστικά που θα πρέπει να διαθέτουν τα κυτταρινολυτικά ημικυτταρινολυτικά ένζυμα προκειμένου να επιτευχθεί αποτελεσματική υδρόλυση της λιγνινοκυτταρινούχου βιομάζας είναι:

1. Μειωμένη αναστολή της ενζυμικής δράσης από τα τελικά προϊόντα υδρόλυσης (γλυκόζη, κελλοβιόζη, ξυλόζη)
2. Υψηλή θερμοκή σταθερότητα
3. Αυξημένη παραγωγικότητα
4. Βέλτιστη πρόσδεση στη λιγνοκυτταρίνη
5. Βέλτιστες δομές

Το σύνολο ενζύμων που πρέπει απαραίτητα για την αποτελεσματική υδρόλυση των λιγνινοκυτταρινούχων υλικών είναι δέκα εκ των οποίων 6-8 θεωρούνται απαραίτητα.

- ενδογλουκανάση 1 και εξογλουκανάση 1 της οικογένειας 7
- εξογλουκανάση 2 της οικογένειας 6
- ενδογλουκανάση 2 της οικογένειας 5
- ξυλανάσες της οικογένειας 10 και 11
- β - γλυκοζιδάσες της οικογένειας 3
- AA9 πρωτεΐνες (οξειδωτικά ένζυμα)

- Εστεράσες της ακετύλο-ξυλάνης

Στον πίνακα 4.2 που ακολουθεί παρατίθενται τα βέλτιστα ποσοστά των προαναφερθέντων ενζύμων τα οποία πρέπει να υπάρχουν για μια επιτυχή ενζυμική υδρόλυση.

Πίνακας 4.2. Κυτταρινολυτικά και ημικυτταρινολυτικά ένζυμα για τηναποτελεσματική υδρόλυση λιγνινοκυτταρινούχου βιομάζας.

Ένζυμα	Ποσοστό στο μίγμα (με βάση το φορτίο της πρωτεΐνης)
εξογλουκανάση 1	50-60%
εξογλουκανάση 2	10-30%
ενδογλουκανάσες	10-30%
ξυλανάσες	5-10%
β- γλυκοζιδάσες	<1%

Επίσης πειράματα που διεξήγαγε η εταιρία Novozymes, Inc το 2003 έδειξαν ότι η χρήση των πρωτεϊνών AA9 (οξειδωτικά ένζυμα) μπορεί να μειώσει σημαντικά την ποσότητα των κυτταρινασών που απαιτείται για την επίτευξη του απαιτούμενου επιπέδου της ενζυμικής υδρόλυσης.

4.3. Διεργασίες παραγωγής αιθανόλης

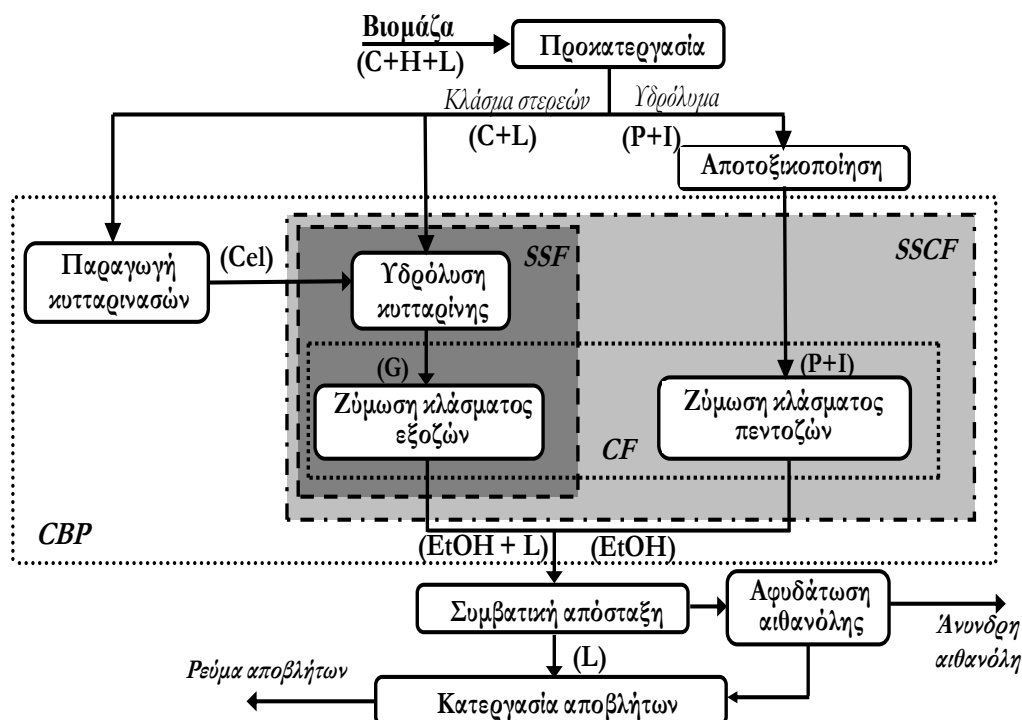
Μετά την προκατεργασία των λιγνινοκυτταρινούχων υλικών, η βιομετατροπή μπορεί να πραγματοποιηθεί με διαχωρισμό ή συνδυασμό των σταδίων της ενζυμικής υδρόλυσης και της ζύμωσης (Σχήμα 4.7) (Hamelinck *et al.* 2005, Mosier *et al.* 2005, Hahn-Hagerdal *et al.* 2006, Cardona & Sánchez 2007).

Όταν η ενζυμική υδρόλυση πραγματοποιείται ξεχωριστά από το στάδιο της ζύμωσης τότε η διεργασία καλείται «διακριτή υδρόλυση και ζύμωση» ή συντομογραφικά **SHF** (Separate Hydrolysis and Fermentation). Στη διάταξη αυτή η ενζυμική υδρόλυση της κυτταρίνης και της ημικυτταρίνης γίνεται σε ένα βιοαντιδραστήρα και το υγρό με τα προϊόντα της υδρόλυσης (εξόζες και πεντόζες) μεταφέρεται σε έναν δεύτερο βιοαντιδραστήρα όπου κατάλληλοι μικροοργανισμοί μεταβολίζουν τα σάκχαρα σε βιοαιθανόλη. Το κύριο πλεονέκτημα της SHF είναι ότι το κάθε στάδιο επιτελείται στις βέλτιστες συνθήκες (θερμοκρασία, pH) που συνήθως διαφέρουν αρκετά μεταξύ

τους (45-50°C για υδρόλυση, 28-37°C για ζύμωση). Το μειονέκτημα είναι ότι τα υδρολυτικά ένζυμα (κυτταρινάσες & ημικυτταρινάσες) παρεμποδίζονται από τα προϊόντα υδρόλυσης με αποτέλεσμα η συσσώρευση εξοζών και πεντοζών να οδηγήσει σε σταδιακή μείωση του ρυθμού υδρόλυσης. Συνήθως η ζύμωση των πεντοζών γίνεται σε διαφορετικό βιοαντιδραστήρα γιατί απαιτεί περισσότερο χρόνο και διαφορετικούς μικροοργανισμούς σε σχέση με τις εξόζες, αυξάνοντας έτσι το συνολικό κόστος (Hamelinck *et al.* 2005, Mosier *et al.* 2005, Hahn-Hagerdal *et al.* 2006, Chandel *et al.* 2007, Cardona & Sánchez 2007, Balat *et al.* 2008, Sánchez & Cardona 2008).

Ένας τρόπος να αρθεί η παρεμπόδιση των ενζύμων από τα προϊόντα υδρόλυσης είναι αυτά να μεταβολίζονται καθώς εμφανίζονται στο υγρό. Η «ταυτόχρονη σακχαροποίηση και ζύμωση» ή αλλιώς **SSF** (Simultaneous Saccharification and Fermentation) συνδυάζει την ενζυμική υδρόλυση με την αλκοολική ζύμωση διατηρώντας χαμηλά τα επίπεδα τα σακχάρων στο υγρό. Η μέθοδος SSF οδηγεί σε υψηλότερες αποδόσεις αιθανόλης (έως και 40%) εξαλείφοντας την παρεμπόδιση από τα προϊόντα υδρόλυσης και την ανάγκη για διαφορετικούς αντιδραστήρες υδρόλυσης και ζύμωσης. Επίσης οι χρόνοι και οι όγκοι της διεργασίας είναι μικρότεροι, απαιτούνται μικρότερες ενεργότητες ενζύμων και ελαχιστοποιείται η πιθανότητα επιμόλυνσης λόγω των χαμηλών συγκεντρώσεων γλυκόζης, της παρουσίας αιθανόλης και των αναερόβιων συνθηκών. Παρόλα αυτά η μέθοδος έχει κάποια μειονεκτήματα, όπως η ανάγκη συμβιβασμού στις συνθήκες (θερμοκρασία & pH) ώστε να λειτουργούν σε ικανοποιητικό βαθμό και τα δύο στάδια ταυτόχρονα, καθώς και η δυσκολία στη συμβατότητα μικροοργανισμών-ενζύμων (Sun & Cheng 2002, Mosier *et al.* 2005, Lin & Tanaka 2006, Hahn-Hagerdal *et al.* 2006, Cardona & Sánchez 2007, Chandel *et al.* 2007, Balat *et al.* 2008, Olofsson *et al.* 2008, Sánchez & Cardona 2008, Hayes 2009).

Μια εναλλακτική στρατηγική στη βιομετατροπή της λιγνινοκυτταρινούχου βιομάζας είναι η «ενοποιημένη βιοδιεργασία» (Consolidated Bioprocessing) ή **CBP**, στην οποία εφαρμόζεται ένα μόνο μικροβιακό σύστημα που έχει την ικανότητα να παράγει τα απαραίτητα υδρολυτικά ένζυμα και να μεταβολίζει τα προϊόντα τους σε αιθανόλη. Η ιδέα της CBP ενσωματώνει σε ένα μοναδικό στάδιο τρεις βιομετατροπές: (α) παραγωγή των υδρολυτικών ενζύμων, (β) υδρόλυση των δομικών συστατικών της βιομάζας, (γ) ζύμωση των παραγόμενων εξοζών (γλυκόζης, μαννόζης, γαλακτόζης) και των πεντοζών (ξυλόζης, αραβινόζης).



Σχήμα 4.7. Γενικευμένο διάγραμμα παραγωγής βιοαιθανόλης από λιγνινοκυτταρινούχα βιομάζα. Δυνατότητες σύζευξης διεργασιών παρουσιάζονται στα σκιασμένα τμήματα. CF: Ταυτόχρονη ζύμωση κλάσματος εξοζών και πεντοζών (Co-Fermentation), SSF: Ταυτόχρονη σακχαροποίηση και ζύμωση (Simultaneous Saccharification and Fermentation), SSCF: Ταυτόχρονη σακχαροποίηση και ζύμωση κλάσματος εξοζών και πεντοζών (Simultaneous Saccharification and Co-Fermentation), CBP: Ενοποιημένη βιοδιεργασία (Consolidated BioProcessing). C: κυτταρίνη, H: ημικυτταρίνη, L: λιγνίνη, Cel: κυτταρινάσες, G: γλυκόζη, P: πεντόζες, I: παρεμποδιστές, EtOH: αιθανόλη (Cardona & Sánchez, 2007).

Η CBP προσφέρει τη δυνατότητα για χαμηλότερο κόστος παραγωγής βιοκαυσίμων, χαμηλότερες ενεργειακές απαιτήσεις, υψηλότερη αποδοτικότητα βιομετατροπής σε σχέση με την SSF και πλήρη συμβατότητα μικροοργανισμών-ενζύμων. Επίσης, δεν απαιτούνται επιπλέον κεφάλαια και λειτουργικό κόστος για την παραγωγή των ενζύμων. Υποψήφιοι μικροοργανισμοί για CBP είναι ορισμένοι μύκητες όπως *Fusarium*, *Neurospora*, *Monilia*, *Rhizopus*, *Aspergillus*, και *Trichoderma*, οι οποίοι παράγουν υδρολυτικά ένζυμα και μπορούν να μετατρέπουν τα παραγόμενα από την υδρόλυση σάκχαρα σε αιθανόλη, με χαμηλές όμως αποδόσεις και αργούς ρυθμούς ζύμωσης. (Lynd *et al.* 2005, Cardona & Sánchez 2007, Chandel *et al.* 2007, Carere *et al.* 2008, Xu 2009, Hayes 2009, Wei *et al.* 2009).

4.4. Μικροοργανισμοί για την παραγωγή αιθανόλης

Το στάδιο της βιομετατροπής περιλαμβάνει τη χρήση μικροοργανισμών που μεταβολίζουν τα παραγόμενα από τα προηγούμενα στάδια ζυμώσιμα σάκχαρα για την υποστήριξη της ανάπτυξής τους, παράγοντας αιθανόλη, CO₂ και άλλα παραπροϊόντα. Αρκετές μελέτες και αναφορές έχουν δημοσιευτεί για την παραγωγή αιθανόλης από διάφορους μικροοργανισμούς, όπως βακτήρια, ζύμες και μύκητες (Demirbas 2005). Οι γενικές απαιτήσεις ενός μικροοργανισμού για χρήση στην παραγωγή αιθανόλης περιλαμβάνουν τις υψηλές αποδόσεις σε αιθανόλη, την υψηλή παραγωγικότητα και την ανθεκτικότητα σε μεγάλες συγκεντρώσεις αιθανόλης (Olofsson *et al.* 2008).

Η ζύμη *Saccharomyces cerevisiae* έχει εδραιωθεί στην παραγωγή αιθανόλης από σακχαρούχα και αμυλούχα υποστρώματα, εμφανίζει υψηλές αποδόσεις αλλά και ανθεκτικότητα στην αιθανόλη, σε παραπροϊόντα της ζύμωσης και σε άλλες παρεμποδιστικές ενώσεις που είναι παρούσες σε λιγνινοκυτταρινούχα υλικά (Almeida *et al.* 2007). Η ζύμη *S. cerevisiae* μεταβολίζει την γλυκόζη σε αιθανόλη μέσω του μονοπατιού Embden-Meyerhof-Parnas (EMP).

Η ζύμη *S. cerevisiae* λειτουργεί σε περιοχές pH 3,0 – 7,5 με την άριστη περιοχή να είναι συνάρτηση και της θερμοκρασίας. Είναι μεσόφιλος οργανισμός με ευνοϊκή θερμοκρασία από 20 έως 40° C. Η απόδοση σε αιθανόλη αυξάνεται με αύξηση της θερμοκρασίας έως 30-32° C ενώ με περαιτέρω αύξηση επέρχεται μείωση στην απόδοση (Θ Τσούτσος, Διδακτορική διατριβή, 1990). Η συγκέντρωση του διαλυμένου O₂ έχει μεγάλη επίδραση στο ρυθμό μικροβιακής ανάπτυξης και της παραγωγής των προϊόντων. Αύξηση της συγκέντρωσης του διαλυμένου O₂ ευνοεί τον σχηματισμό προϊόντων μέσα από έντονα οξειδωτικά ενδιάμεσα στάδια, ενώ η μείωση του ευνοεί το σχηματισμό προϊόντων με αναγωγικές δράσεις. Γενικά οι αναερόβιες συνθήκες ευνοούν το μεταβολισμό της γλυκόζης σε αιθανόλη, ενώ σε αερόβιες σχηματίζεται ζύμη η οποία όταν η συγκέντρωση της γλυκόζης στο υπόστρωμα φτάσει τα 70 g/L, μετατρέπεται μερικά σε αιθανόλη και CO₂. Μικρή συγκέντρωση O₂ ωστόσο είναι απαραίτητη για διάφορες λειτουργίες της ζύμης.

Ένα διαφορετικό μονοπάτι αφομοίωσης της γλυκόζης είναι το Entner-Doudoroff (ED), που αξιοποιείται συνοδευτικά με το EMP από πολλά βακτήρια, όπως του γένους *Zymomonas*. Τα βακτήρια αυτά είναι οι μόνοι μικροοργανισμοί που μεταβολίζουν αναερόβια τη γλυκόζη μέσω του ED μονοπατιού, σε αντίθεση με το EMP ή τη γλυκόλυση (Dien *et al.* 2003, Olofsson *et al.* 2008). Το μονοπάτι ED

αποδίδει μόνο το μισό ποσοστό ATP ανά mol γλυκόζης σε σχέση με το EMP, με αποτέλεσμα τα βακτήρια *Zygomonas* να παράγουν λιγότερη κυτταρική βιομάζα σε σχέση με τη ζύμη και να διοχετεύουν μεγαλύτερο ποσοστό της πηγής άνθρακα προς μεταβολικά προϊόντα. Το βακτήριο *Z. mobilis* είναι ένας άλλος μικροοργανισμός που χρησιμοποιείται στη βιομηχανική παραγωγή αιθανόλης, το οποίο έχει υψηλότερες αποδόσεις από τις ζύμες, λόγω της παραγωγής λιγότερης βιομάζας, αλλά αναπτύσσεται με πιο αργό ρυθμό (Dien *et al.* 2003, Olofsson *et al.* 2008).

Σε αντίθεση με την επεξεργασία των σακχαρούχων και αμυλούχων υποστρωμάτων όπου απελευθερώνονται μόνο μονομερή γλυκόζης, η επεξεργασία των λιγνινοκυτταρινούχων υποστρωμάτων οδηγεί και σε πεντόζες. Όμως η ζύμη *S. cerevisiae* και το βακτήριο *Z. mobilis* δεν διαθέτουν την ικανότητα μεταβολισμού των πεντοζών. Στη φύση, ορισμένα βακτήρια, μύκητες και κάποιες ζύμες έχουν την ικανότητα να μεταβολίζουν πεντόζες, αλλά με χαμηλή απόδοση σε αιθανόλη. Η χρήση σε μεγάλη κλίμακα ζυμών που μεταβολίζουν πεντόζες (*Pichia stipitis*, *Pachysolen tannophilus* και *Candida shehatae*) παρουσιάζει προβλήματα λόγω της ευαισθησίας τους σε υψηλές συγκεντρώσεις αιθανόλης, της απαίτησης για συγκεκριμένες συνθήκες αερισμού, την υψηλή ευαισθησία σε παρεμποδιστές και την ανικανότητα να ζυμώσουν τις πεντόζες σε χαμηλά pH (Jeffries *et al.* 2007, Olofsson *et al.* 2008). Τα μεταβολικά μονοπάτια που σχετίζονται με το μεταβολισμό της ξυλόζης είναι διαφορετικά μεταξύ των βακτηρίων και των ευκαρυωτικών μυκήτων και ζυμών. Στα βακτήρια, η ισομεράση της ξυλόζης (XI) μετατρέπει την ξυλόζη σε ξυλουλόζη, η οποία μετά από φωσφορυλίωση από την κινάση της ξυλουλόζης (XK) μεταβολίζεται μέσω του μονοπατιού των φωσφορικών πεντοζών (PPP). Στους μύκητες και τις ζύμες η ξυλόζη μετατρέπεται σε ξυλιτόλη και έπειτα σε ξυλουλόζη μέσω αντιδράσεων που καταλύονται από την αναγωγή της ξυλόζης (XR) και την αφυδρογονάση της ξυλιτόλης (XDH), αντίστοιχα (Zaldivar *et al.* 2001).

Στον Πίνακα 4.3 συνοψίζονται τα βασικά χαρακτηριστικά μικροοργανισμών που χρησιμοποιούνται στη βιομετατροπή λιγνινοκυτταρινούχων υλικών σε αιθανόλη.

4.5. Παρεμποδιστικοί παράγοντες της αλκοολικής ζύμωσης

Η ποσότητα και η φύση των παρεμποδιστών της αλκοολικής ζύμωσης εξαρτάται από την πρώτη ύλη, τις διεργασίες προκατεργασίας και υδρόλυσης καθώς και από το

ποσοστό της ανακυκλοφορίας στη διεργασία. Συνοπτικά την αλκοολική ζύμωση παρεμποδίζουν:

1. ενώσεις οι οποίες απελευθερώνονται κατά την προκατεργασία και υδρόλυση λιγνινοκυτταρινούχων υλικών. Στη συγκεκριμένη κατηγορία, περιλαμβάνονται το οξικό οξύ (απελευθερώνεται κατά την υδρόλυση της ημικυτταρίνης) και διάφορα εκχυλίσματα. Τα τελευταία, είναι κυρίως τερπένια, αλκοόλες και αρωματικές ενώσεις όπως οι ταννίνες.
2. προϊόντα καταστροφής των σακχάρων φουρφουράλη, 5-υδροξυμεθυλοφουρφουράλη, λεβονιλικό οξύ, μυρμηκικό οξύ), τα οποία παράγονται κατά την προκατεργασία
3. προϊόντα αποικοδόμησης της λιγνίνης, στα οποία περιλαμβάνεται ένα ευρύ φάσμα αρωματικών και πολυαρωματικών ενώσεων με ποικιλία υποκαταστατών
4. προϊόντα της ζύμωσης όπως αιθανόλη, οξικό οξύ, γλυκερόλη, ακεταλδεΰδη και γαλακτικό οξύ. Η αιθανόλη επηρεάζει κυρίως την κυτταρική ανάπτυξη και βιωσιμότητα καθώς και την παραγωγικότητα.

Πίνακας 4.3. Πλεονεκτήματα και μειονεκτήματα των μικροοργανισμών που χρησιμοποιούνται για την παραγωγή αιθανόλης (Limayem and Ricke, 2012)

Μικροοργανισμός	Χαρακτηριστικά	Πλεονεκτήματα	Μειονεκτήματα
<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	Προαιρετικά αναερόβια ζύμη	Φυσικά προσαρμοσμένη στην αλκοολική ζύμωση Υψηλή απόδοση σε αιθανόλη (90%) Υψηλή ανθεκτικότητα σε αιθανόλη (μέχρι και 10%) Επιδεκτική σε γενετικές τροποποιήσεις	Δεν μεταβολίζει πεντόζες Δεν επιβιώνει σε υψηλές θερμοκρασίες όπως αυτές της υδρόλυσης
<i>Zymomonas mobilis</i>	Αιθανολοπαραγωγό, αρνητικό κατά Gram βακτήριο	Υψηλή απόδοση σε αιθανόλη (97%) Υψηλή ανθεκτικότητα σε αιθανόλη (μέχρι και 14%) Υψηλή παραγωγικότητα Επιδεκτικό σε γενετικές τροποποιήσεις	Δεν μεταβολίζει πεντόζες Χαμηλή ανθεκτικότητα στους παρεμποδιστές
<i>Pichia stipitis</i>	Προαιρετικά αναερόβια ζύμη	Ζύμωση ξυλόζης Υψηλή απόδοση σε αιθανόλη (82%) Μεταβολίζει όλα τα σάκχαρα που προέρχονται από την υδρόλυση των λιγνινοκυτταρινούχων υλικών συμπεριλαμβανομένων των γλυκόζη, γαλακτόζη και κελλοβιόζη Διαθέτει κυτταρινολυτικά ένζυμα που την καθιστούν κατάλληλη για διεργασία SSF	Ανθεκτικότητα σε αιθανόλη έως 40 g/L Χαμηλή ανθεκτικότητα στους παρεμποδιστές Απαίτηση σε μικροαερόβιες συνθήκες Επαναμεταβολίζει την αιθανόλη Δεν μεταβολίζει την ξυλόζη σε χαμηλές τιμές pH
<i>Candida shehatae</i>	Μικροαερόφιλη ζύμη	Ζύμωση ξυλόζης	Χαμηλή ανθεκτικότητα στην αιθανόλη Χαμηλή απόδοση αιθανόλης Απαίτηση σε μικροαερόβιες συνθήκες Δεν μεταβολίζει την ξυλόζη σε χαμηλές τιμές pH
<i>Pachysolen tanniphilus</i>	Αερόβιος μύκητας	Ζύμωση ξυλόζης	Χαμηλή απόδοση αιθανόλης Απαίτηση σε μικροαερόβιες συνθήκες Δεν μεταβολίζει την ξυλόζη σε χαμηλές τιμές pH
<i>Escherichia coli</i>	Μεσόφιλο, αρνητικό	Ικανότητα να χρησιμοποιεί πεντόζες και	Καταβολική καταστολή που εμπλέκεται στο

	κατά Gram βακτήριο	εξόζες Επιδεκτικό σε γενετικές τροποποιήσεις -	συμμεταβολισμό Περιορισμένη ανθεκτικότητα στην αιθανόλη Στενό εύρος τιμών pH και θερμοκρασίας ανάπτυξης Παραγωγή οργανικών οξέων Χαμηλή ανθεκτικότητα στους παρεμποδιστές Δεν έχει αποδειχτεί ακόμα η γενετική σταθερότητα
<i>Klesbiella oxytoca</i>	Μεσόφιλο, αρνητικό κατά Gram βακτήριο	Ικανότητα να χρησιμοποιεί πεντόζες και εξόζες, κελλοβιόζη και κελλοτριόζη Επιδεκτικό σε γενετικές τροποποιήσεις	Περιορισμένη ανθεκτικότητα στην αιθανόλη Στενό εύρος τιμών pH και θερμοκρασίας ανάπτυξης Παραγωγή οργανικών οξέων Χαμηλή ανθεκτικότητα στους παρεμποδιστές Καταβολική καταστολή που εμπλέκεται στο συμμεταβολισμό πεντοζών-εξοζών
<i>Kluveromyces marxianus</i>	Θερμόφιλη ζύμη	Αναπτύσσεται σε υψηλές θερμοκρασίες πάνω από 52oC Κατάλληλη για διεργασίες SSF/CBP Μείωση του κόστους ψύξης Μείωση των κινδύνων επιμόλυνσης Μεταβολίζει ένα ευρύ φάσμα σακχάρων Επιδεκτική σε γενετικές τροποποιήσεις	Υψηλή συγκέντρωση σακχάρων επηρεάζει την απόδοση σε αιθανόλη Χαμηλή ανθεκτικότητα στην αιθανόλη Δεν ζυμώνει ικανοποιητικά την ξυλόζη και παράγει κυρίως ξυλιτόλη
<i>Thermoanaerobacterium saccharolyticum</i> <i>Thermoanaerobacter ethanolicus</i> <i>Clostridium thermocellum</i>	Αναερόβια βακτήρια εξτρεμόφιλα	Αντοχή έως τους 70oC Resistance up to 70oC Κατάλληλα για διεργασίες SSF/CBP Μεταβολίζει ένα ευρύ φάσμα σακχάρων Εμφανίζουν κυτταρινολυτική δράση Επιδεκτικά σε γενετικές τροποποιήσεις	Χαμηλή ανθεκτικότητα στην αιθανόλη

Μέθοδοι & Υλικά

1. Μικροοργανισμοί

Ο μικροοργανισμός που χρησιμοποιήθηκε για την παραγωγή αιθανόλης στην παρούσα εργασία είναι η ζύμη *Saccharomyces cerevisiae* (ξηρή μαγιά αρτοποιίας – Γιώτης Α.Ε.).

2. Πρώτες ύλες και χημικά αντιδραστήρια

Ως πρώτη ύλη χρησιμοποιήθηκαν τεμαχισμένα στελέχη βαμβακιού. Τα χημικά αντιδραστήρια που χρησιμοποιήθηκαν ήταν αναλυτικού βαθμού καθαρότητας, προϊόντα της εταιρείας Sigma (Η.Π.Α.).

Χρησιμοποιήθηκε το εμπορικό σκεύασμα Cellic[®] CTec2 της εταιρείας Novozymes (Δανία) το οποίο αποτελεί μίγμα κυτταρινάσων και ξυλανάσης.

3. Όργανα

- Φωτόμετρο (Hitachi UV 2000)
- pH-μετρο 537 (WTW, Γερμανία)
- Ηλεκτρονικοί ζυγοί ακριβείας
- Συσκευή διήθησης
- Θερμοστατούμενοι περιστροφικοί αναδευτήρες (Zhicheng 211C, Κίνα, LAB-LINE Incubator-Shaker, Η.Π.Α.)
- Φούρνος μικροκυμάτων (Microwave digestion equipment, speed wave[™] MWS-2, Berghof Instruments GmbH, Γερμανία)
- Αποστείρωση
- GC
- Microplate reader (SpectraMax 250, Molecular Devices)
- Φυγόκεντρος Beckman Coulter και φυγόκεντρος πάγκου Eppendorf 3200
- Vortex

4. Προκατεργασία στελεχών βαμβακιού

Τα στελέχη βαμβακιού υποβλήθηκαν σε δυο ειδών προκατεργασίες. Αλκαλική προκατεργασία με 0-10% NaOH και συγκέντρωση στερεού 10 και 15% w/v στους 121 °C για 60min. Ακολούθησε διήθηση, έκπλυση του στερεού υπολείμματος με H₂O και τέλος ξήρανση στους 65 °C.

Υδροθερμική προκατεργασία παρουσία θειικού οξέος. Για την προκατεργασία χρησιμοποιήθηκε Φούρνος Μικροκυμάτων (Microwave digestion equipment (speedwave™ MWS-2, Berghof Instruments GmbH, Γερμανία). Η συσκευή ήταν εφοδιασμένη με ανιχνευτή υπέρυθρων για την εξ αποστάσεως μέτρηση της θερμοκρασίας, χωρίς επαφή με το δείγμα το οποίο βρισκόταν σε ειδικά φιαλίδια ανθεκτικά σε υψηλή πίεση (≤ 40 bars) και θερμοκρασία ($\leq 220^\circ\text{C}$). Η ισχύς του φούρνου μικροκυμάτων ρυθμίστηκε στα 700 W. Η προκατεργασία πραγματοποιήθηκε για συγκέντρωση υποστρώματος 15% β/ο, παρουσία 2% β/β H_2SO_4 , για 10 min στους 210°C . Το προκύπτον υλικό χρησιμοποιήθηκε είτε ως είχε (whole slurry) είτε πραγματοποιήθηκε διαχωρισμός του υγρού ρεύματος της προκατεργασίας από το στερεό υπόλειμμα με διήθηση. Στην τελευταία περίπτωση πραγματοποιήθηκε έκπλυση του στερεού υπολείμματος με H_2O και τέλος ξήρανση στους 65°C .

5. Ενζυμική υδρόλυση προκατεργασμένων στελεχών βαμβακιού

Σε κάθε περίπτωση ο όγκος της αντίδρασης ήταν 10 mL. Η συγκέντρωση του στερεού ήταν 15% β/ο. Το ενζυμικό σκεύασμα αραιώνονταν κατάλληλα με ρυθμιστικό διάλυμα κιτρικών/φωσφορικών 100 mM με $\text{pH}=5.0$. Μελετήθηκαν ενζυμικά φορτία: 1, 3, 5, 7, 9, 20, 40 και 80 FPU/gr κυτταρίνης. Η θερμοκρασία της υδρόλυσης ήταν 50°C και σε κάθε μίγμα προστέθηκε αζίδιο του νατρίου (τελική συγκέντρωση 0.01% w/v) με σκοπό την αποτροπή μικροβιακής μόλυνσης. Σε τακτά χρονικά διαστήματα λαμβάνονταν δείγματα προκειμένου να μετρηθούν τα αναγωγικά σάκχαρα και η γλυκόζη. Τα πειράματα πραγματοποιήθηκαν εις διπλούν.

6. Παραγωγή αιθανόλης από προκατεργασμένα στελέχη βαμβακιού

Η ζύμωση του αλκαλικά προκατεργασμένου καθώς και του υδροθερμικά προκατεργασμένου υλικού πραγματοποιήθηκε σε συγκέντρωση υποστρώματος 15% β/ο, με προσθήκη κατάλληλης ποσότητας μορφοτικού σκευάσματος κυτταρινολυτικών ενζύμων Celllic® CTec2. Πραγματοποιήθηκε ένα σύντομο στάδιο προϋδρόλυσης του υλικού διάρκειας 6 ωρών στους 50°C , ακολούθησε ψύξη στους 30°C και προσθήκη 15 mg ξηρής μαγιάς αρτοποιίας/g αρχικού ξηρού υλικού (Yiotis, Athens, Greece). Οι φιάλες τοποθετήθηκαν σε θερμοστατούμενο αναδευτήρα (80 ± 2 rpm) θερμοκρασίας $30\pm 0.5^\circ\text{C}$. Δείγματα λαμβάνονταν σε τακτά χρονικά διαστήματα και αναλύονταν ως

προς την παραγόμενη αιθανόλη και τα αναγωγικά σάκχαρα. Τα πειράματα πραγματοποιήθηκαν εις διπλούν.

7. Προσδιορισμός αιθανόλης

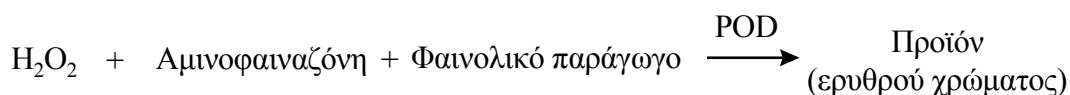
Η αιθανόλη προσδιορίστηκε με χρήση αέριου χρωματογράφου. Η στήλη διαχωρισμού ήταν DB-WAX (15m x 0.54 mm) (J & D Scientific) και ο ανιχνευτής ιονισμού φλόγας. Χρησιμοποιήθηκε ήλιο ως φέρον αέριο (ροή 7 ml/min) και εφαρμόστηκε βαθμίδωση θερμοκρασίας 40-220°C. Η θερμοκρασία του εισαγωγέα δείγματος καθώς και του ανιχνευτή ήταν 220°C.

8. Προσδιορισμός αναγωγικών σακχάρων

Ο προσδιορισμός των αναγωγικών σακχάρων πραγματοποιείται με τη φωτομετρική μέθοδο του 3,5-δινιτροσαλικυλικού οξέος (DNS ή 2-υδρόξυ-3,5-δινιτροβενζοϊκό οξύ) (Miller, 1959).

9. Προσδιορισμός συγκέντρωσης γλυκόζης με τη χρήση ειδικού εμπορικού διαγνωστικού σκευάσματος (kit)

Η συγκεκριμένη μέθοδος βασίζεται στη μετατροπή της γλυκόζης σε ένα προϊόν ερυθρού χρώματος το οποίο είναι αποτέλεσμα της διαδοχικής δράσης των ενζύμων οξειδάση και υπεροξειδάση της γλυκόζης. Αρχικά, η γλυκόζη με τη δράση της οξειδάσης της γλυκόζης μετατρέπεται σε γλυκονικό οξύ με την ταυτόχρονη παραγωγή υπεροξειδίου του υδρογόνου. Ακολούθως, το υπεροξείδιο του υδρογόνου παρουσία αμινοφαιναζόνης και κάποιου φαινολικού παραγώγου με τη δράση της υπεροξειδάσης μετατρέπεται σε κάποιο προϊόν ερυθρού χρώματος το οποίο παρουσιάζει μέγιστη απορρόφηση στα 510 nm (Σχήμα 1).



GOD: οξειδάση της γλυκόζης, POD: υπεροξειδάση της γλυκόζης

Σχήμα 1. Αλληλουχία ενζυμικών αντιδράσεων που οδηγούν στην ποσοτικοποίηση της γλυκόζης.

Ο προσδιορισμός της συγκέντρωσης της γλυκόζης γίνεται με τη βοήθεια microplate reader (SpectraMax 250, Molecular Devices).

10. Προσδιορισμός ολικής ενεργότητας κυτταρινασών

Η ολική ενεργότητα κυτταρινασών (Filter Paper Activity-FPA Units) μετρήθηκε σύμφωνα με τη επίσημη μέθοδο κατά IUPAC (Ghose 1987). Η ενεργότητα του ενζυμικού σκευάσματος Cellic[®] CTec2 βρέθηκε ίση με 226.7 FPU/ml σκευάσματος.

11. Μέτρηση παραγόμενων παρεμποδιστών

Οι παρεμποδιστικές ενώσεις (μυρμηγκικό οξύ, φουρφουράλη και υδροξυμεθυλφουρφουράλη) προσδιορίστηκαν με Υγρή Χρωματογραφία Υψηλής Απόδοσης (HPLC). Χρησιμοποιήθηκε σύστημα αντλίας Jasco HPLC (PU-987), στήλη Aminex HPX-87H (BIORAD) και ανιχνευτή δείκτη διάθλασης (RI. Ως διαλύτης έκλουσης χρησιμοποιήθηκε διάλυμα 5 mM H₂SO₄ με ροή 0.6 mL/min και η θερμοκρασία της στήλης ρυθμίστηκε στους 50°C (Dogaris *et al.* 2009).

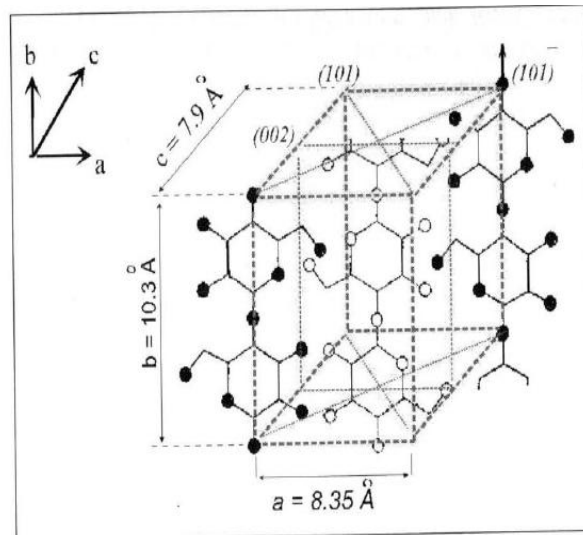
12. Ανάλυση στερεού υπολείμματος – Μέθοδος NREL

Η ανάλυση του στερεού υπολείμματος της προκατεργασίας και της αλκοολικής ζύμωσης σε κυτταρίνη και ημικυτταρίνη έγινε σύμφωνα με τη μέθοδο NREL (Sluiter 2005). Συνοπτικά, περιλάμβανε την όξινη υδρόλυση 300 mg από ξηρό δείγμα με 3 mL διαλύματος 72% (w/w) θεικού οξέος για 60 λεπτά στους 30°C, έπειτα αραίωση με 84 mL απιονισμένο νερό και επώαση σε κλίβανο αποστείρωσης στους 121°C για 60 λεπτά. Μετά από εξουδετέρωση των διαλυμάτων με CaCO₃, φυγοκέντρηση (10 min, 10000 rpm) και φιλτράρισμα (0.2 μm) το διήθημα που συγκεντρώνεται οδηγείται προς ανάλυση με χρήση του kit για προσδιορισμό της συγκέντρωσης της γλυκόζης (Sluiter *et al.*, 2012).

13. Προσδιορισμός δείκτη κρυσταλλικότητας

Μέρος της κυτταρίνης βρίσκεται σε κρυσταλλική μορφή, ενώ ένα άλλος μέρος της είναι άμορφο (ημικρυσταλλικό). Στις κρυσταλλικές περιοχές οι αλυσίδες της κυτταρίνης συνδέονται με δεσμούς υδρογόνου, γεγονός που δεν υφίσταται στις άμορφες περιοχές.

Η βασική μονάδα του κρυσταλλικού πλέγματος ονομάζεται μοναδιαία κυψελίδα (Σχήμα ?). Η μοναδιαία κυψελίδα είναι μονοκλινής με τρία κύρια επίπεδα ανάκλασης τα (002), (101) και ($10\bar{1}$) (Εικόνα 2α).



Σχήμα ?. Σχηματική απεικόνιση της μοναδιαίας κυψελίδας κυτταρίνης (Meyer & Misch, 1937)

Ο προσδιορισμός του δείκτη κρυσταλλικότητας πραγματοποιήθηκε σε όργανο περίθλασης ακτίνων X (Siemens D5000) χρησιμοποιώντας ακτινοβολία Cu-Kα.

Το δείγμα τοποθετείται σε κατάλληλο δειγματοφορέα στο κέντρο του γωνιόμετρου, το οποίο περιστρέφεται με σταθερή ταχύτητα θ στο επίπεδο ανάκλασης των ακτίνων X. Με τον τρόπο αυτό η επιφάνεια του δοκιμίου εκτίθεται στη μονοχρωματική ακτινοβολία μήκους κύματος $\lambda=1.5405 \text{ \AA}$, ενώ η γωνία θ αυξάνεται συνεχώς, με επιλεγμένο βήμα $0.01^\circ/s$ μεταξύ προεπιλεγμένων τιμών $2\theta=3-30^\circ$. Σημειώνεται ότι δεν περιστρέφεται μόνο το δοκίμιο αλλά και ο ανιχνευτής κατά γωνία 2θ , ώστε να ανιχνεύει τις ανακλώμενες ακτίνες. Έτσι λαμβάνεται διάγραμμα που αποτυπώνει την ένταση της ανακλώμενης ακτινοβολίας I συναρτήσει της γωνίας 2θ από το οποίο προσδιορίζεται ο δείκτης κρυσταλλικότητας.

Για γωνία $2\theta = 22.7^\circ$ εμφανίζεται η κορυφή του επιπέδου ανάκλασης (002) (κρυσταλλική περιοχή), ενώ για γωνία $2\theta = 18^\circ$ εμφανίζεται η άμορφη περιοχή η οποία βρίσκεται μεταξύ των επιπέδων ανάκλασης ($10\bar{1}$) και (002). Για τον υπολογισμό του δείκτη κρυσταλλικότητας προσδιορίζεται η μέγιστη ένταση (I_{002}) του επιπέδου ανάκλασης 002 καθώς και η ελάχιστη ένταση στην άμορφη περιοχή (I_{am})

που βρίσκεται πριν το επίπεδο ανάκλασης 002 μεταξύ των γωνιών 18-20° (Segal et al. 1959).

Ο δείκτης κρυσταλλικότητας προσδιορίστηκε με εφαρμογή της εξίσωσης του Segal και των συντελεστών του (Segal et al. 1959) (Εξ. 1).

$$CrI = \left(\frac{I_{002} - I_{am}}{I_{002}} \right) \times 100 \quad \text{Εξ. 1}$$

όπου, I_{002} είναι η μέγιστη ένταση του επιπέδου ανάκλασης 002 για $2\theta = 22.7^\circ$ και I_{am} είναι η ένταση της άμορφης περιοχής σε γωνία $2\theta = 18^\circ$

Αποτελέσματα

1. Προκατεργασία στελεχών βαμβακιού

Η σύσταση των στελεχών βαμβακιού παρουσιάζεται στον Πίνακα Π1. Η σύσταση συγκεκριμένης πρώτης ύλης παρουσιάζει διακυμάνσεις ανάλογα με την περιοχή που καλλιεργείται το βαμβάκι, την εποχή καθώς και τη μέθοδο συγκομιδής (Agblevor et al., 2003).

Πίνακας Π1. Σύσταση στελεχών βαμβακιού (CS)

Συστατικά	Περιεκτικότητα (% β/β, ξηρή βάση)*
Υδατοδιαλυτά (Extractives)	7.49 ± 0.18
Γλυκόζη	0.18 ± 0.00
TRS	2.04 ± 0.16
Κυτταρίνη	37.96 ± 3.68
Ημικυτταρίνη	14.74 ± 4.75
Λιγνίνη Klason	23.99 ± 0.97
Διαλυτή σε οξύ λιγνίνη	1.79 ± 0.08
Ολική λιγνίνη	25.79 ± 0.89

*Υγρασία: 7.17±0.42 % (β/β)

Η περιεκτικότητα των στελεχών βαμβακιού σε κυτταρίνη βρέθηκε ίση με 37.9% (ξηρή βάση) είναι υψηλότερη αυτής που αναφέρθηκε από τους Silverstein et al., (2007), Kaur et al., (2012) και Binod et al., (2012) (31.1% ,30.58% και 30% αντίστοιχα) και παρόμοια με αυτή που αναφέρθηκε από τους Shi et al., (2009), Jiang et al., (2015) και Du et al., (2013), Haykir & Bakir (2013), Huang et al., (2015) (35%-39.8% περίπου). Η περιεκτικότητα σε ημικυτταρίνη βρίσκεται στο εύρος τιμών (10.7%-16.7%) της βιβλιογραφίας (Silverstein et al., 2007, Shi et al., 2009, Kaur et al., 2012, Binod et al., 2012, Haykir & Bakir, 2013, Jiang et al., 2015, Huang et al., 2015).

Τα στελέχη βαμβακιού είναι μία πρώτη ύλη με υψηλό περιεχόμενο σε αδιάλυτη σε οξύ λιγνίνη (περίπου 27-30%). Είναι συγκρίσιμη με αυτή των σκληρών ξύλων (18-25%) και χαμηλότερη αυτής που περιέχεται στα ποώδη φυτά και στα άλλα υπολείμματα γεωργικών καλλιεργειών (10-20%), όπως στελέχη καλαμποκιού, άχυρο σίτου κλπ. (Silverstein et al., 2007, Shi et al., 2009, Kaur et al., 2012, Binod et al., 2012, Du et al., 2013, Haykir & Bakir 2013, Jiang et al., 2015, Huang et al., 2015). Για την αποτελεσματική αξιοποίηση των στελεχών βαμβακιού κρίσιμη παράμετρος είναι η απομάκρυνση της λιγνίνης.

Πραγματοποιήθηκε προκατεργασία των στελεχών βαμβακιού (CS) με χρήση διαλυμάτων NaOH. Ειδικότερα χρησιμοποιήθηκαν δύο συγκεντρώσεις CS (10% και 15% β/ο) και τέσσερις συγκεντρώσεις διαλύματος NaOH (0, 1, 5 και 10% β/β, δηλ. g NaOH/100 g CS). Η προκατεργασία έγινε στους 121°C για 1 h. Ακολούθησε διήθηση, έκλυση, ξήρανση του στερεού υπολείμματος και ανάλυσή του με την χρήση του πρωτοκόλλου του NREL (Μέθοδοι & Υλικά). Τα αποτελέσματα παρουσιάζονται στους Πίνακες Π2-Π9 και στο Διάγραμμα Δ1.

Πίνακας Π2. Σύσταση στερεού υπολείμματος προκατεργασίας CS. Συνθήκες: 10% β/ο CS, 0% β/β NaOH. Ανάκτηση στερεού: 86.56±0.32 %

Συστατικό	(%, β/β, ξηρή βάση)*
Κυτταρίνη	39.89 ± 9.19
Ημικυτταρίνη	18.37 ± 2.62
Λιγνίνη Klason	25.92 ± 0.43
Διαλυτή σε οξύ λιγνίνη	1.23 ± 0.01
Ολική λιγνίνη	27.15 ± 0.34

* g/100 g προκατεργασμένου υλικού

Πίνακας Π3. Σύσταση στερεού υπολείμματος προκατεργασίας CS. Συνθήκες: 10% β/ο CS, 1% β/β NaOH. Ανάκτηση στερεού: 81.45±0.23 %

Συστατικό	(%, β/β, ξηρή βάση)*
Κυτταρίνη	40.53 ± 5.93
Ημικυτταρίνη	17.84 ± 0.07
Λιγνίνη Klason	25.68 ± 0.39
Διαλυτή σε οξύ λιγνίνη	1.08 ± 0.00
Ολική λιγνίνη	26.76 ± 0.28

* g/100 g προκατεργασμένου υλικού

Πίνακας Π4. Σύσταση στερεού υπολείμματος προκατεργασίας CS. Συνθήκες: 10% β/ο CS, 5% β/β NaOH. Ανάκτηση στερεού: 76.46±0.17 %

Συστατικό	(%, β/β, ξηρή βάση)*
Κυτταρίνη	47.55 ± 1.15
Ημικυτταρίνη	25.16 ± 1.56
Λιγνίνη Klason	22.88 ± 0.14
Διαλυτή σε οξύ λιγνίνη	1.30 ± 0.11
Ολική λιγνίνη	24.18 ± 0.12

* g/100 g προκατεργασμένου υλικού

Πίνακας Π5. Σύσταση στερεού υπολείμματος προκατεργασίας CS. Συνθήκες: 10% β/o CS, 10% β/β NaOH. Ανάκτηση στερεού: 65.63±0.82 %

Συστατικό	(%, β/β, ξηρή βάση)*
Κυτταρίνη	53.41 ± 0.00
Ημικυτταρίνη	22.10 ± 1.98
Λιγνίνη Klason	22.03 ± 0.79
Διαλυτή σε οξύ λιγνίνη	1.28 ± 0.08
Ολική λιγνίνη	23.31 ± 0.70

* g/100 g προκατεργασμένου υλικού

Πίνακας Π6. Σύσταση στερεού υπολείμματος προκατεργασίας CS. Συνθήκες: 15% β/o CS, 0% β/β NaOH. Ανάκτηση στερεού: 82.48±0.43 %

Συστατικό	(%, β/β, ξηρή βάση)*
Κυτταρίνη	42.05 ± 1.03
Ημικυτταρίνη	23.13 ± 0.78
Λιγνίνη Klason	25.04 ± 0.30
Διαλυτή σε οξύ λιγνίνη	1.38 ± 0.08
Ολική λιγνίνη	26.42 ± 0.25

* g/100 g προκατεργασμένου υλικού

Πίνακας Π7. Σύσταση στερεού υπολείμματος προκατεργασίας CS. Συνθήκες: 15% β/o CS, 1% β/β NaOH. Ανάκτηση στερεού: 82.54±0.33 %

Συστατικό	(%, β/β, ξηρή βάση)*
Κυτταρίνη	44.48 ± 1.01
Ημικυτταρίνη	20.17 ± 0.09
Λιγνίνη Klason	25.32 ± 1.56
Διαλυτή σε οξύ λιγνίνη	1.18 ± 0.03
Ολική λιγνίνη	26.51 ± 1.48

* g/100 g προκατεργασμένου υλικού

Πίνακας Π8. Σύσταση στερεού υπολείμματος προκατεργασίας CS. Συνθήκες: 15% β/o CS, 5% β/β NaOH. Ανάκτηση στερεού: 78.73±0.33 %

Συστατικό	(%, β/β, ξηρή βάση)*
Κυτταρίνη	47.09 ± 0.01
Ημικυτταρίνη	24.54 ± 0.07
Λιγνίνη Klason	21.70 ± 0.93
Διαλυτή σε οξύ λιγνίνη	1.22 ± 0.01
Ολική λιγνίνη	22.91 ± 0.89

* g/100 g προκατεργασμένου υλικού

Πίνακας Π9. Σύσταση στερεού υπολείμματος προκατεργασίας CS. Συνθήκες: 15% β/ο CS, 10% β/β NaOH. Ανάκτηση στερεού: 64.28 ± 0.45 %

Συστατικό	(%, β/β, ξηρή βάση)*
Κυτταρίνη	55.31 ± 1.53
Ημικυτταρίνη	25.96 ± 0.72
Λιγνίνη Klason	22.19 ± 1.01
Διαλυτή σε οξύ λιγνίνη	1.15 ± 0.02
Ολική λιγνίνη	23.34 ± 0.98

* g/100 g προκατεργασμένου υλικού

Η προκατεργασία λιγνινοκυτταρινούχων υλικών με NaOH προκαλεί κυρίως απολιγνίνωση του υλικού διασπώντας τους εστερικούς δεσμούς που συνδέουν την λιγνίνη με την ημικυτταρίνη αυξάνοντας έτσι το πορώδες της βιομάζας (Taherzadeh & Karimi, 2008).

Η αύξηση της συγκέντρωσης του αλκάλειου στην προκατεργασία οδηγεί σε αύξηση της απώλειας στερεών (Πίνακες Π2-Π9) και της λιγνίνης. Η περιεκτικότητα του στερεού υπολείμματος της προκατεργασίας σε λιγνίνη κυμαίνεται από 26-23% με εξάρτηση από τη συγκέντρωση του NaOH. Ειδικότερα στη μέγιστη χρησιμοποιηθείσα συγκέντρωση αλκάλειου (10%, β/β) απομακρύνεται περίπου το 30% της περιεχόμενης λιγνίνης και στις δύο συγκεντρώσεις CS (10 και 15% β/ο) (Διάγραμμα Δ1). Η ημικυτταρίνη απομακρύνεται σε μικρότερα ποσοστά (περίπου 19%).

Οι Silverstein et al., (2007) αναφέρουν μείωση 65.63% της λιγνίνης και 30% της ημικυτταρίνης κατά την προκατεργασία στελεχών βαμβακιού με 20% (β/β) NaOH σε θερμοκρασία 121°C/15 psi για 90 min., ενώ απώλεια λιγνίνης και ημικυτταρίνης της τάξης του 52% και 68% αντίστοιχα παρατηρήθηκε από τους Haykir and Bakir (2012) κατά την προκατεργασία με 20% (β/β) NaOH στους 121°C για 60 min.

Πλήρη απολιγνίνωση στελεχών βαμβακιού και απομάκρυνση περίπου του 80% της ημικυτταρίνης επιτεύχθηκε με προκατεργασία στους 180°C, υπό ανάδευση (100 rpm) για 45 min με χρήση 76 g NaOH/100 g CS (Binod et al., 2012).

Μείωση 43.8% της περιεχόμενης λιγνίνης αναφέρθηκε κατά την αλκαλική προκατεργασία σε υψηλή πίεση των στελεχών βαμβακιού (συνθήκες προκατεργασίας αναλογία υγρού/στερεού 20:1, συγκέντρωση NaOH 3.0%, β/ο πίεση 130 kPa, για 40 min) (Du et al., 2013).

Οι Kaur et al., (2012), κατά την προκατεργασία στελεχών βαμβακιού με NaOH συγκέντρωσης από 10 έως 40% (β/β) για χρόνους προκατεργασίας 30, 60 και 90 min

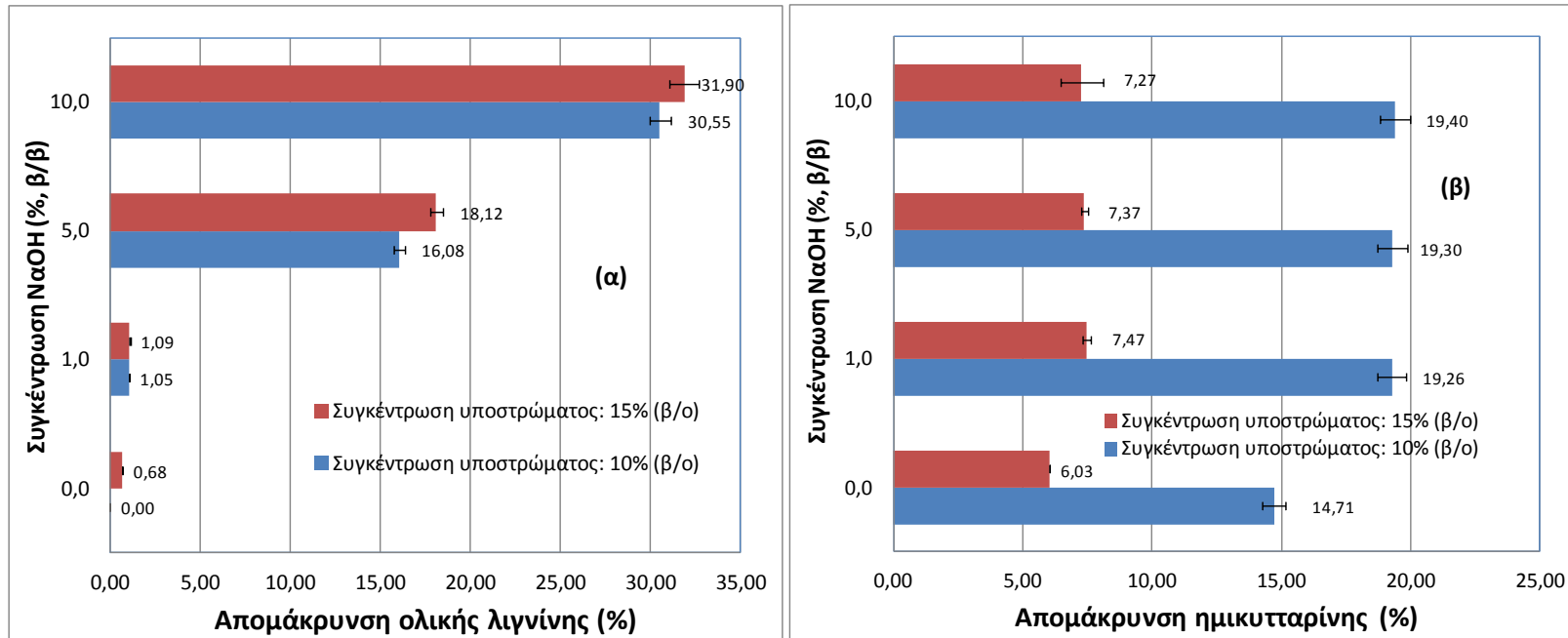
αναφέρουν μείωση της λιγνίνης από 51% (10%, β/β NaOH σε θερμοκρασία 121°C για 30 min) έως 72% (40%, β/β NaOH σε θερμοκρασία 121°C για 90 min) και διαλυτοποίηση της ημικυτταρίνης από 44% (10%, β/β NaOH σε θερμοκρασία 121°C για 30 min) έως 68% (40%, β/β NaOH σε θερμοκρασία 121°C για 90 min) .

Η αλκαλική προκατεργασία επέφερε μεταβολές στον δείκτη κρυσταλλικότητας της κυτταρίνης. Αύξηση της συγκέντρωσης του αλκάλειου οδηγεί σε αύξηση του δείκτη κρυσταλλικότητας της κυτταρίνης (Πίνακας Π10 και Δ2).

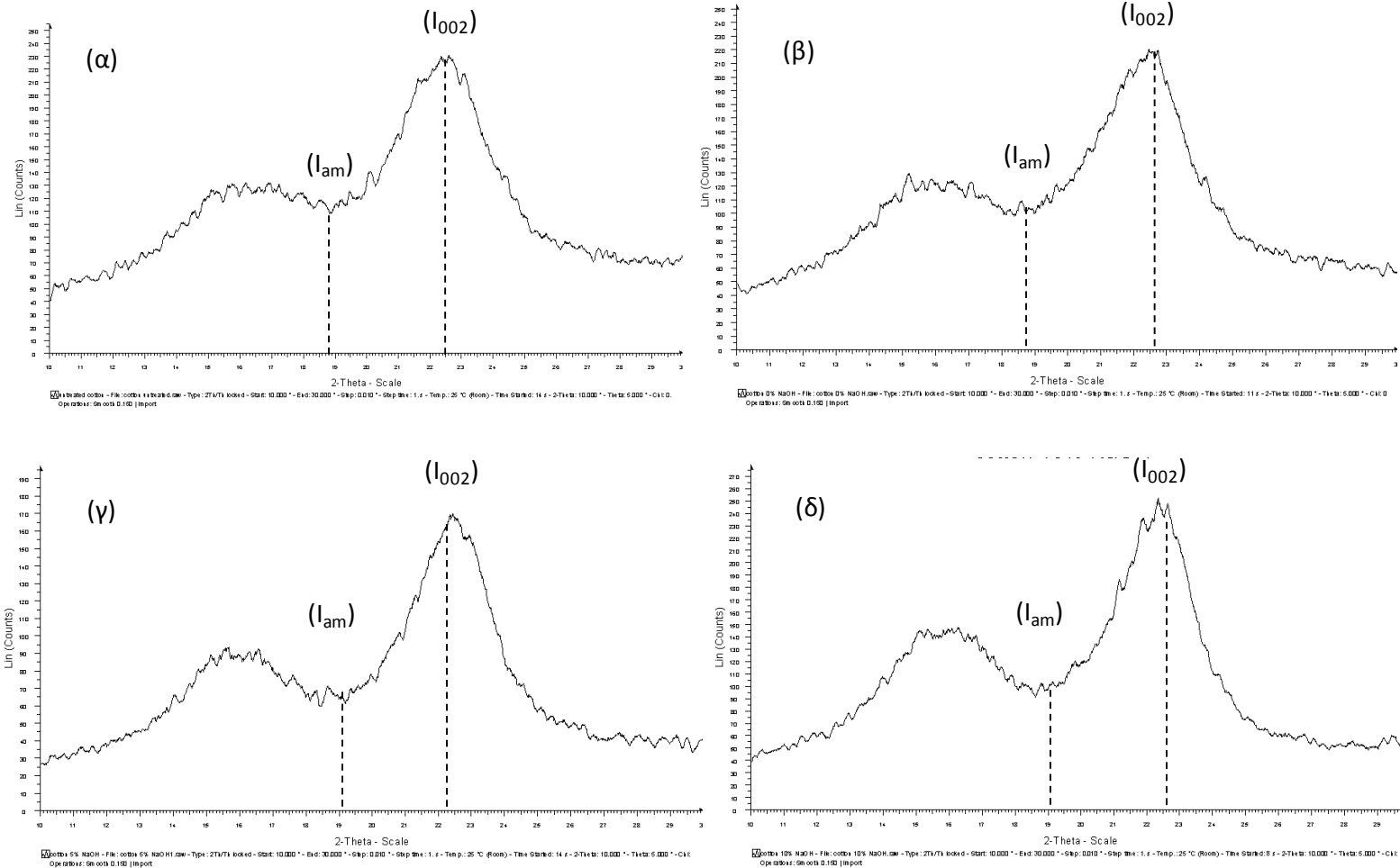
Πίνακας Π10. Μεταβολή του δείκτη κρυσταλλικότητας συναρτήσει της συγκέντρωσης NaOH στην προκατεργασία των στελεχών βαμβακιού

Προκατεργασία	CrI (%)
Ακατέργαστο βαμβάκι	52.58
Βαμβάκι προκατεργασμένο με 0% (β/β) NaOH	55.29
Βαμβάκι προκατεργασμένο με 5% (β/β) NaOH	64.53
Βαμβάκι προκατεργασμένο με 10% (β/β) NaOH	63.87

Η αύξηση του δείκτη κρυσταλλικότητας της κυτταρίνης οφείλεται στην απομάκρυνση λιγνίνης και ημικυτταρίνης κατά την προκατεργασία (Zhou et al., 2012). Επιπλέον αύξηση της τιμής του δείκτη κρυσταλλικότητας κατά 10% παρατηρήθηκε μετά την προκατεργασία με έκρηξη ατμού στελεχών βαμβακιού (Huang et al., 2015). Αντίθετα μείωση του δείκτη κρυσταλλικότητας παρατηρήθηκε κατά την προκατεργασία με το ιοντικό ρευστό 1-ethyl-3-methylimidazolium acetate (EMIMAc) (Haykir and Bakir, 2013). Τα στελέχη βαμβακιού είναι μία πρώτη ύλη με υψηλό περιεχόμενο σε λιγνίνη άρα η απομάκρυνσή της είναι κρίσιμη για τα απόμεινα στάδια της διεργασίας. Με αυτό το κριτήριο επιλέχθηκαν οι συνθήκες 15% β/ο συγκέντρωση CS και 10% β/β συγκέντρωση NaOH για περαιτέρω πειραματισμούς.



Διάγραμμα Δ1. Ποσοσιαία απομάκρυνση (α) ολικής λιγνίνης και (β) ημικυτταρίνης ως συνάρτηση της συγκέντρωσης CS και NaOH.



Διάγραμμα Δ2. Διάγραμμα περίθλασης ακτίνων X στελεχών βαμβακιού (α) ακατέργαστο (β) προκατεργασμένο με 0% NaOH, (γ) προκατεργασμένο με 5% NaOH και (δ) προκατεργασμένο με 10% NaOH

Επιπλέον πραγματοποιήθηκε υδροθερμική προκατεργασία των στελεχών βαμβακιού για συγκέντρωση υποστρώματος 15% β/ο, παρουσία 2% β/β H₂SO₄, για 10 min στους 210°C. Τα αποτελέσματα της σύστασης του στερεού υπολείμματος καθώς και του υγρού ρεύματος της προκατεργασίας παρουσιάζονται στους Πίνακες Π11-Π12.

Πίνακας Π11. Σύσταση στερεού υπολείμματος προκατεργασίας CS. Συνθήκες: 15% β/ο CS, 0.5% β/β H₂SO₄.

Συστατικό	Περιεκτικότητα (g/100 g προκατεργασμένου υλικού)
Κυτταρίνη	40.39 ± 0.33
Ημικυτταρίνη	0.49 ± 0.98
Λιγνίνη Klason	33.14 ± 0.54
Διαλυτή σε οξύ λιγνίνη	2.30 ± 0.02
Ολική λιγνίνη	35.43 ± 0.34

Ανάκτηση στερεού: 72.13 ± 0.77%

Πίνακας Π12. Σύσταση υγρού κλάσματος προκατεργασίας CS. Συνθήκες: 15% β/ο CS, 2%, β/β H₂SO₄. Η τυπική απόκλιση των μετρήσεων ήταν <5%.

Συστατικό	Συγκέντρωση (g/L)
Γλυκόζη	0.06 (0.04)**
Ολικά αναγωγικά σάκχαρα	16.50 (11.78)
Μυρμηγκικό οξύ	0.19 (0.12)
Οξικό οξύ	1.78 (1.20)
Λεβουλιλικό οξύ	δ.α.*
Φουρφουράλη	0.78 (0.52)
HMF	0.41 (0.26)
Διαλυτή σε οξύ λιγνίνη	0.81 (0.54)

*δ.α. δεν ανιχνεύτηκε, ** g/100 g στελεχών βαμβακιού

Η υδροθερμική προκατεργασία παρουσία 2% (β/β) H₂SO₄ οδήγησε σε σχεδόν πλήρη απομάκρυνση της ημικυτταρίνης και απομάκρυνση ποσοστού 23% της κυτταρίνης και 1% λιγνίνης (Πίνακας Π11).

Οι Jiang et al., (2015) μελέτησαν την επίδραση θερμοκρασίας και του χρόνου κατά την προκατεργασία στελεχών βαμβακιού με θερμό νερό (Liquid Hot Water) έδειξαν ότι και ακόμα σε υψηλές τιμές του παράγοντα έντασης της προκατεργασίας (Severity Factor) η απομάκρυνση της λιγνίνης ήταν μηδενική, εν αντιθέσει με την ημικυτταρίνη η οποία απομακρύνεται σε ποσοστό έως και 100%.

Οι Silverstein et al., (2012), κατά την προκατεργασία στελεχών βαμβακιού με H_2SO_4 συγκέντρωσης από 5 έως 20% (β/β) σε θερμοκρασίες 90°C και 121°C/15 psi, για χρόνους προκατεργασίας 30, 60 και 90 min, αναφέρουν μείωση της λιγνίνης από 2.27% (10%, β/β H_2SO_4 σε θερμοκρασία 90°C για 60 min) έως 24.16% (20%, β/β H_2SO_4 σε θερμοκρασία 121°C/15 psi για 90 min) και διαλυτοποίηση της ημικυτταρίνης από 15% (5%, β/β H_2SO_4 σε θερμοκρασία 90°C για 30 min) έως άνω του 90% (20%, β/β H_2SO_4 σε θερμοκρασία 121°C/15 psi για 90 min).

Άλλες προκατεργασίες στελεχών βαμβακιού που έχουν αναφερθεί στη βιβλιογραφία περιλαμβάνουν έκρηξη ατμού, χρήση H_2O_2 , όζοντος και ιοντικών ρευστών και βιολογική προκατεργασία.

Προκατεργασία με έκρηξη ατμού δύο διαφορετικών ειδών στελεχών βαμβακιού (Gb και Gh) οδήγησε σε απομάκρυνση της ημικυτταρίνης σε ποσοστά 32 και 29% αντίστοιχα και σχεδόν αμελητέα απομάκρυνση της λιγνίνης (Huang et al., 2015).

Προκατεργασία στελεχών βαμβακιού με όζον για χρόνους 30, 60 και 90 min μειώνει την περιεχόμενη λιγνίνη από 11.97 έως 16.6%, την ημικυτταρίνη από 1.9 έως 16.7% και την κυτταρίνη από 7.2% έως 16.6% (Silverstein et al., 2007). Οι Ben-Ghedalia et al. (1980) αναφέρουν 50% μείωση λιγνίνης και ημικυτταρίνης σε προκατεργασμένα με όζον στελέχη βαμβακιού, ενώ μείωση 42.38% και 22.61% αντίστοιχα, αναφέρουν οι Kaur et al., (2012).

Χρήση H_2O_2 σε συγκεντρώσεις 5 έως 20% (β/β) για θερμοκρασίες προκατεργασίας 90°C και 121°C/15 psi, και χρόνους 30, 60 και 90 min, οδήγησαν σε απομάκρυνση λιγνίνης από 6.22% (5%, β/β H_2O_2 , 90°C, 90 min) έως 32.01% (20%, β/β H_2O_2 , 60 min, 121°C/15 psi), απομάκρυνση ημικυτταρίνης από 8.18% (5%, β/β H_2O_2 , 90°C, 60 min) έως 30.56% (20%, β/β H_2O_2 , 30 min, 121°C/15 psi) και κυτταρίνης από 14.91% (5%, β/β H_2O_2 , 90°C, 60 min) έως 29.10% (20%, β/β H_2O_2 , 30 min, 121°C/15 psi) (Silverstein et al., 2007).

Οι Haykir et al., (2013) ανέφεραν 46% απομάκρυνση λιγνίνης με χρήση του ιοντικού ρευστού 1-allyl-3-methyl imidazolium chloride (AMIMCl) ενώ με χρήση του ιοντικού ρευστού 1-ethyl-3-methylimidazolium acetate (EMIMAc) απομάκρυνε μόνο το 7% της λιγνίνης (Haykir and Bakir, 2013).

Η βιολογική προκατεργασία, στελεχών βαμβακιού με χρήση του μύκητα *Phanerochaete chrysosporium* διάρκειας 14 ημερών, οδήγησε σε 19.38 και 35.53%

μείωση της λιγνίνης για SmC (βυθισμένη καλλιέργεια) και SSC (ζύμωση στερεάς κατάστασης) αντίστοιχα (Shi et al., 2009).

Οι συγκεντρώσεις των παρεμποδιστών που ανιχνεύτηκαν κατά την υδροθερμική προκατεργασία παρουσία οξέος παρουσιάζονται στο Πίνακα Π12 και είναι υψηλότερες αυτών που ανιχνεύτηκαν μετά την υδροθερμική προκατεργασία βαγάσσης σόργου στους 210°C για 10 min με 2% (g/100g υλικού) θειικό οξύ (0.56 g/L, 0.13 g/L, 0.032 g/L και 0.096 g/L για το οξικό οξύ, μυρμηγκικό οξύ, HMF και φουρφουράλη αντίστοιχα) (Dogaris et al., 2012).

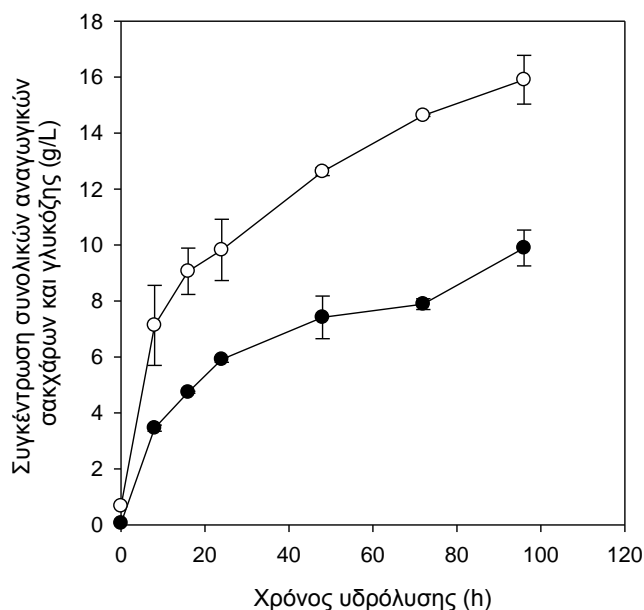
Υψηλότερα επίπεδα φουρφουράλης 3.5 g/L, περιγράφουν οι Linde *et al.* (2008) από την προκατεργασία με ατμό του άχυρου σίτου στους 210°C για 10 min με 4% (g/100g υλικού) θειικό οξύ, ενώ τα επίπεδα HMF ήταν αντίστοιχα με της παρούσας εργασίας. Οι Ewanick *et al.* (2007) αναφέρουν τον σχηματισμό 2.23 g/L 5-υδροξυμεθυλφουρφουράλης και 1.04 g/L φουρφουράλης κατά την κατεργασία ξύλου πεύκου (lodgepole pine) με ατμό στους 200°C για 5 min με 4% SO₂ (g/100g υλικού).

2. Ενζυμική υδρόλυση προκατεργασμένων στελεχών βαμβακιού

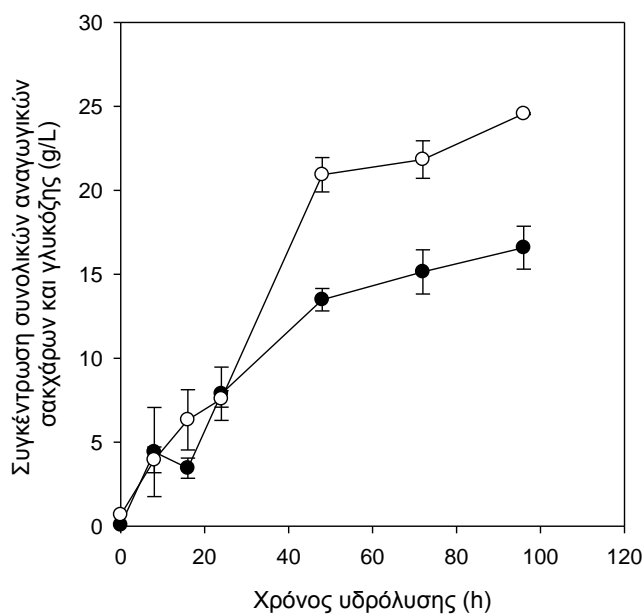
2.1 Ενζυμική υδρόλυση αλκαλικά στελεχών βαμβακιού: επίδραση του ενζυμικού φορτίου

Πραγματοποιήθηκε υδρόλυση του στερεού υπολείμματος αλκαλικής προκατεργασίας στελεχών βαμβακιού με χρήση του εμπορικού σκευάσματος Cellic[®] CTec2 της εταιρείας Novozymes. Το εμπορικό σκεύασμα Cellic[®] CTec2 της εταιρείας Novozymes περιέχει εκτός των κλασικών κυτταρινολυτικών ενζύμων και τις AA9 πρωτεΐνες (ή Lytic Polysaccharide Monooxygenases, LPMO's) οι οποίες διεγείρουν την υδρόλυση των λιγνινοκυτταρινούχων υλικών (Viikari et al., 2012).

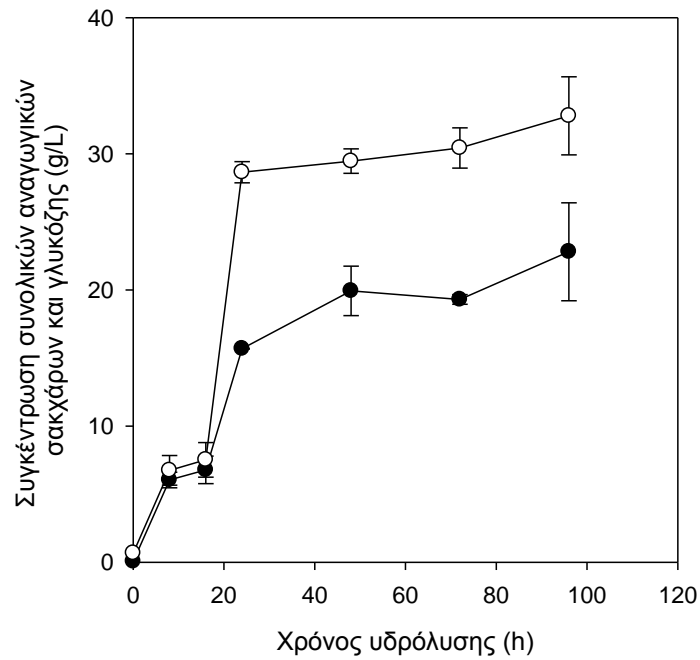
Μελετήθηκαν ενζυμικά φορτία: 1, 3, 5, 7, 9, 20, 40 και 80 FPU/gr κυτταρίνης. Τα αποτελέσματα παρουσιάζονται στα Διαγράμματα Δ3-Δ10 και στον Πίνακα Π13.



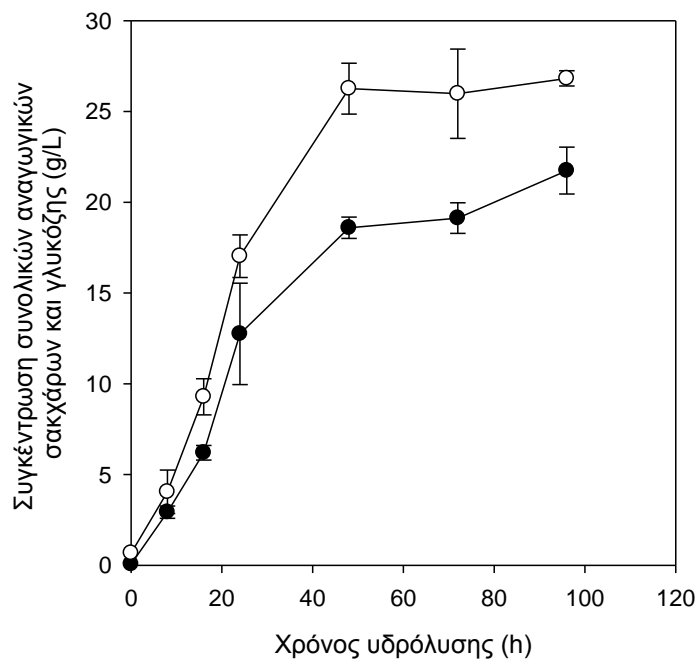
Διάγραμμα Δ3. Χρονική μεταβολή παραγόμενης γλυκόζης (●) και ολικών αναγωγικών ομάδων (○) κατά την υδρόλυση του στερεού υπολείμματος αλκαλικής προκατεργασίας στελεχών βαμβακιού. *Συνθήκες υδρόλυσης:* $C_{\text{υποστρώματος}}$: 15% β/ο, ενζυμικό σκεύασμα: Cellic[®] CTec2, ενζυμικό φορτίο: 1 FPU/g κυτταρίνης, T : 50°C, pH=5.0



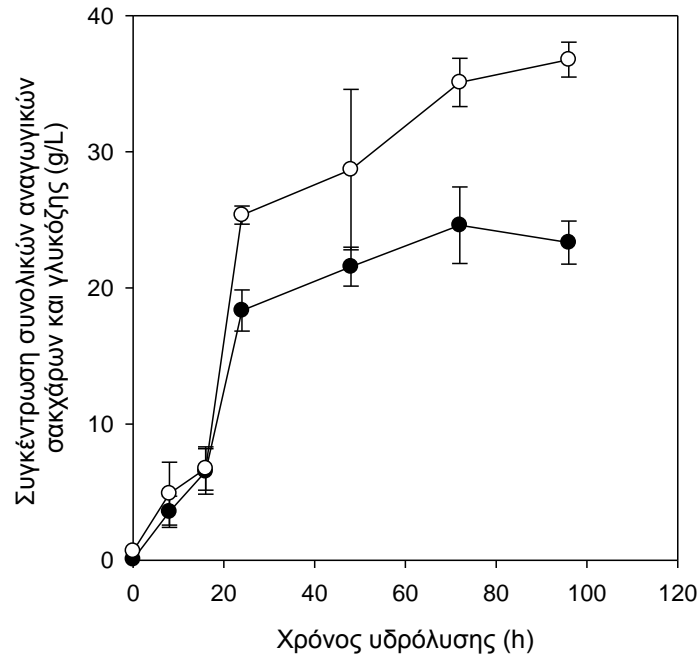
Διάγραμμα Δ4. Χρονική μεταβολή παραγόμενης γλυκόζης (●) και ολικών αναγωγικών ομάδων (○) κατά την υδρόλυση του στερεού υπολείμματος αλκαλικής προκατεργασίας στελεχών βαμβακιού. *Συνθήκες υδρόλυσης:* $C_{\text{υποστρώματος}}$: 15% β/ο, ενζυμικό σκεύασμα: Cellic[®] CTec2, ενζυμικό φορτίο: 3 FPU/g κυτταρίνης, T : 50°C, pH=5.0



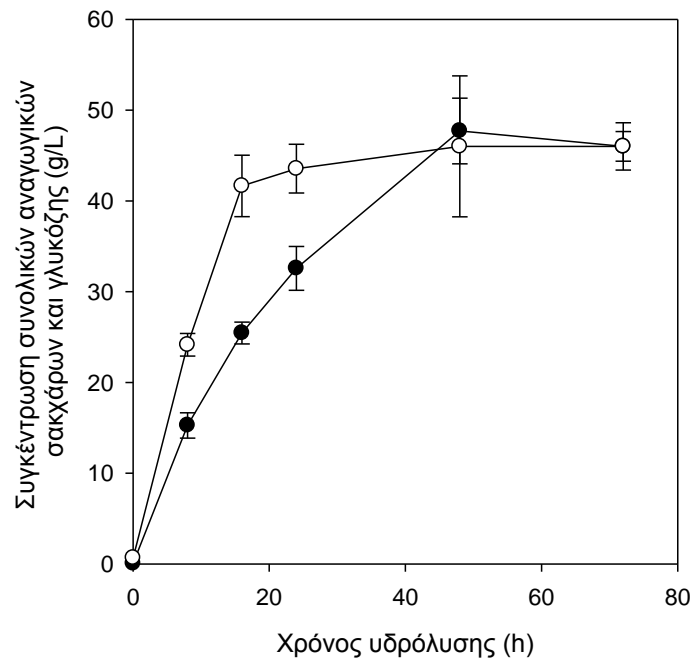
Διάγραμμα Δ5. Χρονική μεταβολή παραγόμενης γλυκόζης (●) και ολικών αναγωγικών ομάδων (○) κατά την υδρόλυση του στερεού υπολείμματος αλκαλικής προκατεργασίας στελεχών βαμβακιού. Συνθήκες υδρόλυσης: $C_{\text{υποστρώματος}}$: 15% β/ο, ενζυμικό σκεύασμα: Cellic[®] CTec2, ενζυμικό φορτίο: 5 FPU/g κυτταρίνης, T : 50°C, pH=5.0



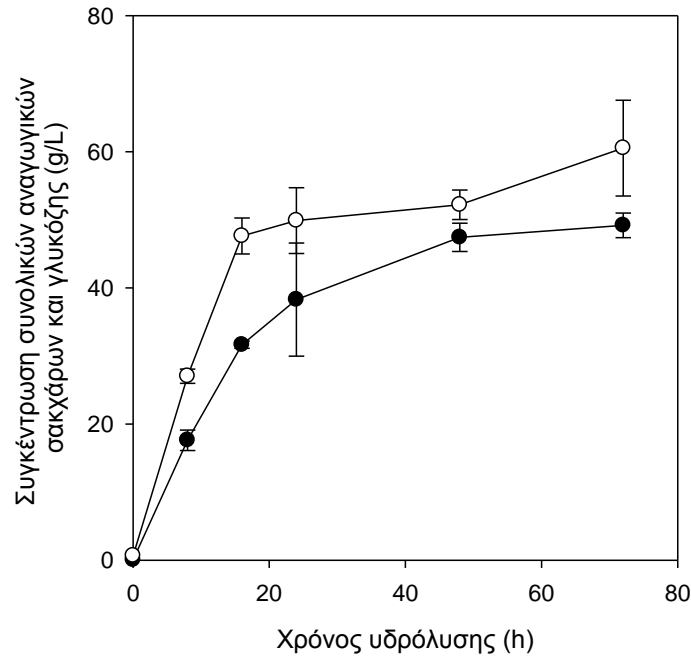
Διάγραμμα Δ6. Χρονική μεταβολή παραγόμενης γλυκόζης (●) και ολικών αναγωγικών ομάδων (○) κατά την υδρόλυση του στερεού υπολείμματος αλκαλικής προκατεργασίας στελεχών βαμβακιού. Συνθήκες υδρόλυσης: $C_{\text{υποστρώματος}}$: 15% β/ο, ενζυμικό σκεύασμα: Cellic[®] CTec2, ενζυμικό φορτίο: 7 FPU/g κυτταρίνης, T : 50°C, pH=5.0



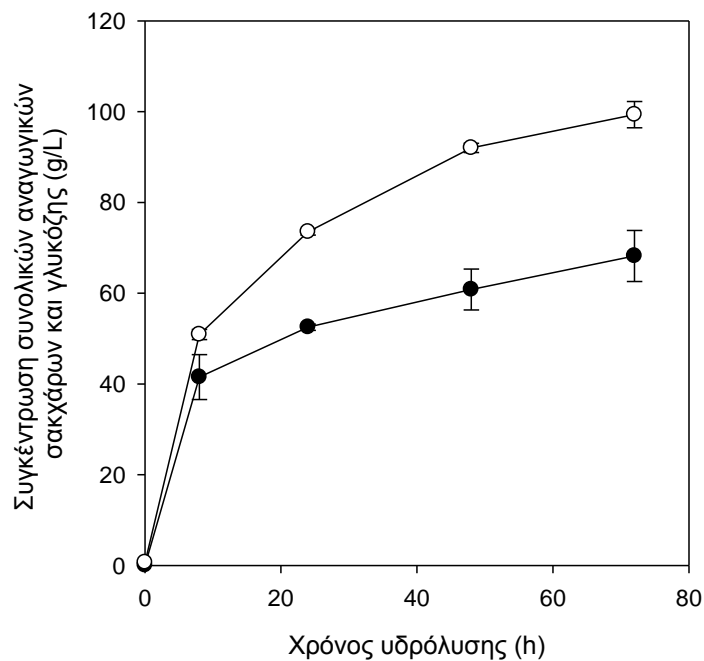
Διάγραμμα Δ7. Χρονική μεταβολή παραγόμενης γλυκόζης (●) και ολικών αναγωγικών ομάδων (O) κατά την υδρόλυση του στερεού υπολείμματος αλκαλικής προκατεργασίας στελεχών βαμβακιού. Συνθήκες υδρόλυσης: $C_{\text{υποστρώματος}}$: 15% β/ο, ενζυμικό σκεύασμα: Cellic[®] CTec2, ενζυμικό φορτίο: 9 FPU/g κυτταρίνης, T: 50°C, pH=5.0



Διάγραμμα Δ8. Χρονική μεταβολή παραγόμενης γλυκόζης (●) και ολικών αναγωγικών ομάδων (O) κατά την υδρόλυση του στερεού υπολείμματος αλκαλικής προκατεργασίας στελεχών βαμβακιού. Συνθήκες υδρόλυσης: $C_{\text{υποστρώματος}}$: 15% β/ο, ενζυμικό σκεύασμα: Cellic[®] CTec2, ενζυμικό φορτίο: 20 FPU/g κυτταρίνης, T: 50°C, pH=5.0



Διάγραμμα Δ9. Χρονική μεταβολή παραγόμενης γλυκόζης (●) και ολικών αναγωγικών ομάδων (○) κατά την υδρόλυση του στερεού υπολείμματος αλκαλικής προκατεργασίας στελεχών βαμβακιού. Συνθήκες υδρόλυσης: $C_{\text{υποστρώματος}}$: 15% β/ο, ενζυμικό σκεύασμα: Cellic[®] CTec2, ενζυμικό φορτίο: 40 FPU/g κυτταρίνης, T : 50°C, pH=5.0



Διάγραμμα Δ10. Χρονική μεταβολή παραγόμενης γλυκόζης (●) και ολικών αναγωγικών ομάδων (○) κατά την υδρόλυση του στερεού υπολείμματος αλκαλικής προκατεργασίας στελεχών βαμβακιού. Συνθήκες υδρόλυσης: $C_{\text{υποστρώματος}}$: 15% β/ο, ενζυμικό σκεύασμα: Cellic[®] CTec2, ενζυμικό φορτίο: 80 FPU/g κυτταρίνης, T : 50°C, pH=5.0

Πίνακας Π13. Μέγιστες τιμές συνολικών αναγωγικών ομάδων και γλυκόζης κατά την υδρόλυση του στερεού υπολείμματος αλκαλικής προκατεργασίας στελεχών βαμβακιού.

Ενζυμικό φορτίο (FPU/g κυτταρίνης)	Συνολικές αναγωγικές ομάδες (g/L)	Γλυκόζη (g/L)
1	15.91±0.87	9.89±0.64
3	24.56±0.05	16.58±1.28
5	32.79±2.87	22.81±3.59
7	26.82±0.42	21.74±1.29
9	36.77±1.29	24.61±1.58
20	46.01±1.63	47.71±3.62
40	60.54±0.66	49.18±1.80
80	99.34±2.90	68.19±5.62

Η αύξηση του ενζυμικού φορτίου οδηγεί σε αύξηση της παραγόμενης γλυκόζης καθώς και των συνολικών αναγωγικών σακχάρων. Η εξάρτηση της παραγόμενης γλυκόζης καθώς και των συνολικών αναγωγικών σακχάρων από το ενζυμικό φορτίο περιγράφεται από την εξίσωση (1)

$$y = \frac{a \cdot x}{b + x} \quad \text{Εξ. (1)}$$

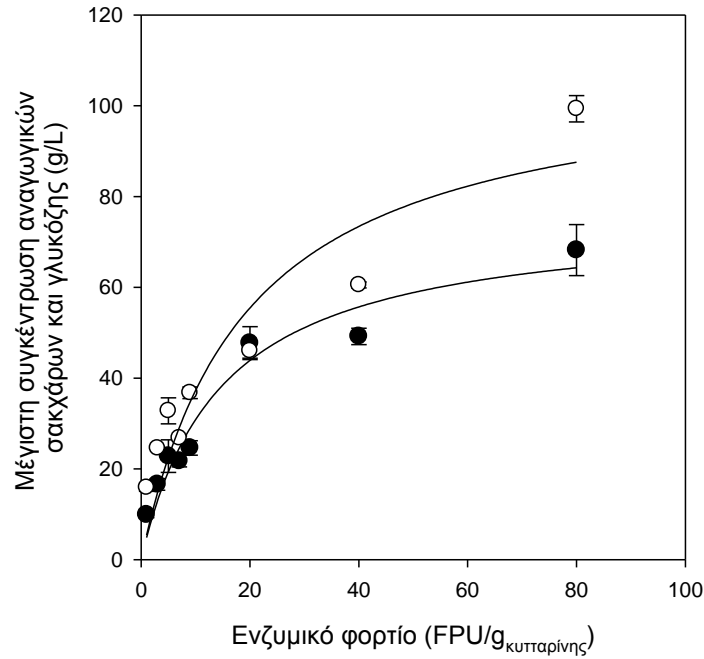
όπου,

y: η συγκέντρωση της παραγόμενης γλυκόζης καθώς και των συνολικών αναγωγικών σακχάρων (g/L)

x: το ενζυμικό φορτίο (FPU/g κυτταρίνης)

a, b: συντελεστές της εξίσωσης (η φυσική σημασία των συντελεστών είναι α: η μέγιστη τιμή της εξαρτημένης μεταβλητής και β: η τιμή της ανεξάρτητης μεταβλητής για την οποία επιτυγχάνεται το 50% της μέγιστης τιμής της εξαρτημένης μεταβλητής)

Η προσαρμογή της εν λόγω εξίσωσης στα πειραματικά παρουσιάζεται στο Διάγραμμα Δ11 και οι συντελεστές της εξίσωσης στον Πίνακα Π14.



Διάγραμμα Δ11. Εξάρτηση της παραγόμενης γλυκόζης (●) καθώς και των συνολικών αναγωγικών σακχάρων (○) από το ενζυμικό φορτίο κατά την υδρόλυση του στερεού υπολείμματος αλκαλικής προκατεργασίας στελεχών βαμβακιού.

Πίνακας Π14. Συντελεστές της εξίσωσης που περιγράφει την εξάρτηση της παραγόμενης γλυκόζης και των συνολικών αναγωγικών σακχάρων από το ενζυμικό φορτίο

	a	b
Παραγόμενη γλυκόζη	76.01 ± 7.09 ($R^2=0.97, P<0.001$)	14.67 ± 3.60
Παραγόμενα Αναγωγικά Σάκχαρα	108.51 ± 18.50 ($R^2=0.92, P=0.001$)	19.13 ± 8.06

Τα πειραματικά αποτελέσματα προσαρμόζονται ικανοποιητικά στην εξίσωση (1) όπως προκύπτει τόσο από τον συντελεστή συσχέτισης (R^2) όσο και από την τιμή του p ($p<0.05$).

Η εν λόγω προσαρμογή για τα αποτελέσματα παραγόμενης γλυκόζης προβλέπει ότι η μέγιστη επιτευχθείσα τιμή αυτής υπό τις συνθήκες που πραγματοποιήθηκαν τα πειράματα είναι 76.01 g/L και για ενζυμικό φορτίο $14.67 \text{ FPU/g}_{\text{κντταρίνης}}$ επιτυγχάνεται απελευθέρωση γλυκόζης ίση με το ήμισυ της μέγιστης τιμής (Πίνακας Π14).

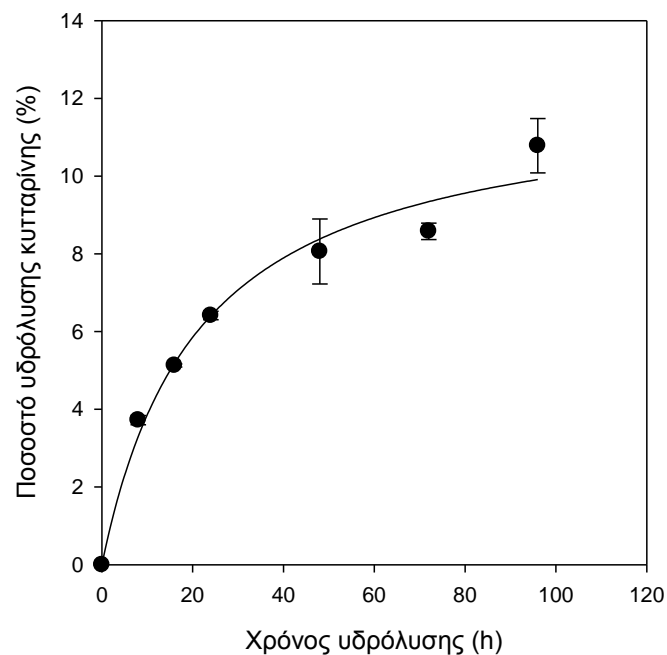
Τα πειραματικά αποτελέσματα από την υδρόλυση του στερεού υπολείμματος αλκαλικής προκατεργασίας στελεχών βαμβακιού προσαρμόστηκαν στο παρακάτω μαθηματικό μοντέλο (Εξ. 2) (Holtzaple et al., 1984):

$$x = x_{\max} \cdot \left(\frac{t}{t_{1/2} + t} \right)$$

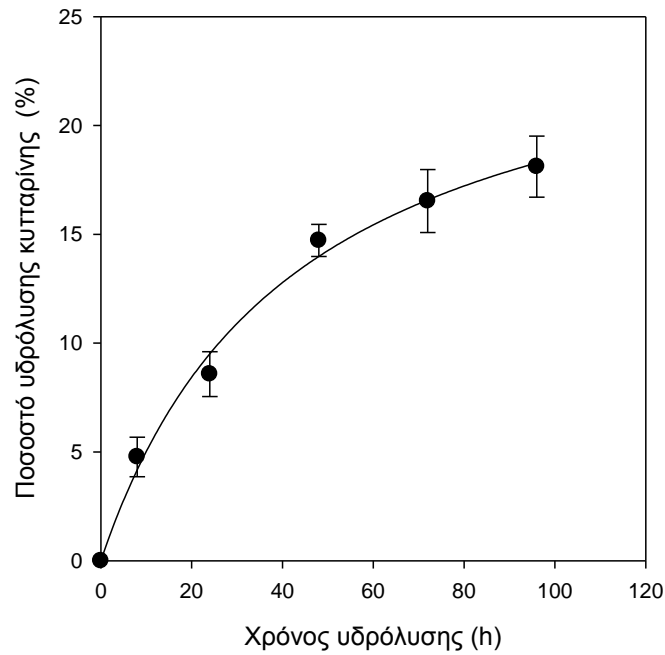
Εξ. 2

Όπου, x το ποσοστό της μετατροπής των πολυσακχαριτών (κυτταρίνη ή συνολικοί πολυσακχαρίτες) σε απλά σάκχαρα (σακχαροποίηση), x_{\max} ο μέγιστος βαθμός σακχαροποίησης, t ο χρόνος της ενζυμικής σακχαροποίησης και $t_{1/2}$ ο χρόνος για να επιτευχθεί 50% του x_{\max} .

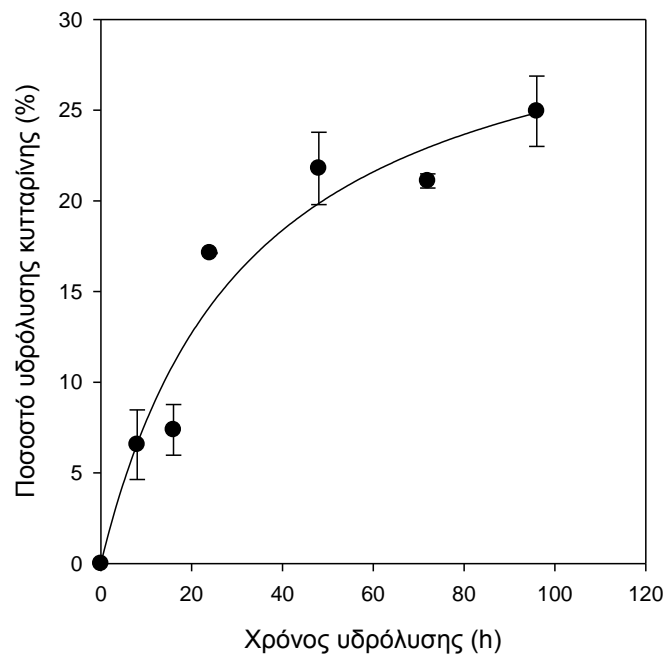
Οι προσαρμογές παρουσιάζονται στα Διαγράμματα Δ12-Δ19 και οι προβλεπόμενες από το μοντέλο τιμές x_{\max} και $t_{1/2}$ στον Πίνακα Π15.



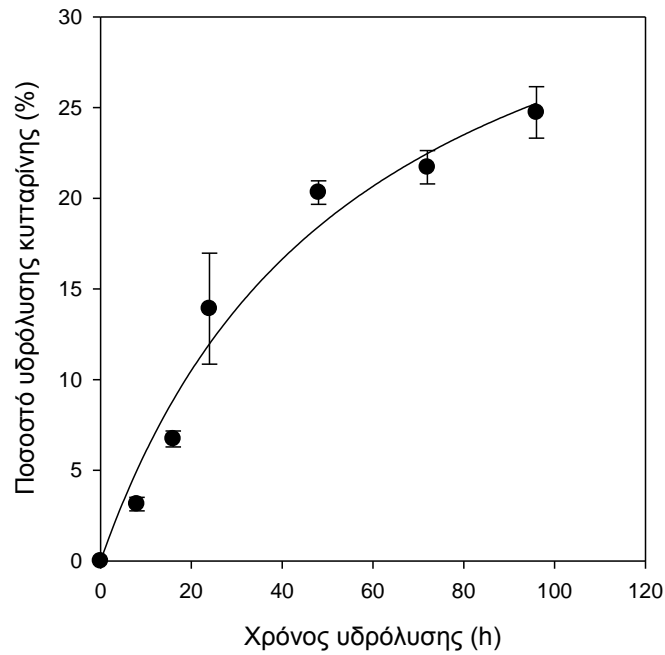
Διάγραμμα Δ12. Προσαρμογή εξίσωσης Holtzapple για την υδρόλυση της κυτταρίνης του στερεού υπολείμματος αλκαλικής προκατεργασίας στελεχών βαμβακιού. Συνθήκες υδρόλυσης: $C_{\text{υποστρώματος}}$: 15% β/ο, ενζυμικό σκεύασμα: Cellic[®] CTec2, ενζυμικό φορτίο: 1 FPU/g κυτταρίνης, T : 50°C, pH=5.0



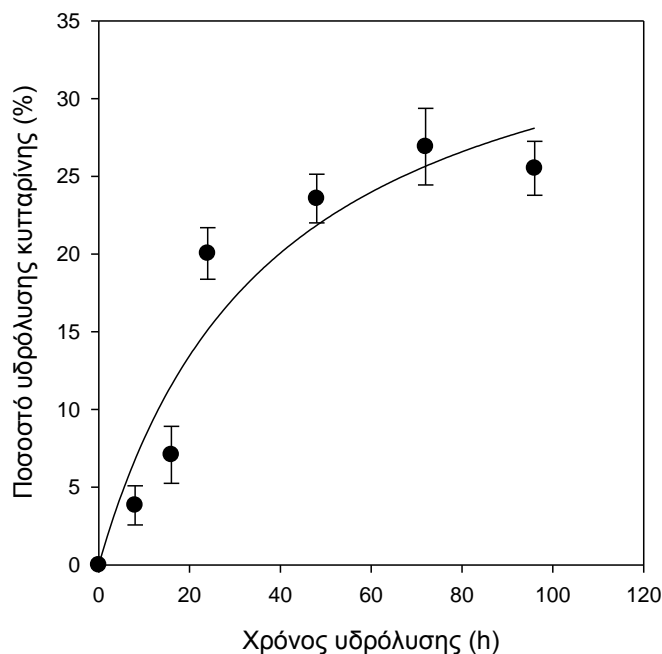
Διάγραμμα Δ13. Προσαρμογή εξίσωσης Holtzapfle για την υδρόλυση της κυτταρίνης του στερεού υπολείμματος αλκαλικής προκατεργασίας στελεχών βαμβακιού. Συνθήκες υδρόλυσης: $C_{\text{υποστρώματος}}$: 15% β/ο, ενζυμικό σκεύασμα: Cellic[®] CTec2, ενζυμικό φορτίο: 3 FPU/g κυτταρίνης, T: 50°C, pH=5.0



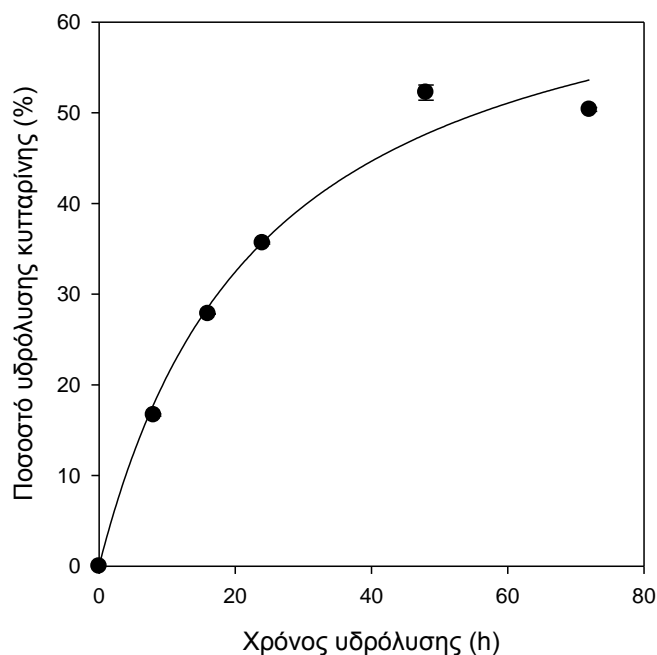
Διάγραμμα Δ14. Προσαρμογή εξίσωσης Holtzapfle για την υδρόλυση της κυτταρίνης του στερεού υπολείμματος αλκαλικής προκατεργασίας στελεχών βαμβακιού. Συνθήκες υδρόλυσης: $C_{\text{υποστρώματος}}$: 15% β/ο, ενζυμικό σκεύασμα: Cellic[®] CTec2, ενζυμικό φορτίο: 5 FPU/g κυτταρίνης, T: 50°C, pH=5.0



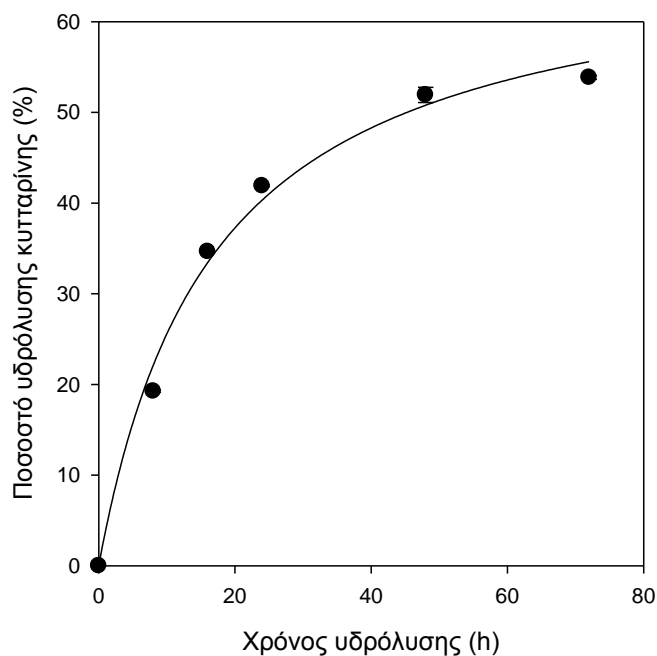
Διάγραμμα Δ15. Προσαρμογή εξίσωσης Holtzapfle για την υδρόλυση της κυτταρίνης του στερεού υπολείμματος αλκαλικής προκατεργασίας στελεχών βαμβακιού. Συνθήκες υδρόλυσης: $C_{\text{υποστρώματος}}$: 15% β/ο, ενζυμικό σκεύασμα: Cellic[®] CTec2, ενζυμικό φορτίο: 7 FPU/g κυτταρίνης, T: 50°C, pH=5.0



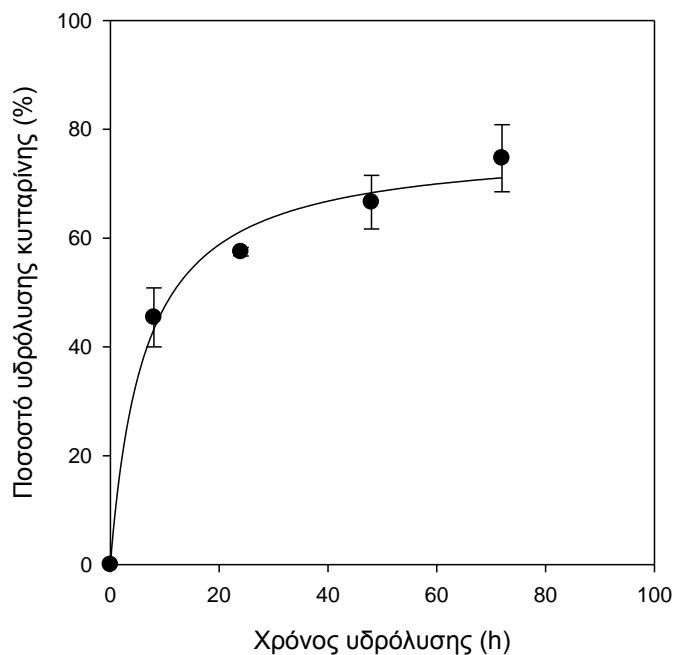
Διάγραμμα Δ16. Προσαρμογή εξίσωσης Holtzapfle για την υδρόλυση της κυτταρίνης του στερεού υπολείμματος αλκαλικής προκατεργασίας στελεχών βαμβακιού. Συνθήκες υδρόλυσης: $C_{\text{υποστρώματος}}$: 15% β/ο, ενζυμικό σκεύασμα: Cellic[®] CTec2, ενζυμικό φορτίο: 9 FPU/g κυτταρίνης, T: 50°C, pH=5.0



Διάγραμμα Δ17. Προσαρμογή εξίσωσης Holtzapple για την υδρόλυση της κυτταρίνης του στερεού υπολείμματος αλκαλικής προκατεργασίας στελεχών βαμβακιού. Συνθήκες υδρόλυσης: $C_{\text{υποστρώματος}}$: 15% β/ο, ενζυμικό σκεύασμα: Cellic[®] CTec2, ενζυμικό φορτίο: 20 FPU/g κυτταρίνης, T: 50°C, pH=5.0



Διάγραμμα Δ18. Προσαρμογή εξίσωσης Holtzapple για την υδρόλυση της κυτταρίνης του στερεού υπολείμματος αλκαλικής προκατεργασίας στελεχών βαμβακιού. Συνθήκες υδρόλυσης: $C_{\text{υποστρώματος}}$: 15% β/ο, ενζυμικό σκεύασμα: Cellic[®] CTec2, ενζυμικό φορτίο: 40 FPU/g κυτταρίνης, T: 50°C, pH=5.0

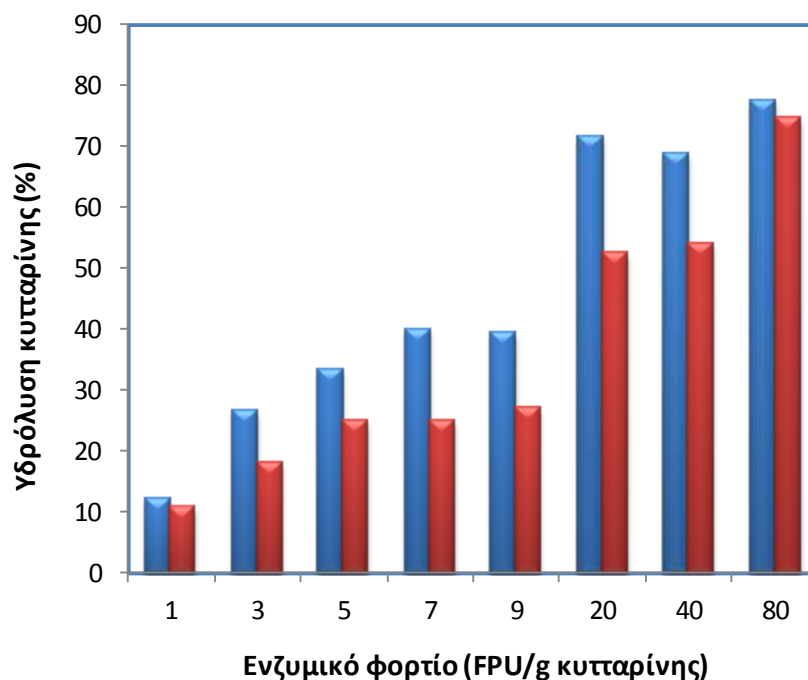


Διάγραμμα Δ19. Προσαρμογή εξίσωσης Holtzapple για την υδρόλυση της κυτταρίνης του στερεού υπολείμματος αλκαλικής προκατεργασίας στελεχών βαμβακιού. Συνθήκες υδρόλυσης: $C_{\text{υποστρώματος}}$: 15% β/ο, ενζυμικό σκεύασμα: Cellic[®] CTec2, ενζυμικό φορτίο: 80 FPU/g κυτταρίνης, T : 50°C, pH=5.0

Πίνακας Π15. Τιμές x_{max} και $t_{1/2}$ για την υδρόλυση της κυτταρίνης του στερεού υπολείμματος αλκαλικής προκατεργασίας στελεχών βαμβακιού.

Ενζυμικό φορτίο (FPU/g κυτταρίνης)	x_{max} (%)	$t_{1/2}$ (h)
1	12.12 ± 0.88 ($R^2=0.98, P<0.001$)	21.43 ± 4.63
3	26.39 ± 2.10 ($R^2=0.99, P<0.0001$)	42.59 ± 6.04
5	33.21 ± 5.15 ($R^2=0.95, P=0.0002$)	32.28 ± 15.59
7	40.01 ± 6.72 ($R^2=0.97, P<0.0001$)	56.20 ± 19.16
9	39.37 ± 9.01 ($R^2=0.92, P=0.0007$)	38.49 ± 2.66
20	71.57 ± 6.72 ($R^2=0.98, P=0.0001$)	24.11 ± 5.61
40	68.57 ± 3.61 ($R^2=0.98, P<0.001$)	16.81 ± 2.54
80	77.29 ± 3.77 ($R^2=0.99, P=0.0004$)	6.29 ± 1.52

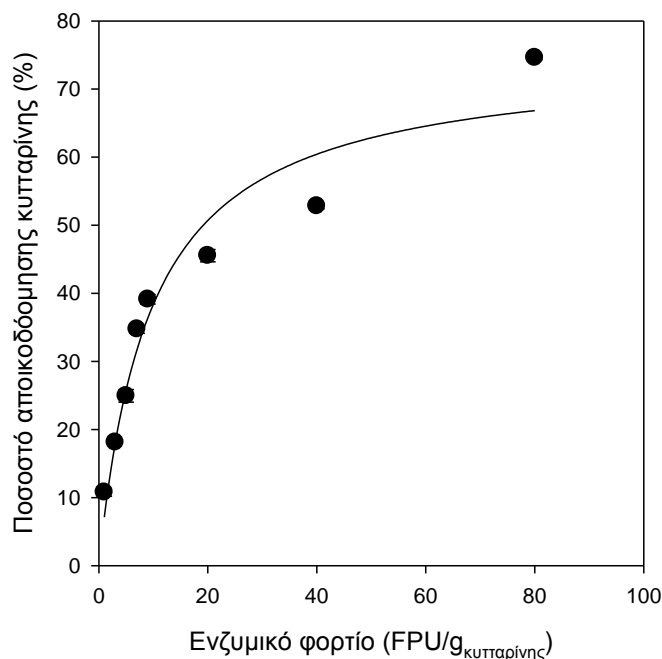
Στο Διαγράμμα Δ20 εμφανίζεται η σύγκριση των προβλεπόμενων από το υπερβολικό μοντέλο τιμών μέγιστης μετατροπής κυτταρίνης με τις αντίστοιχες πειραματικές τιμές.



Διάγραμμα Δ20. Σύγκριση προβλεπόμενων τιμών (■) από το μοντέλο του Holtzapfle μέγιστης υδρόλυσης κυτταρίνης με τις αντίστοιχες πειραματικές τιμές (■), κατά την υδρόλυση του στερεού υπολείμματος αλκαλικής προκατεργασίας στελεχών βαμβακιού.

Από το Διάγραμμα Δ20 παρατηρείται ότι το μοντέλο του Holtzapfle υπερεκτιμά στην πλειοψηφία των περιπτώσεων τις μέγιστες τιμές υδρόλυσης κυτταρίνης.

Η αύξηση του ενζυμικού φορτίου οδηγεί σε αύξηση του ποσοστού υδρόλυσης της κυτταρίνης. Η εξάρτηση του ποσοστού υδρόλυσης κυτταρίνης από το ενζυμικό φορτίο περιγράφεται από την εξίσωση (1). Η προσαρμογή της εν λόγω εξίσωσης στα πειραματικά παρουσιάζεται στο Διάγραμμα Δ21 και οι συντελεστές της εξίσωσης στον Πίνακα Π16.



Διάγραμμα Δ21. Εξάρτηση του ποσοστού υδρόλυσης κυτταρίνης από το ενζυμικό φορτίο κατά την υδρόλυση του στερεού υπολείμματος αλκαλικής προκατεργασίας στελεχών βαμβακιού.

Πίνακας Π16. Συντελεστές της εξίσωσης που περιγράφει την εξάρτηση του ποσοστού υδρόλυσης κυτταρίνης από το ενζυμικό φορτίο

	a	b
Ποσοστό αποικοδόμησης κυτταρίνης	74.77 ± 6.09	9.49 ± 0.26
	$(R^2=0.96, P<0.001)$	

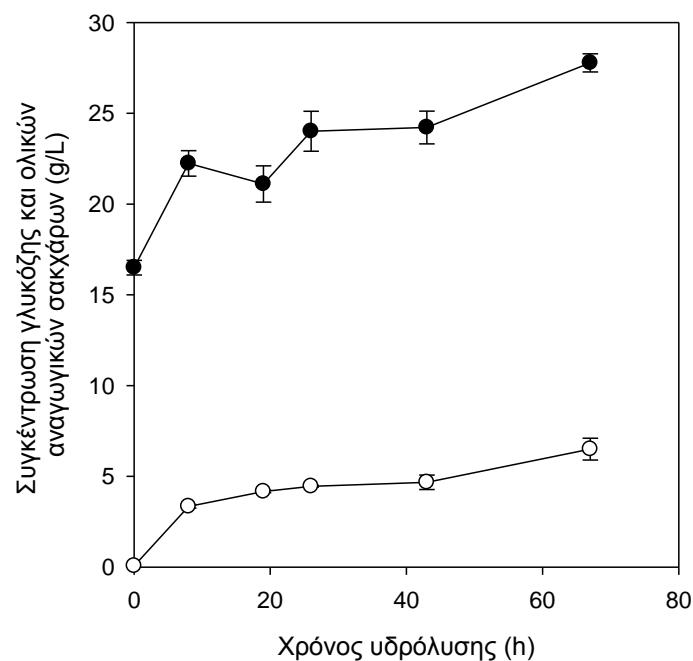
Τα πειραματικά αποτελέσματα προσαρμόζονται ικανοποιητικά στην εξίσωση (1) όπως προκύπτει τόσο από τον συντελεστή συσχέτισης (R^2) όσο και από την τιμή του p ($p<0.05$).

Η εν λόγω προσαρμογή για τα αποτελέσματα της αποικοδόμησης της κυτταρίνης προβλέπει ότι η μέγιστη επιτευχθείσα τιμή αποικοδόμησης κυτταρίνης υπό τις συνθήκες που πραγματοποιήθηκαν τα πειράματα είναι 74.77% και για ενζυμικό φορτίο 9.49 FPU/gκυτταρίνης επιτυγχάνεται αποικοδόμηση κυτταρίνης ίση με το ήμισυ της μέγιστης τιμής (Πίνακας Π16).

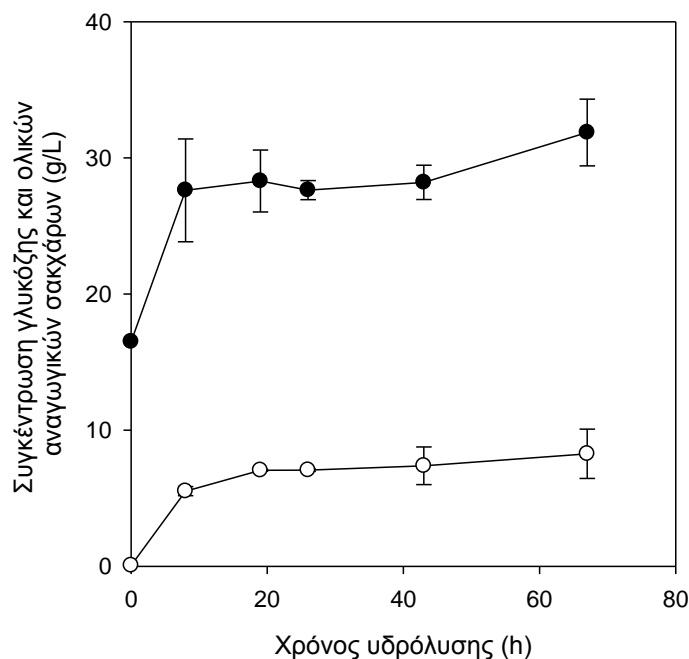
Πρακτικά ενζυμικά φορτία > 50 FPU/g κυτταρίνης δεν επιδρούν στην αποικοδόμηση της κυτταρίνης υπό τις συνθήκες που διεξήχθησαν τα πειράματα.

2.2 Ενζυμική υδρόλυση υγρού κλάσματος και στερεού υπολείμματος υδροθερμικής προκατεργασίας παρουσία οξέος στελεχών βαμβακιού: επίδραση του ενζυμικού φορτίου

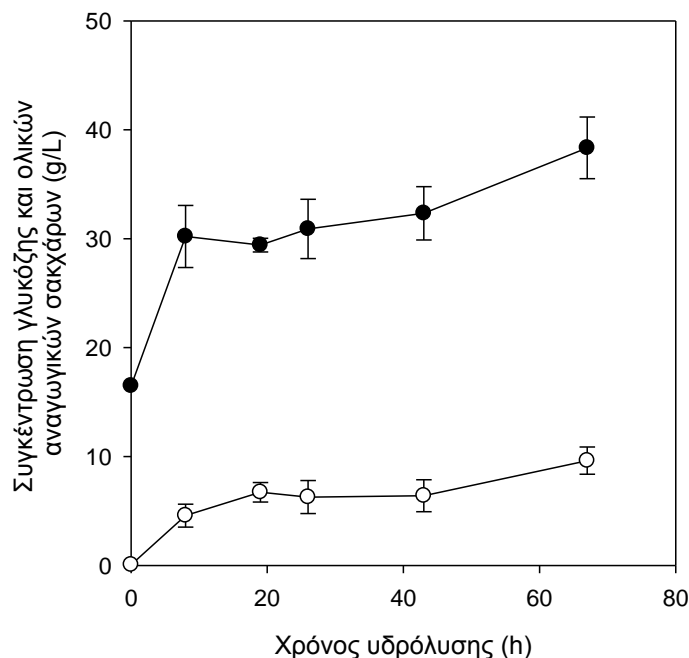
Πραγματοποιήθηκε υδρόλυση του υγρού κλάσματος και στερεού υπολείμματος υδροθερμικής προκατεργασίας στελεχών βαμβακιού με χρήση του εμπορικού σκευάσματος Cellic[®] CTec2 της εταιρείας Novozymes. Μελετήθηκαν ενζυμικά φορτία: 5, 7, 9, 20 και 40 FPU/gr κυτταρίνης. Τα αποτελέσματα παρουσιάζονται στα Διαγράμματα Δ22-Δ26 και στον Πίνακα Π17.



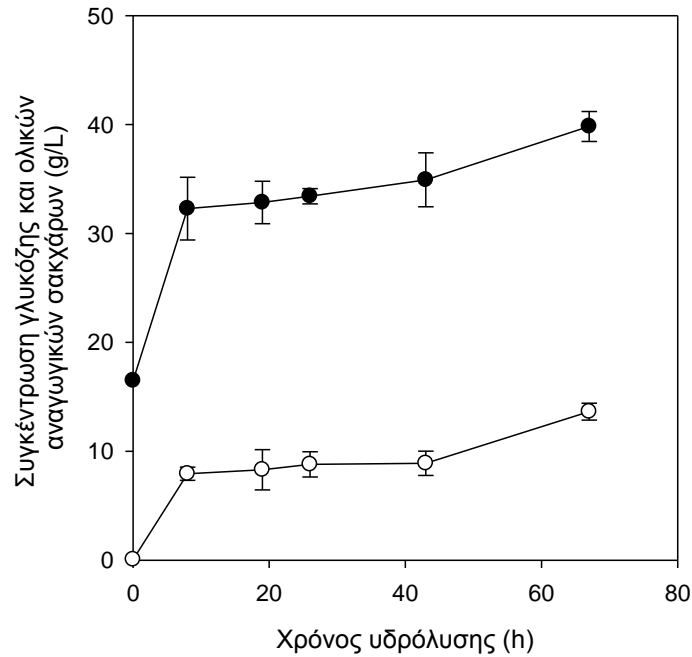
Διάγραμμα Δ22. Χρονική μεταβολή παραγόμενης γλυκόζης (○) και ολικών αναγωγικών ομάδων (●) κατά την υδρόλυση του υγρού κλάσματος και στερεού υπολείμματος υδροθερμικής προκατεργασίας στελεχών βαμβακιού. *Συνθήκες υδρόλυσης:* $C_{\text{υποστρώματος}}$: 15% β/ο, ενζυμικό σκεύασμα: Cellic[®] CTec2, ενζυμικό φορτίο: 5 FPU/g κυτταρίνης, T : 50°C, pH =5.0



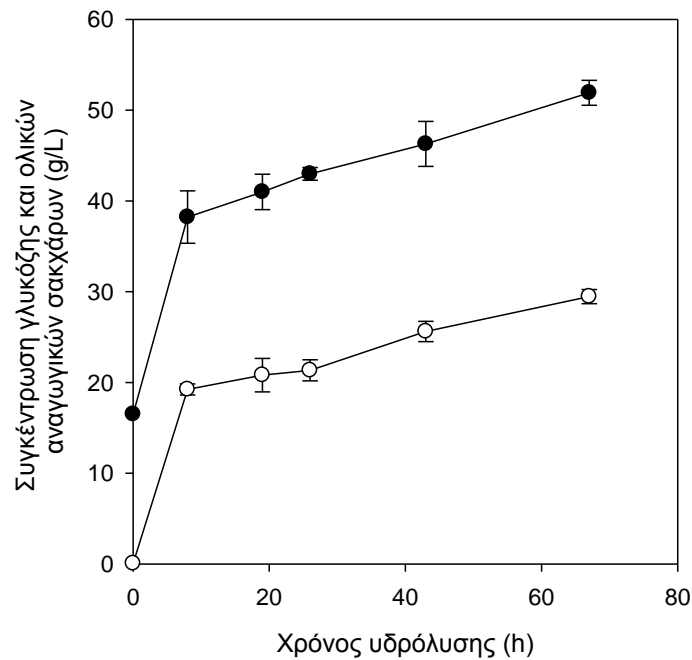
Διάγραμμα Δ23. Χρονική μεταβολή παραγόμενης γλυκόζης (○) και ολικών αναγωγικών ομάδων (●) κατά την υδρόλυση του υγρού κλάσματος και στερεού υπολείμματος υδροθερμικής προκατεργασίας στελεχών βαμβακιού. Συνθήκες υδρόλυσης: $C_{\text{υποστρώματος}}$: 15% β/ο, ενζυμικό σκεύασμα: Cellic[®] CTec2, ενζυμικό φορτίο: 7 FPU/g κυτταρίνης, T: 50°C, pH=5.0



Διάγραμμα Δ24. Χρονική μεταβολή παραγόμενης γλυκόζης (○) και ολικών αναγωγικών ομάδων (●) κατά την υδρόλυση του υγρού κλάσματος και στερεού υπολείμματος υδροθερμικής προκατεργασίας στελεχών βαμβακιού. Συνθήκες υδρόλυσης: $C_{\text{υποστρώματος}}$: 15% β/ο, ενζυμικό σκεύασμα: Cellic[®] CTec2, ενζυμικό φορτίο: 9 FPU/g κυτταρίνης, T: 50°C, pH=5.0



Διάγραμμα Δ25. Χρονική μεταβολή παραγόμενης γλυκόζης (○) και ολικών αναγωγικών ομάδων (●) κατά την υδρόλυση του υγρού κλάσματος και στερεού υπολείμματος υδροθερμικής προκατεργασίας στελεχών βαμβακιού. Συνθήκες υδρόλυσης: $C_{\text{υποστρώματος}}$: 15% β/ο, ενζυμικό σκεύασμα: Cellic[®] CTec2, ενζυμικό φορτίο: 20 FPU/g κυτταρίνης, T: 50°C, pH=5.0



Διάγραμμα Δ26. Χρονική μεταβολή παραγόμενης γλυκόζης (○) και ολικών αναγωγικών ομάδων (●) κατά την υδρόλυση του υγρού κλάσματος και στερεού υπολείμματος υδροθερμικής προκατεργασίας στελεχών βαμβακιού. Συνθήκες υδρόλυσης: $C_{\text{υποστρώματος}}$: 15% β/ο, ενζυμικό σκεύασμα: Cellic[®] CTec2, ενζυμικό φορτίο: 40 FPU/g κυτταρίνης, T: 50°C, pH=5.0

Πίνακας Π17. Μέγιστες τιμές συνολικών αναγωγικών ομάδων και γλυκόζης κατά την υδρόλυση του υγρού κλάσματος και στερεού υπολείμματος υδροθερμικής προκατεργασίας στελεχών βαμβακιού.

Ενζυμικό φορτίο (FPU/g κυτταρίνης)	Συνολικές αναγωγικές ομάδες (g/L)*	Γλυκόζη (g/L)**
5	11.28±0.50	6.44±0.60
7	15.37±1.45	8.20±1.81
9	21.85±2.83	9.56±1.25
20	23.33±1.37	13.58±0.78
40	35.42±1.41	29.39±0.80

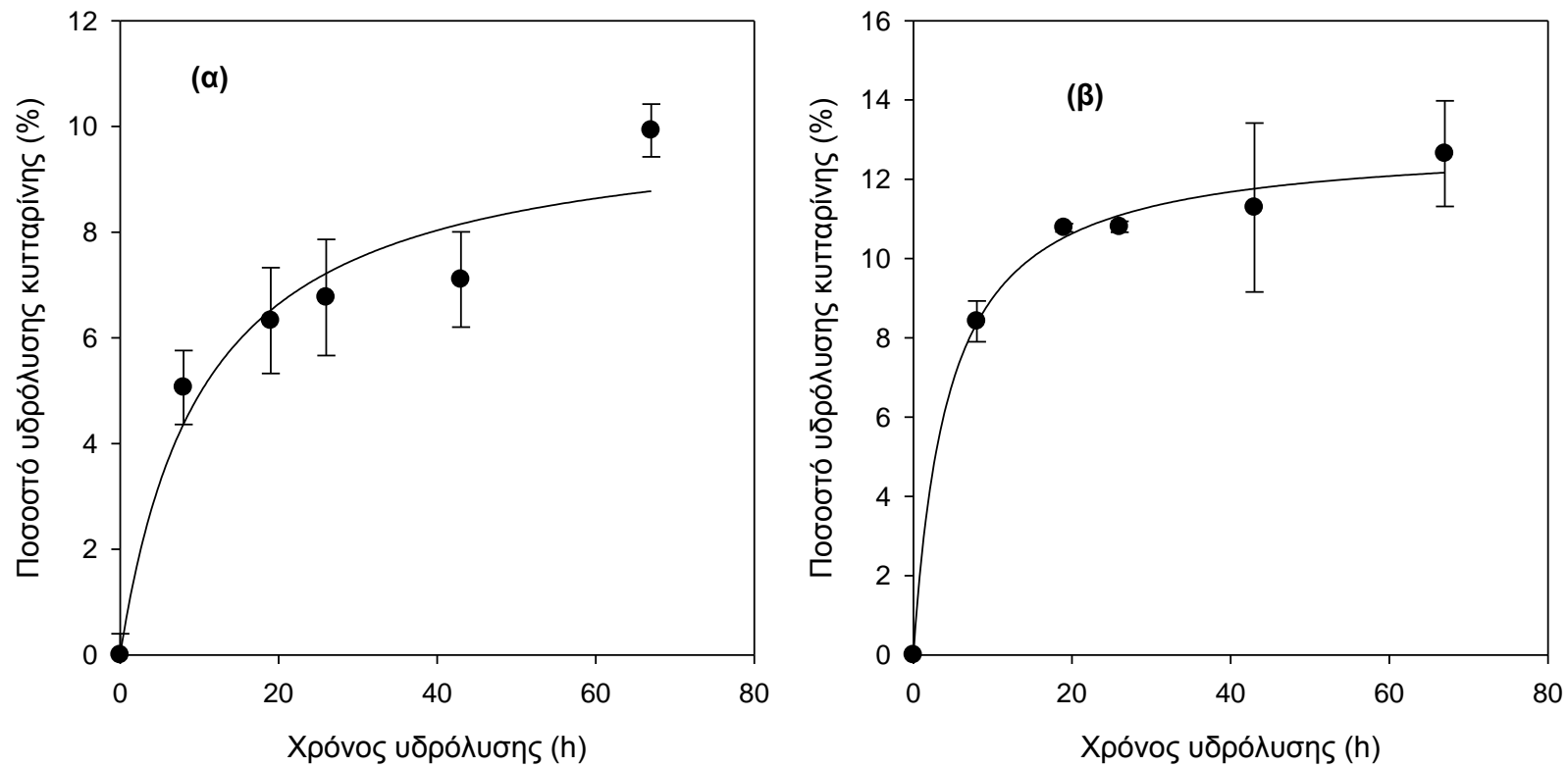
* κατά την έναρξη της υδρόλυσης μετρήθηκαν 16.50 g/L συνολικά αναγωγικά σάκχαρα η ποσότητα αυτή έχει αφαιρεθεί από τη μέγιστη τιμή

** κατά την έναρξη της υδρόλυσης μετρήθηκαν 0.062 g/L γλυκόζης η ποσότητα αυτή έχει αφαιρεθεί από τη μέγιστη τιμή

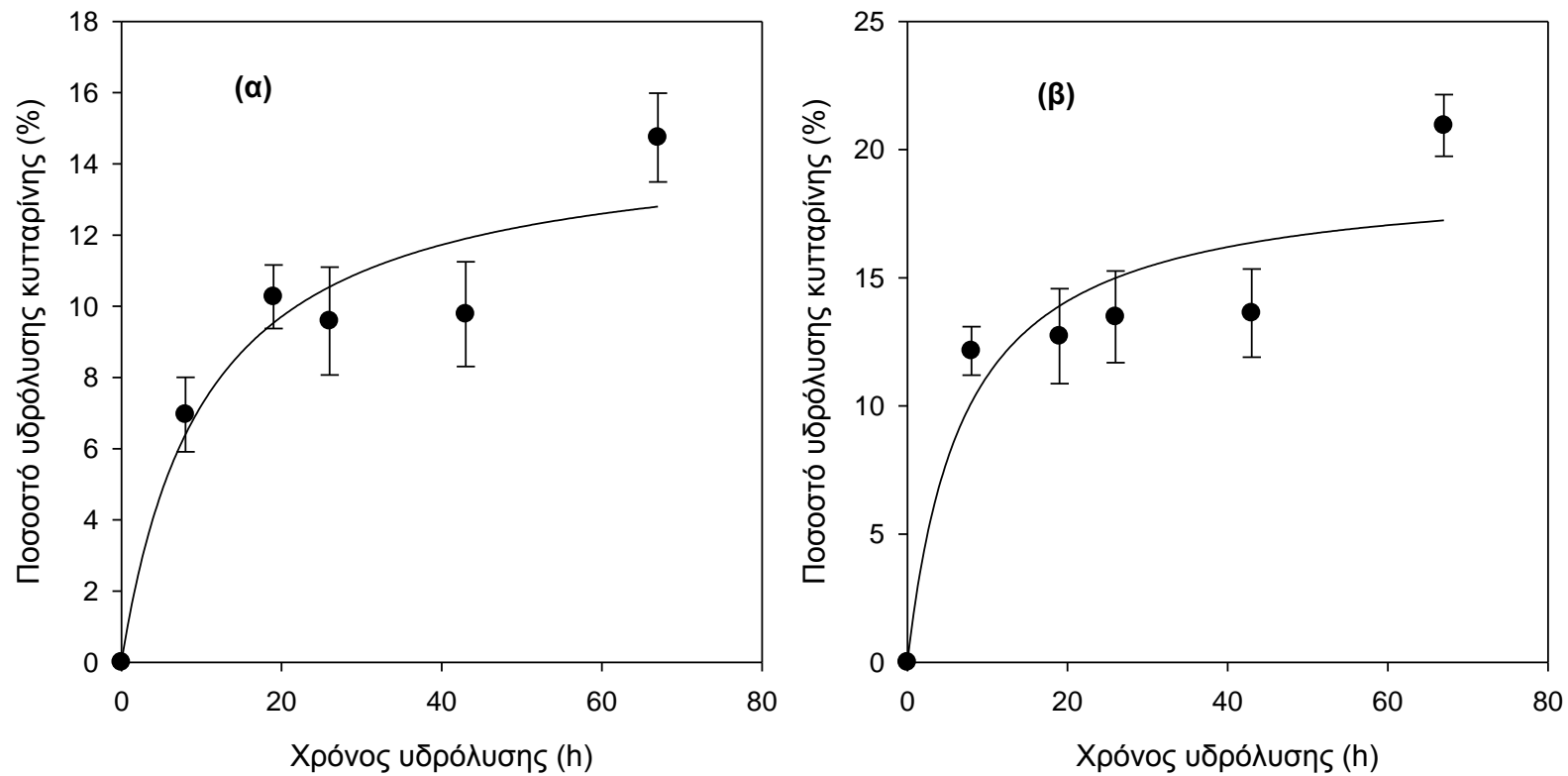
Τα πειραματικά αποτελέσματα από την υδρόλυση του στερεού υπολείμματος αλκαλικής προκατεργασίας στελεχών βαμβακιού προσαρμόστηκαν στο παρακάτω μαθηματικό μοντέλο (Εξ. 2) (Holtzaple et al., 1984). Οι προσαρμογές παρουσιάζονται στα Διαγράμματα Δ27-Δ29 και οι προβλεπόμενες από το μοντέλο τιμές x_{max} και $t_{1/2}$ στον Πίνακα Π18.

Πίνακας Π18. Τιμές x_{max} και $t_{1/2}$ για την υδρόλυση της κυτταρίνης του στερεού υπολείμματος αλκαλικής προκατεργασίας στελεχών βαμβακιού.

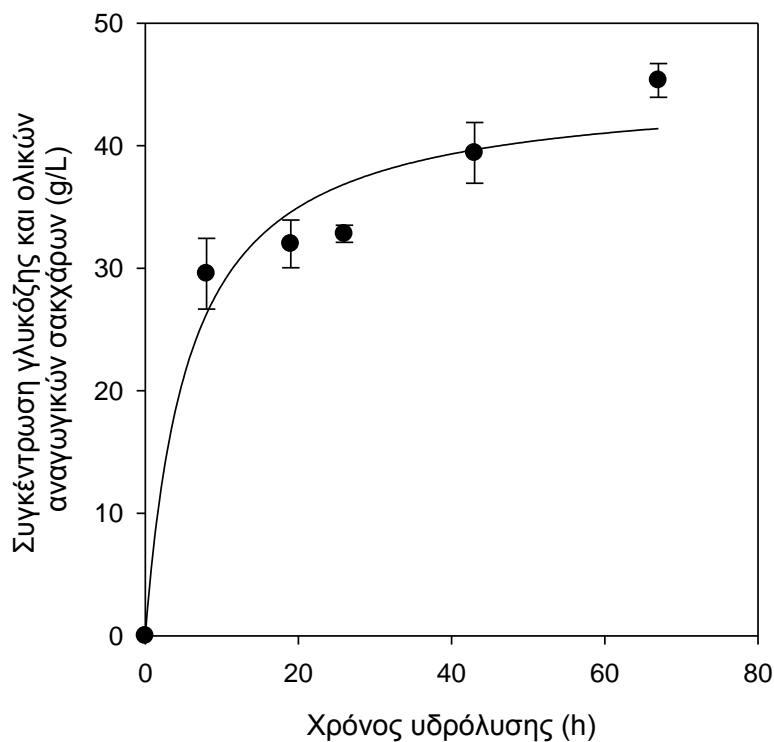
Ενζυμικό φορτίο (FPU/g κυτταρίνης)	x_{max} (%)	$t_{1/2}$ (h)
5	10.16 ± 1.31 ($R^2=0.94$, $P=0.0032$)	10.61 ± 4.89
7	12.96 ± 0.39 ($R^2=0.99$, $P<0.0001$)	4.39 ± 0.79
9	14.81 ± 2.32 ($R^2=0.92$, $P=0.0027$)	10.51 ± 5.93
20	19.05 ± 3.24 ($R^2=0.87$, $P=0.0063$)	7.04 ± 5.34
40	44.91 ± 3.89 ($R^2=0.96$, $P=0.0006$)	5.68 ± 2.48



Διάγραμμα Δ27. Προσαρμογή εξίσωσης Holtzapfle για την υδρόλυση της κυτταρίνης του υγρού κλάσματος και στερεού υπολείμματος υδροθερμικής προκατεργασίας στελεχών βαμβακιού. Συνθήκες υδρόλυσης: $C_{\text{υποστρώματος}}$: 15% β/ο, ενζυμικό σκεύασμα: Cellic[®] CTec2, ενζυμικό φορτίο: (α) 5 FPU/g κυτταρίνης, (β) 7 FPU/g κυτταρίνης, T: 50°C, pH=5.0

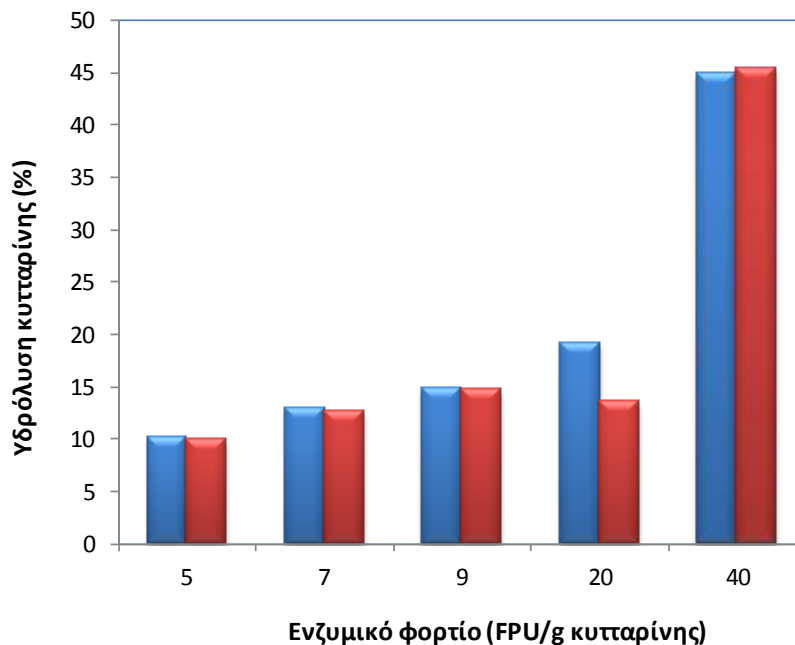


Διάγραμμα Δ28. Προσαρμογή εξίσωσης Holtzapfle για την υδρόλυση της κυτταρίνης του υγρού κλάσματος και στερεού υπολείμματος υδροθερμικής προκατεργασίας στελεχών βαμβακιού. *Συνθήκες υδρόλυσης:* $C_{\text{υποστρώματος}}$: 15% β/ο, ενζυμικό σκεύασμα: Cellic[®] CTec2, ενζυμικό φορτίο: (α) 9 FPU/g κυτταρίνης, (β) 20 FPU/g κυτταρίνης, T: 50°C, pH=5.0



Διάγραμμα Δ29. Προσαρμογή εξίσωσης Holtzapple για την υδρόλυση της κυτταρίνης του υγρού κλάσματος και στερεού υπολείμματος υδροθερμικής προκατεργασίας στελεχών βαμβακιού. Συνθήκες υδρόλυσης: $C_{\text{υποστρώματος}}$: 15% β/ο, ενζυμικό σκεύασμα: Cellic[®] CTec2, ενζυμικό φορτίο: 40 FPU/g κυτταρίνης, T : 50°C, pH=5.0

Στο Διαγράμμα Δ30 εμφανίζεται η σύγκριση των προβλεπόμενων από το υπερβολικό μοντέλο τιμών μέγιστης μετατροπής κυτταρίνης με τις αντίστοιχες πειραματικές τιμές.

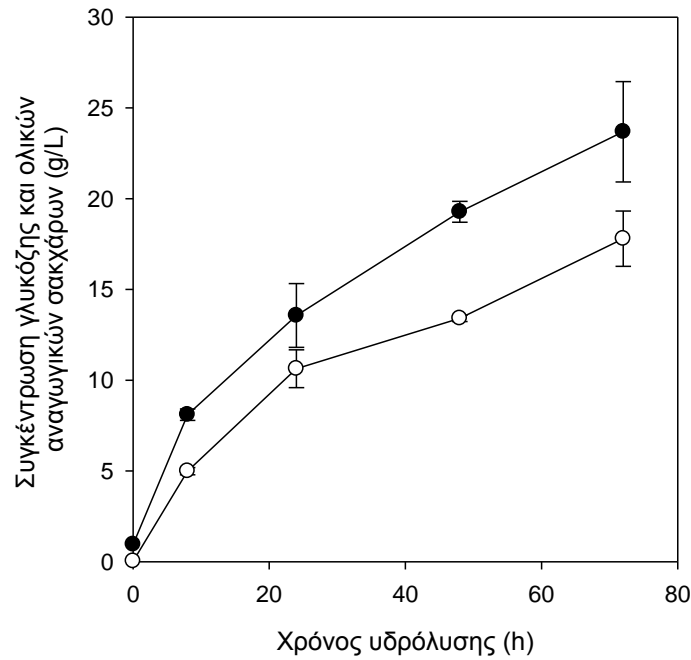


Διάγραμμα Δ30. Σύγκριση προβλεπόμενων τιμών (■) από το μοντέλο του Holtzapple μέγιστης υδρόλυσης κυτταρίνης με τις αντίστοιχες πειραματικές τιμές (■), κατά την υδρόλυση του στερεού υπολείμματος αλκαλικής προκατεργασίας στελεχών βαμβακιού.

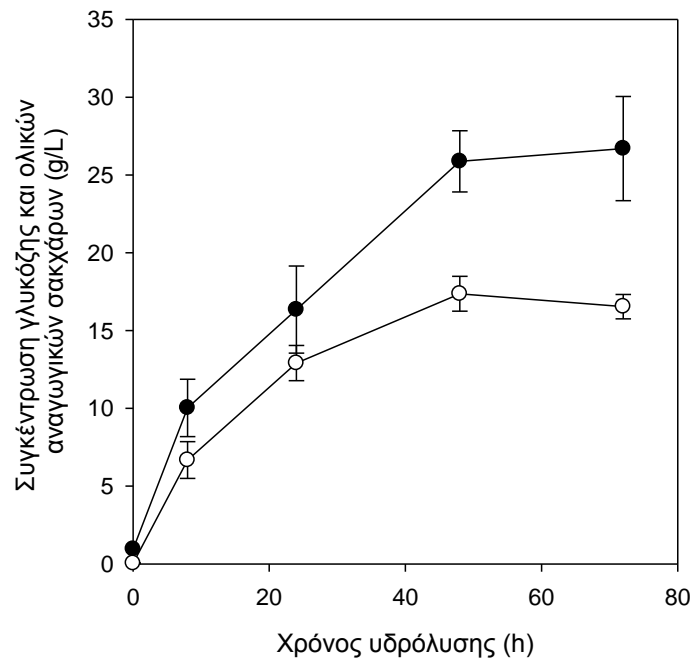
Από το Διάγραμμα Δ30 παρατηρείται ότι το μοντέλο του Holtzapple προβλέπει ικανοποιητικά τις μέγιστες τιμές υδρόλυσης κυτταρίνης.

2.3 Ενζυμική υδρόλυση στερεού υπολείμματος υδροθερμικής προκατεργασίας παρουσία οξέος στελεχών βαμβακιού: επίδραση του ενζυμικού φορτίου

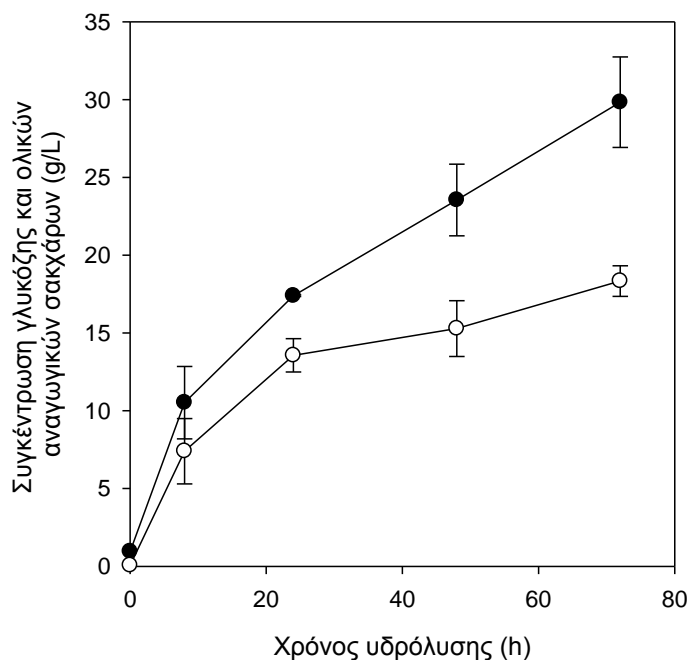
Πραγματοποιήθηκε υδρόλυση του στερεού υπολείμματος υδροθερμικής προκατεργασίας στελεχών βαμβακιού με χρήση του εμπορικού σκευάσματος Cellic[®] CTec2 της εταιρείας Novozymes. Μελετήθηκαν ενζυμικά φορτία: 5, 7, 9, 20, 40 και 80 FPU/gr κυτταρίνης. Τα αποτελέσματα παρουσιάζονται στα Διαγράμματα Δ31-Δ36 και στον Πίνακα Π19.



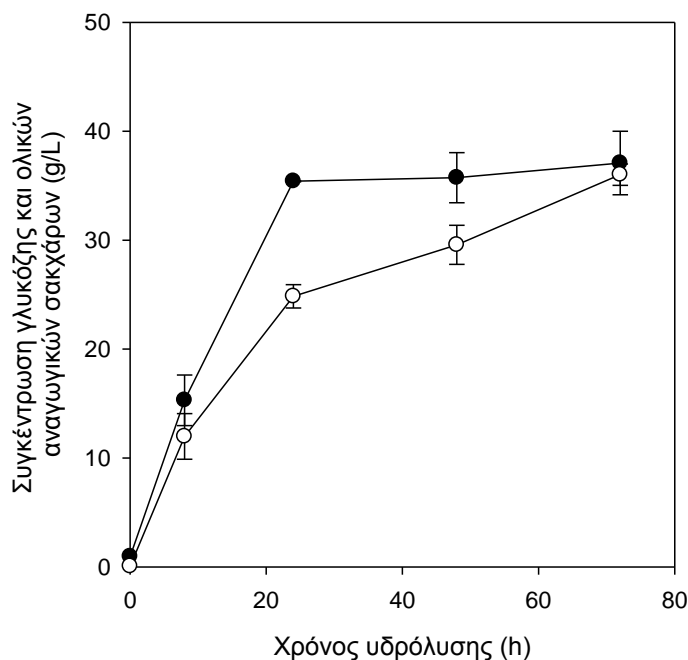
Διάγραμμα Δ31. Χρονική μεταβολή παραγόμενης γλυκόζης (○) και ολικών αναγωγικών ομάδων (●) κατά την υδρόλυση του στερεού υπολείμματος υδροθερμικής προκατεργασίας στελεχών βαμβακιού. Συνθήκες υδρόλυσης: $C_{\text{υποστρώματος}}$: 15% β/ο, ενζυμικό σκεύασμα: Cellic[®] CTec2, ενζυμικό φορτίο: 5 FPU/g κυτταρίνης, T: 50°C, pH=5.0



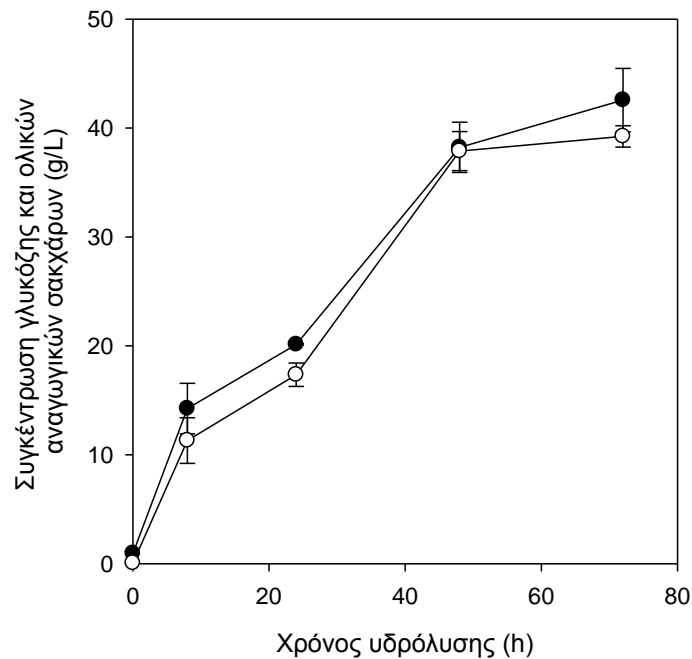
Διάγραμμα Δ32. Χρονική μεταβολή παραγόμενης γλυκόζης (○) και ολικών αναγωγικών ομάδων (●) κατά την υδρόλυση του στερεού υπολείμματος υδροθερμικής προκατεργασίας στελεχών βαμβακιού. Συνθήκες υδρόλυσης: $C_{\text{υποστρώματος}}$: 15% β/ο, ενζυμικό σκεύασμα: Cellic[®] CTec2, ενζυμικό φορτίο: 7 FPU/g κυτταρίνης, T: 50°C, pH=5.0



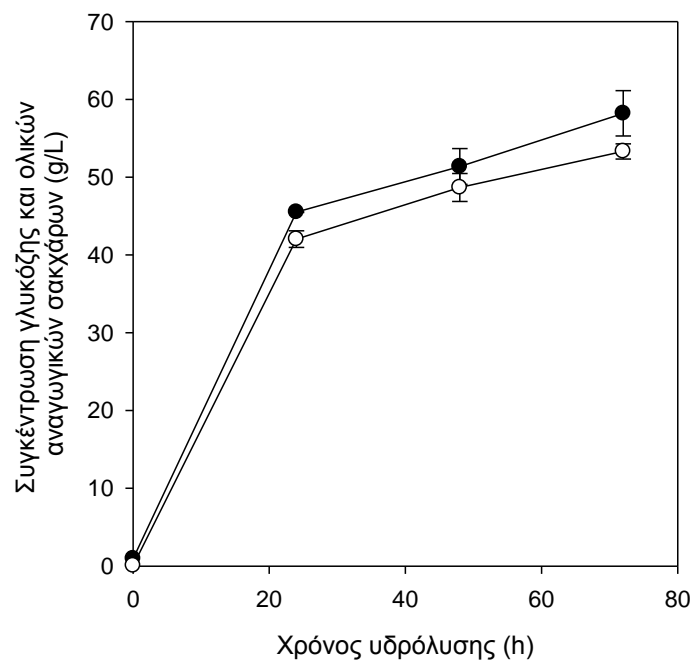
Διάγραμμα Δ33. Χρονική μεταβολή παραγόμενης γλυκόζης (○) και ολικών αναγωγικών ομάδων (●) κατά την υδρόλυση του στερεού υπολείμματος υδροθερμικής προκατεργασίας στελεχών βαμβακιού. Συνθήκες υδρόλυσης: $C_{\text{υποστρώματος}}$: 15% β/ο, ενζυμικό σκεύασμα: Cellic[®] CTec2, ενζυμικό φορτίο: 9 FPU/g κυτταρίνης, T: 50°C, pH=5.0



Διάγραμμα Δ34. Χρονική μεταβολή παραγόμενης γλυκόζης (○) και ολικών αναγωγικών ομάδων (●) κατά την υδρόλυση του στερεού υπολείμματος υδροθερμικής προκατεργασίας στελεχών βαμβακιού. Συνθήκες υδρόλυσης: $C_{\text{υποστρώματος}}$: 15% β/ο, ενζυμικό σκεύασμα: Cellic[®] CTec2, ενζυμικό φορτίο: 20 FPU/g κυτταρίνης, T: 50°C, pH=5.0



Διάγραμμα Δ35. Χρονική μεταβολή παραγόμενης γλυκόζης (○) και ολικών αναγωγικών ομάδων (●) κατά την υδρόλυση του στερεού υπολείμματος υδροθερμικής προκατεργασίας στελεχών βαμβακιού. Συνθήκες υδρόλυσης: $C_{\text{υποστρώματος}}$: 15% β/ο, ενζυμικό σκεύασμα: Cellic[®] CTec2, ενζυμικό φορτίο: 40 FPU/g κυτταρίνης, T: 50°C, pH=5.0

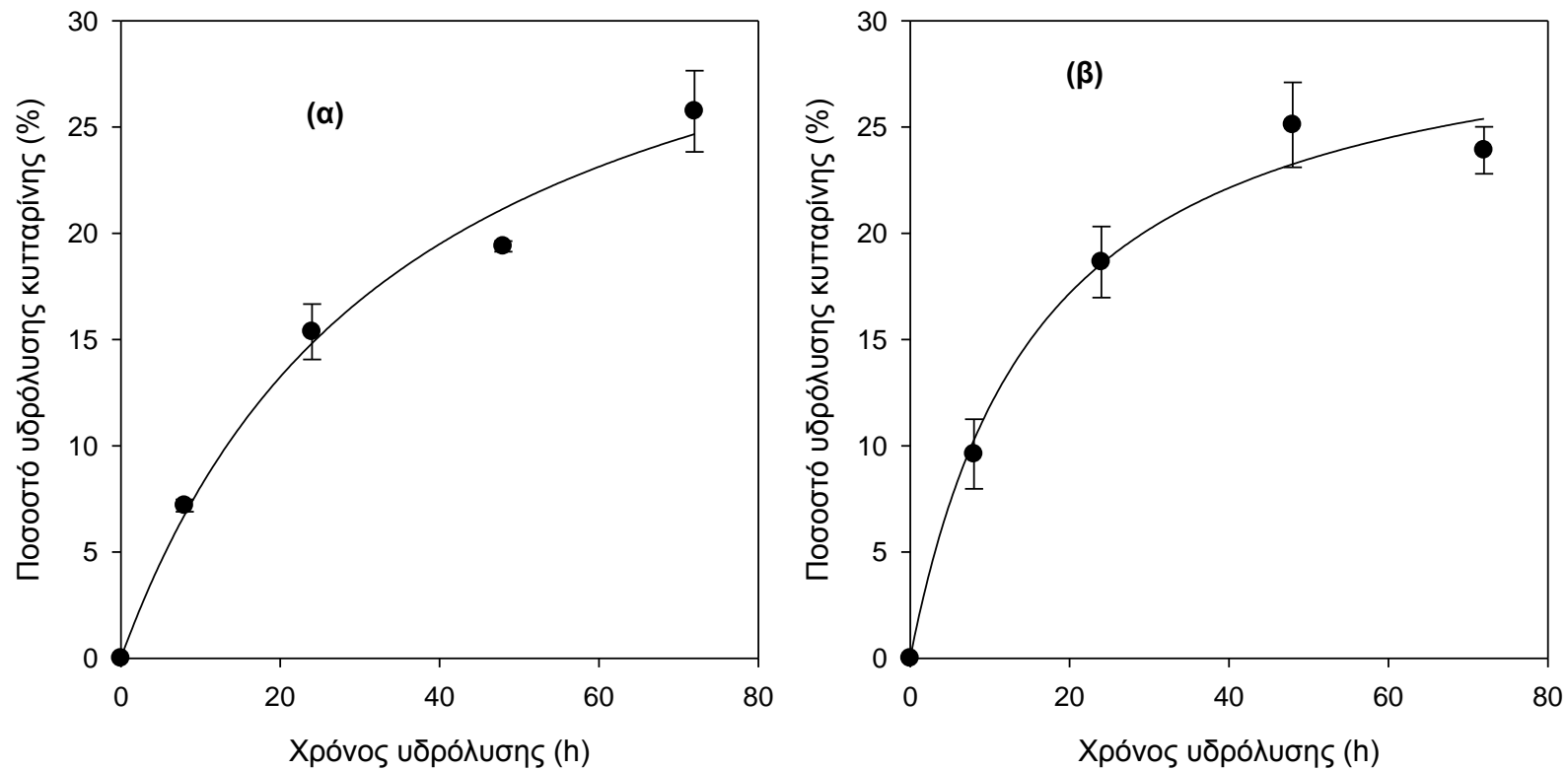


Διάγραμμα Δ36. Χρονική μεταβολή παραγόμενης γλυκόζης (○) και ολικών αναγωγικών ομάδων (●) κατά την υδρόλυση του στερεού υπολείμματος υδροθερμικής προκατεργασίας στελεχών βαμβακιού. Συνθήκες υδρόλυσης: $C_{\text{υποστρώματος}}$: 15% β/ο, ενζυμικό σκεύασμα: Cellic[®] CTec2, ενζυμικό φορτίο: 80 FPU/g κυτταρίνης, T: 50°C, pH=5.0

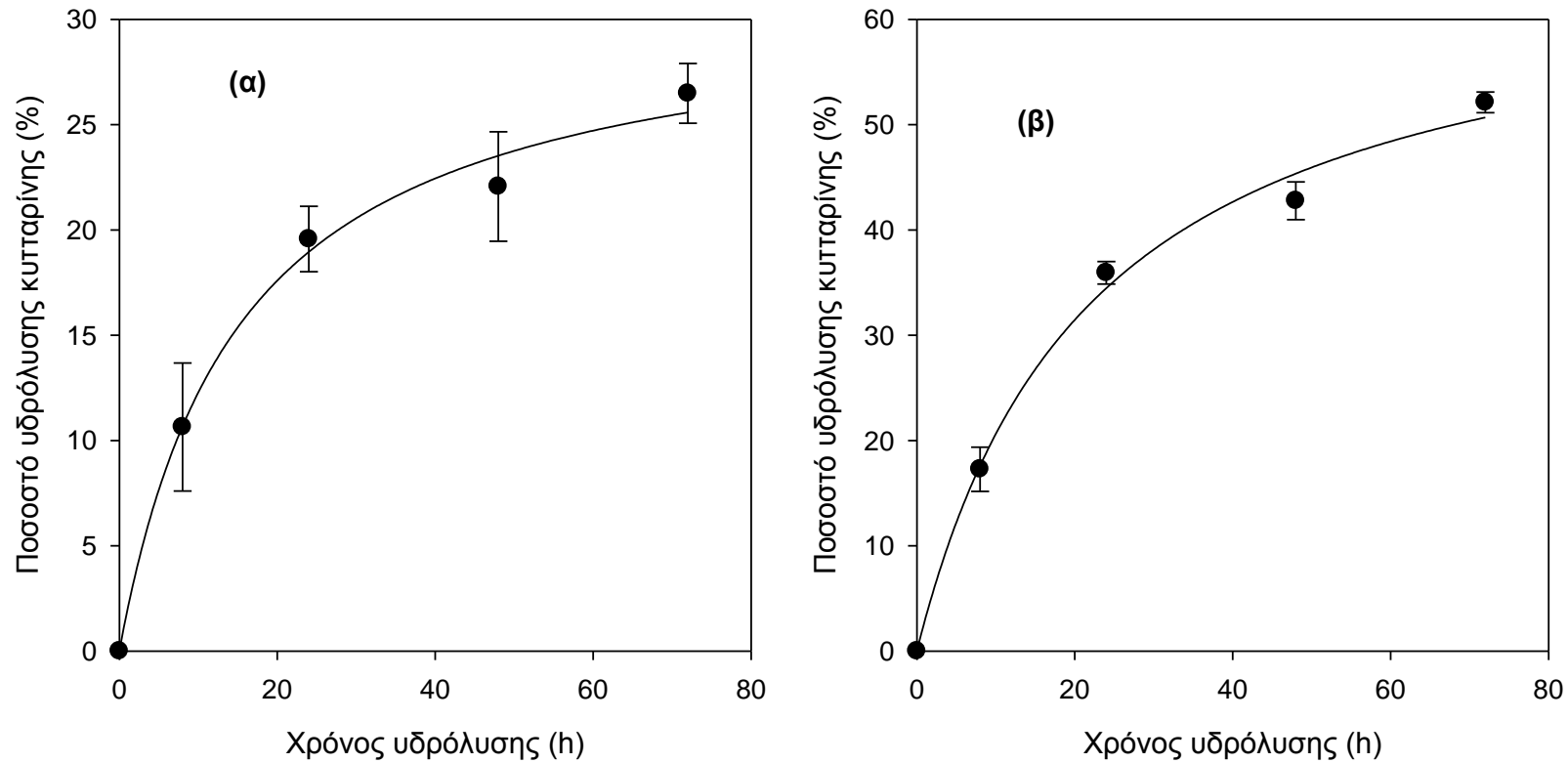
Πίνακας Π19. Μέγιστες τιμές συνολικών αναγωγικών ομάδων και γλυκόζης κατά την υδρόλυση του στερεού υπολείμματος αλκαλικής υδροθερμικής στελεχών βαμβακιού.

Ενζυμικό φορτίο (FPU/g κυτταρίνης)	Συνολικές αναγωγικές ομάδες (g/L)	Γλυκόζη (g/L)
5	23.68±2.76	17.79±1.52
7	26.69±3.35	17.36±1.11
9	29.83±2.91	18.33±0.98
20	37.08±2.76	36.02±0.78
40	42.57±1.56	39.23±1.32
80	58.19±1.94	53.31±0.89

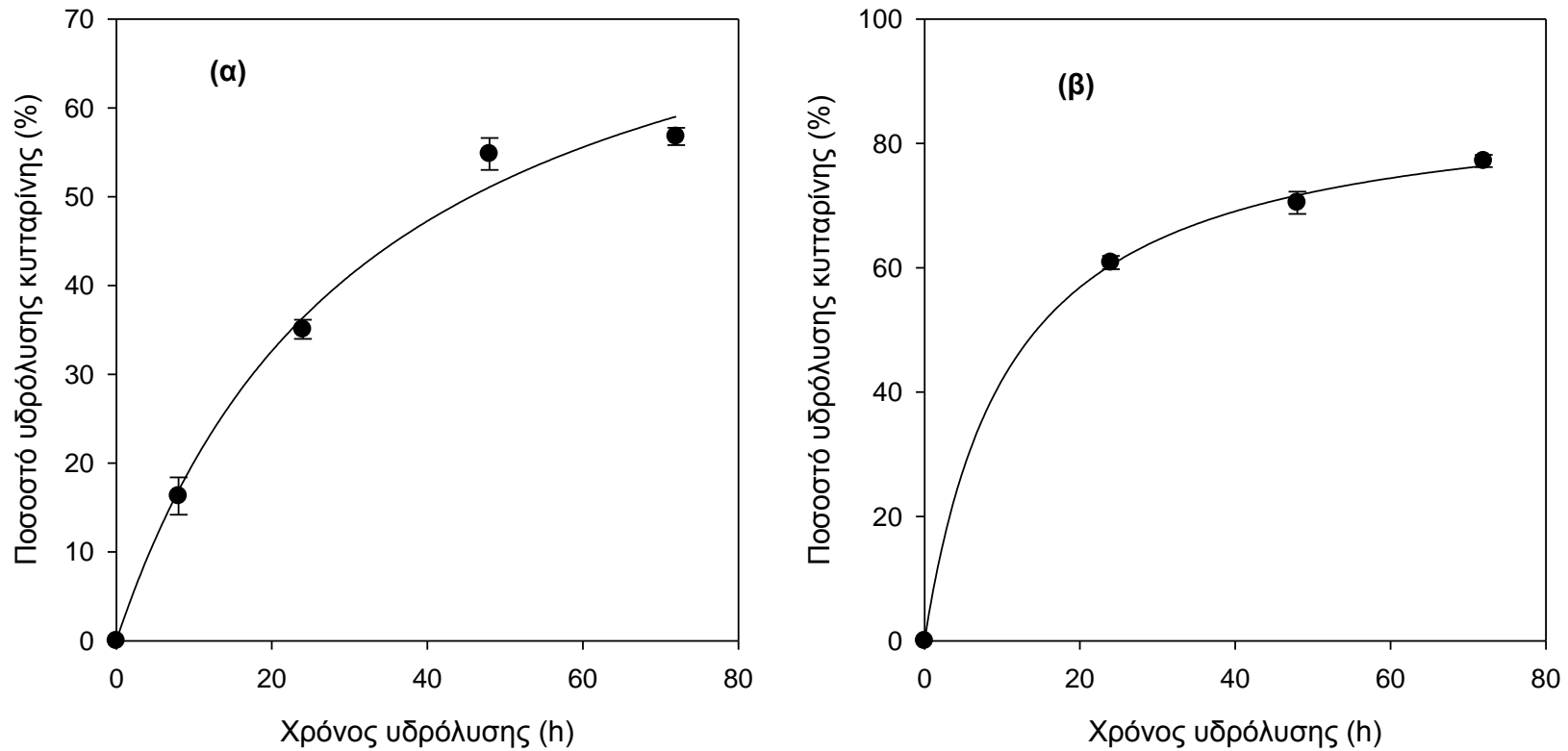
Τα πειραματικά αποτελέσματα από την υδρόλυση του στερεού υπολείμματος αλκαλικής προκατεργασίας στελεχών βαμβακιού προσαρμόστηκαν στο παρακάτω μαθηματικό μοντέλο (Εξ. 2) (Holtzaple et al., 1984). Οι προσαρμογές παρουσιάζονται στα Διαγράμματα Δ37-Δ39 και οι προβλεπόμενες από το μοντέλο τιμές x_{max} και $t_{1/2}$ στον Πίνακα Π20.



Διάγραμμα Δ37. Προσαρμογή εξίσωσης Holtzapfle για την υδρόλυση της κυτταρίνης του στερεού υπολείμματος υδροθερμικής προκατεργασίας στελεχών βαμβακιού. Συνθήκες υδρόλυσης: $C_{\text{υποστρώματος}}$: 15% β/ο, ενζυμικό σκεύασμα: Cellic[®] CTec2, ενζυμικό φορτίο: (α) 5 FPU/g κυτταρίνης, (β) 7 FPU/g κυτταρίνης, T: 50°C, pH=5.0



Διάγραμμα Δ38. Προσαρμογή εξίσωσης Holtzapfle για την υδρόλυση της κυτταρίνης του στερεού υπολείμματος υδροθερμικής προκατεργασίας στελεχών βαμβακιού. Συνθήκες υδρόλυσης: $C_{\text{υποστρώματος}}$: 15% β/ο, ενζυμικό σκεύασμα: Cellic[®] CTec2, ενζυμικό φορτίο: (α) 9 FPU/g κυτταρίνης, (β) 20 FPU/g κυτταρίνης, T: 50°C, pH=5.0

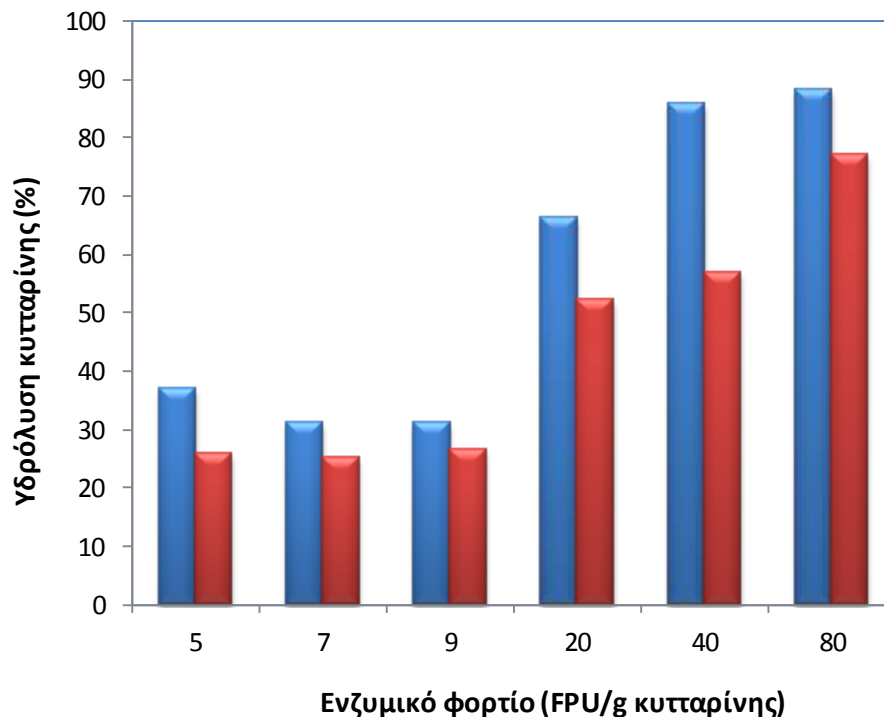


Διάγραμμα Δ39. Προσαρμογή εξίσωσης Holtzapfle για την υδρόλυση της κυτταρίνης του στερεού υπολείμματος υδροθερμικής προκατεργασίας στελεχών βαμβακιού. Συνθήκες υδρόλυσης: $C_{\text{υποστρώματος}}$: 15% β/ο, ενζυμικό σκεύασμα: Cellic[®] CTec2, ενζυμικό φορτίο: (α) 40 FPU/g κυτταρίνης, (β) 80 FPU/g κυτταρίνης, T: 50°C, pH=5.0

Πίνακας Π20. Τιμές x_{\max} και $t_{1/2}$ για την υδρόλυση της κυτταρίνης του στερεού υπολείμματος αλκαλικής προκατεργασίας στελεχών βαμβακιού.

Ενζυμικό φορτίο (FPU/g κυτταρίνης)	x_{\max} (%)	$t_{1/2}$ (h)
5	36.92 ± 4.73 ($R^2=0.99, P=0.0005$)	35.76 ± 1.38
7	31.12 ± 2.64 ($R^2=0.98, P=0.0007$)	16.24 ± 4.40
9	30.98 ± 1.86 ($R^2=0.99, P=0.0003$)	15.22 ± 3.01
20	66.26 ± 4.53 ($R^2=0.99, P=0.0002$)	22.13 ± 4.22
40	85.71 ± 9.03 ($R^2=0.99, P=0.0003$)	32.55 ± 8.08
80	88.02 ± 2.25 ($R^2=0.99, P=0.0003$)	10.97 ± 1.34

Στο Διαγράμμα Δ40 εμφανίζεται η σύγκριση των προβλεπόμενων από το υπερβολικό μοντέλο τιμών μέγιστης μετατροπής κυτταρίνης με τις αντίστοιχες πειραματικές τιμές.

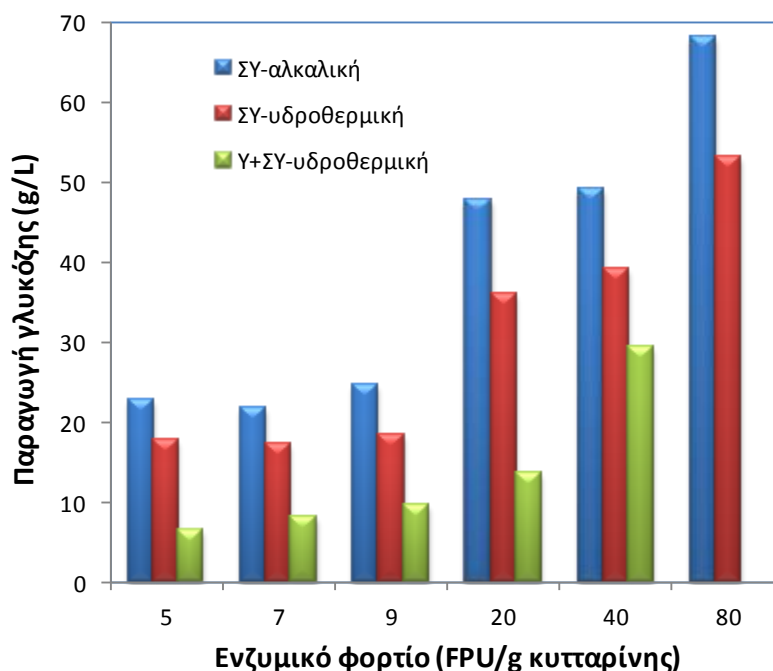


Διάγραμμα Δ40. Σύγκριση προβλεπόμενων τιμών (■) από το μοντέλο του Holtzapple μέγιστης υδρόλυσης κυτταρίνης με τις αντίστοιχες πειραματικές τιμές (■), κατά την υδρόλυση του στερεού υπολείμματος υδροθεμικής προκατεργασίας στελεχών βαμβακιού.

2.4. Συμπεράσματα ενζυμικής υδρόλυσης

Μελετήθηκε η επίδραση του είδους της προκατεργασίας (αλκαλική, υδροθερμική παρουσία οξέος) στην ενζυμική υδρόλυση των προκατεργασμένων στελεχών βαμβακιού εφαρμόζοντας διαφορετικά ενζυμικά φορτία (Διάγραμμα Δ41). Παρατηρήθηκε ότι με αύξηση του ενζυμικού φορτίου επιτυγχάνεται αύξηση της παραγόμενης γλυκόζης. Η μέγιστη γλυκόζη παρήχθη για ενζυμικό φορτίο 80 FPU/g κυτταρίνης και συγκέντρωση υποστρώματος 15%.

Η αλκαλική προκατεργασία (10%, β/β, NaOH) σύμφωνα με τα πειράματα που διεξήχθησαν αποδείχθηκε πιο αποτελεσματική στην παραγωγή γλυκόζης από τη υδροθερμική (2%, β/β, H₂SO₄) (68.19 g/L έναντι 53.13 g/L) (Πίνακας Π21).



Διάγραμμα Δ41. Μέγιστες τιμές παραγόμενης αιθανόλης συναρτήσει της εφαρμοζόμενης προκατεργασίας και του ενζυμικού φορτίου

Πίνακας Π21. Μέγιστες επιτευχθείσες τιμές παραγόμενης γλυκόζης και υρόλυσης κυτταρίνης.

Προκατεργασία	Παραγόμενη γλυκόζη (g/L)	Απόδοση γλυκόζης (g/g προκατεργασμένου CS)	Υδρόλυση κυτταρίνης (%)
Αλκαλική	68.19	0.45	74.68
Υδροθερμική προκατεργασία-ΣΥ	53.31	0.36	77.17

Στον Πίνακα Π22 παρουσιάζονται συγκριτικά στοιχεία υδρόλυσης προκατεργασμένου CS. Οι Silverstein et al. (2007) εφάρμοσαν τρεις διαφορετικές προκατεργασίες των στελεχών βαμβακιού: αλκαλική, με H_2SO_4 και με H_2O_2 (20 g NaOH ή H_2SO_4 ή H_2O_2 /100 g CS, 121 °C/15 psi, 60 min). Η ενζυμική υδρόλυση των προκατεργασμένων στελεχών βαμβακιού σε συγκέντρωση 5% (β/ο) με χρήση του μίγματος Celluclast 1.5 L- Novozyme 188 (1:1.75, o/o) σε φορτίο 40 FPU/g κυτταρίνης οδήγησε σε 30.57, 11.46 και 17.22 g γλυκόζης/100 g προκατεργασμένου CS για το στρεό υπόλειμμα της αλκαλικής, όξινης και με H_2O_2 προκατεργασία αντίστοιχα. Αύξηση της συγκέντρωσης του αλκάλειου στην προκατεργασία (40 g NaOH/100 g CS, 121 °C/15 psi, 60 min), αύξηση της συγκέντρωσης του υποστρώματος (10%, β/ο) και ταυτόχρονη μείωση του ενζυμικού φορτίου οδήγησε σε 42.9 g γλυκόζης/100 g προκατεργασμένου CS (Kaur et al., 2012).

Οι Haykir & Bakir (2013) πραγματοποίησαν προκατεργασία των στελεχών βαμβακιού με συγκέντρωση αλκάλειου 20 g NaOH/100 g CS, 121 °C/15 psi, 60 min, και υδρόλυσαν ενζυμικά με χρήση του σκευάσματος Cellic Ctec2, το προκύπτον στερεό υπόλειμμα. Η υδρόλυση προκατεργασμένου υλικού συγκέντρωσης 15% (β/ο) με χρήση 33.50 FPU/g κυτταρίνης οδήγησε σε 40.0g γλυκόζης/100 g προκατεργασμένου CS (Πίνακας Π22).

Η υψηλότερη απόδοση γλυκόζης ίση με 63 g /100 g προκατεργασμένου CS βρέθηκε από τους Binod et al., (2013) οι οποίοι όμως πραγματοποίησαν προκατεργασία των στελεχών βαμβακιού με συγκέντρωση αλκάλειου 76 g NaOH/100 g CS, 180°C, 45 min, υδρόλυση σε συγκέντρωση υποστρώματος 8% (β/ο) και αρκετά υψηλό ενζυμικό φορτίο (113 FPU/g κυτταρίνης). Οι Du et al. (2013) παρήγαγαν 29.3 g γλυκόζης/100 g CS εφαρμόζοντας αλκαλική προκατεργασία πολύ υψηλής συγκέντρωσης NaOH (60%, β/β), χαμηλή συγκέντρωση υποστρώματος (2% β/ο) και 46.8 FPU/g κυτταρίνης.

Τα αποτελέσματα της ενζυμικής υδρόλυσης της παρούσας εργασίας κρίνονται ικανοποιητικά συγκρινόμενα με αυτά της διεθνούς βιβλιογραφίας.

Πίνακας Π22. Υδρόλυση προκατεργασμένων στελεχών βαμβακιού

Προκατεργασία	Συγκέντρωση υποστρώματος (% β/ο)	Είδος ενζύμου-Ενζυμικό φορτίο	Απελευθέρωση γλυκόζης (g/100 g προκατεργασμένου CS ή ** g/100 g CS) (υδρόλυση κυτταρίνης, %)	Αναφορά
20 g NaOH/100 g CS, 121 °C/15 psi, 60 min	5.0	Celluclast 1.5 L- Novozyme 188 (1:1.75) - 40 FPU/g κυτταρίνης	30.57 (60.8%)	Silverstein et al., 2007
20 g H ₂ SO ₄ /100 g CS, 121 °C/15 psi, 60 min	5.0	Celluclast 1.5 L- Novozyme 188 (1:1.75) - 40 FPU/g κυτταρίνης	11.46 (23.9%)	Silverstein et al., 2007
20 g H ₂ O ₂ /100 g CS, 121 °C/15 psi, 60 min	5.0	Celluclast 1.5 L- Novozyme 188 (1:1.75) - 40 FPU/g κυτταρίνης	17.21 (48.8%)	Silverstein et al., 2007
76 g NaOH/100 g CS, 180°C, 100 rpm, 45 min	8.0	Zytex / 60 FPU/g DM (ή 113 FPU/g κυτταρίνης)	63.0** (96.0%)	Binod et al., 2012
υγρού/στερεού 20:1, συγκέντρωση NaOH 3.0%, β/ο, πίεση 130 kPa, 40 min	2.0	Commercial enzyme from Shanghai Boao Biotech Corp., China. 30 FPU/g DM (ή 46.8 FPU/g κυτταρίνης)	29.3** (45.8)	Du et al., 2013
40 g NaOH/100 g CS, 121°C, 60 min	10.0	20 FPU/g DM (ή 35,7 FPU/g κυτταρίνης)	42.9 (69.0%)	Kaur et al., 2012
Όζον	10.0	20 FPU/g DM (ή 35,7 FPU/g κυτταρίνης)	22.4 (53.3%)	Kaur et al., 2012
20 g NaOH/100 g CS, 121°C, 60 min	3.0	Cellic Ctec2 / 150 FPU/g DM (ή 251.26 FPU/g κυτταρίνης)	49.3** (74.0%)	Haykir & Bakir, 2013
20 g NaOH/100 g CS, 121°C, 60 min	15.0	Cellic Ctec2 / 30 FPU/g DM (ή 33.50 FPU/g κυτταρίνης)	40.0** (61.6%)	Haykir & Bakir, 2013
Ιοντικά ρευστά (EMIMAc)	15.0	Cellic Ctec2 / 30 FPU/g DM (ή 33.50 FPU/g κυτταρίνης)	44.5** (88.2%)	Haykir & Bakir, 2013
Βιολογική προκατεργασία, 14 ημέρες, SSC, <i>Phanerochaete chrysosporium</i> ATCC 24725	5.0	Celluclast 1.5 L- Novozyme 188 (1:1.75) 40 FPU/g κυτταρίνης	- (17.8%)	Shi et al., 2009
10 g NaOH/100 g CS, 121 °C/15 psi, 60 min	15.0	Cellic Ctec2 / 44.24 FPU/g DM (ή 80 FPU/g κυτταρίνης)	45.0** (74.7%)	Παρούσα εργασία

3. Βιομετατροπή προκατεργασμένων στελεχών βαμβακιού

3.1 Βιομετατροπή στερεού υπολείμματος υδροθερμικής προκατεργασίας παρουσία οξέος στελεχών βαμβακιού

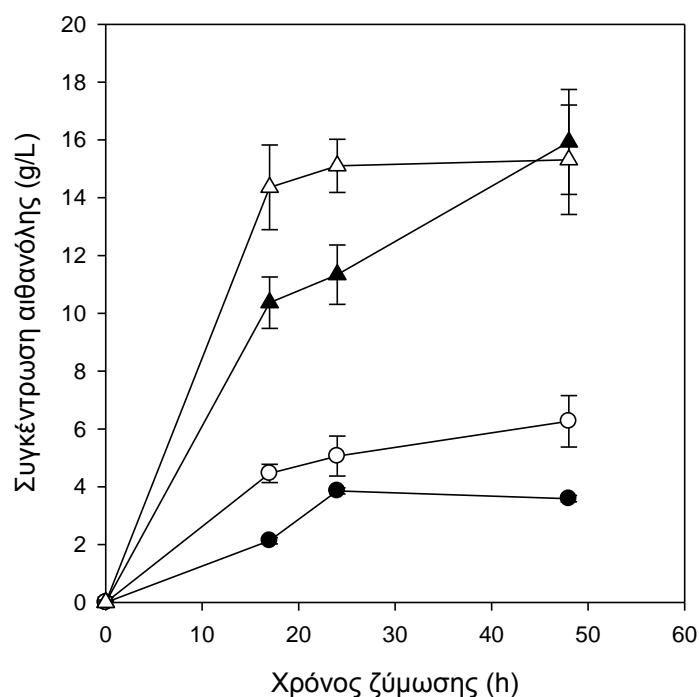
Με βάση τη σύσταση του υδροθερμικά προκατεργασμένου υλικού όπως αυτή παρουσιάζεται στον Πίνακα Π10 και τον θεωρητικό συντελεστή $Y_{\text{αιθανόλης/σακχάρου}}=0.511$ υπολογίστηκε η θεωρητική απόδοση αιθανόλης ως εξής:

Θεωρητική απόδοση με βάση την κυτταρίνη

Συστατικό	Απόδοση αιθανόλης (g/100 g ξηρού υλικού)
Κυτταρίνη*	22.93

*Ο συντελεστής μετατροπής κυτταρίνης σε γλυκόζη είναι 1.11

Σε υψηλή συγκέντρωση στερεών (15%, β/ο) μελετήθηκε η επίδραση του ενζυμικού φορτίου στην βιομετατροπή. Προηγήθηκε της βιομετατροπής ένα σύντομο στάδιο προϋδρόλυσης του υλικού διάρκειας 6 ωρών. Τα αποτελέσματα παρουσιάζονται στο Διάγραμμα Δ42 και συνοπτικά στον Πίνακα Π23.



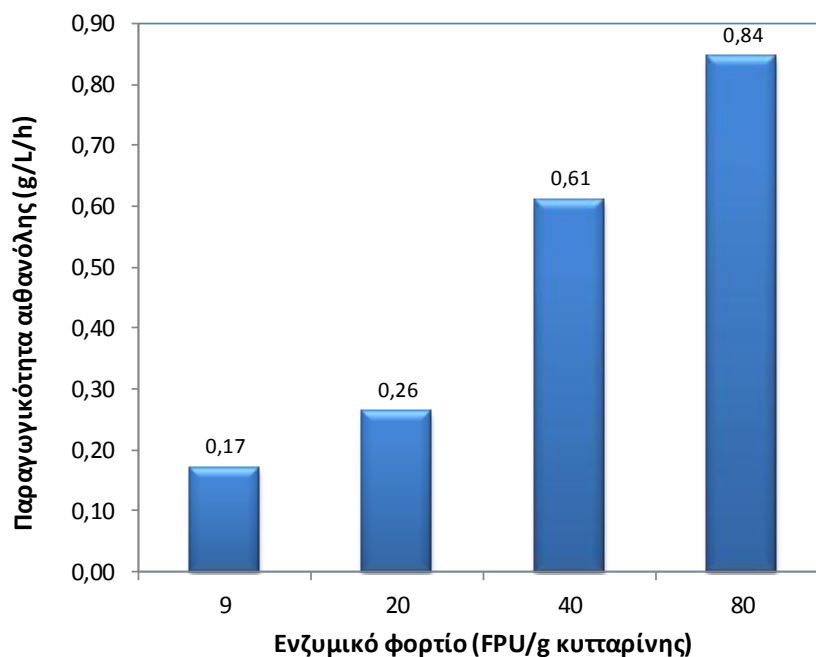
Διάγραμμα Δ42. Χρονική μεταβολή παραγόμενης αιθανόλης κατά τη βιομετατροπή του στερεού υπολείμματος υδροθερμικής προκατεργασίας στελεχών βαμβακιού για ενζυμικά φορτία 9 FPU/g κυτταρίνης (●), 20 FPU/g κυτταρίνης (○), 40 FPU/g κυτταρίνης (▲) και 80 FPU/g κυτταρίνης (Δ) του ενζυμικού σκευάσματος Cellic® CTec2. Συνθήκες βιομετατροπής: $C_{\text{υποστρώματος}}$: 15% β/ο, T: 30°C, pH=5.0, 15 mg/g προκατεργασμένων στελεχών βαμβακιού μαγιά αρτοποιίας.

Πίνακας Π23. Μέγιστες τιμές αιθανόλης συναρτήσει ενζυμικού φορτίου κατά τη βιομετατροπή του στερεού υπολείμματος υδροθερμικής προκατεργασίας στελεχών βαμβακιού.

Ενζυμικό φορτίο (FPU/gκυτταρίνης)	Αιθανόλη (g/L)	Απόδοση (g/100 gr προκ. CS)	Ποσοστό επί της μέγιστης θεωρητικής (%)*
9	3.09 ± 0.11	2.06 ± 0.72	8.99 ± 0.15
20	6.27 ± 0.89	4.18 ± 0.59	18.22 ± 2.58
40	15.93 ± 1.82	10.62 ± 1.21	46.31 ± 5.28
80	15.31 ± 1.89	10.21 ± 1.60	44.52 ± 1.32

*Με βάση τη μέγιστη θεωρητική απόδοση αιθανόλης από τη βιομετατροπή της κυτταρίνης ($Y_{\text{αιθανόλης/σακχάρου}}=0.511$)

Η παραγωγικότητα της διεργασίας συναρτήσει του ενζυμικού φορτίου παρουσιάζεται στο Διάγραμμα Δ43.



Διάγραμμα Δ43. Μεταβολή της παραγωγικότητας αιθανόλης συναρτήσει το ενζυμικού φορτίου.

3.2 Βιομετατροπή στερεού υπολείμματος αλκαλικής προκατεργασίας στελεχών βαμβακιού: επίδραση του ενζυμικού φορτίου

Με βάση τη σύσταση του αλκαλικά προκατεργασμένου υλικού όπως αυτή παρουσιάζεται στον Πίνακα Π9 και τον θεωρητικό συντελεστή $Y_{\text{αιθανόλης/σακχάρου}}=0.511$ υπολογίστηκε η θεωρητική απόδοση αιθανόλης ως εξής:

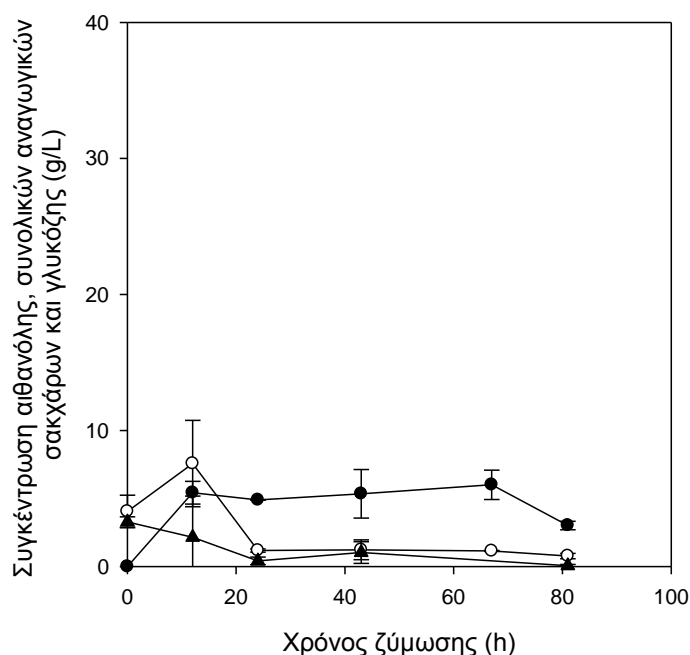
Θεωρητική απόδοση με βάση την κυτταρίνη

Συστατικό Απόδοση αιθανόλης (g/100 g ξηρού υλικού)

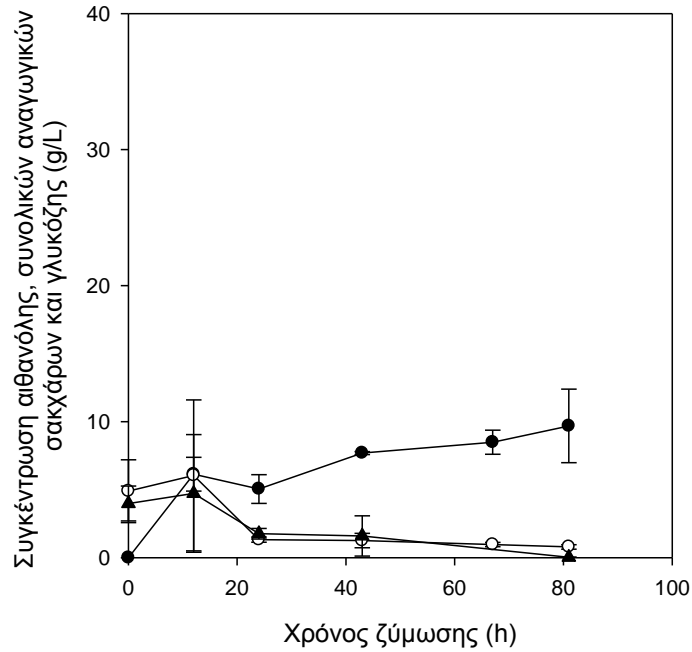
Κυτταρίνη* 31.41

*Ο συντελεστής μετατροπής κυτταρίνης σε γλυκόζη είναι 1.11

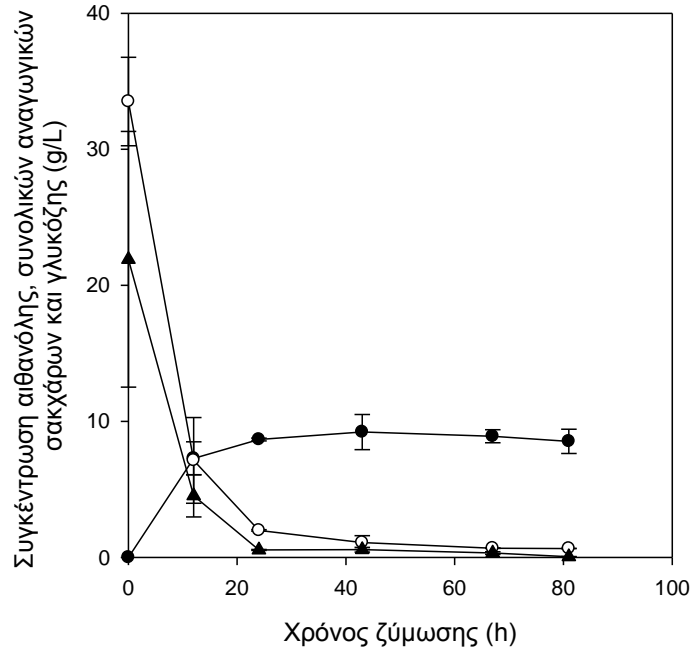
Σε υψηλή συγκέντρωση στερεών (15%, β/ο) μελετήθηκε η επίδραση του ενζυμικού φορτίου στην βιομετατροπή. Προηγήθηκε της βιομετατροπής ένα σύντομο στάδιο προϋδρόλυσης του υλικού διάρκειας 6 ωρών. Τα αποτελέσματα παρουσιάζονται στα Διαγράμματα Δ44-Δ48 και συνοπτικά στον Πίνακα Π24.



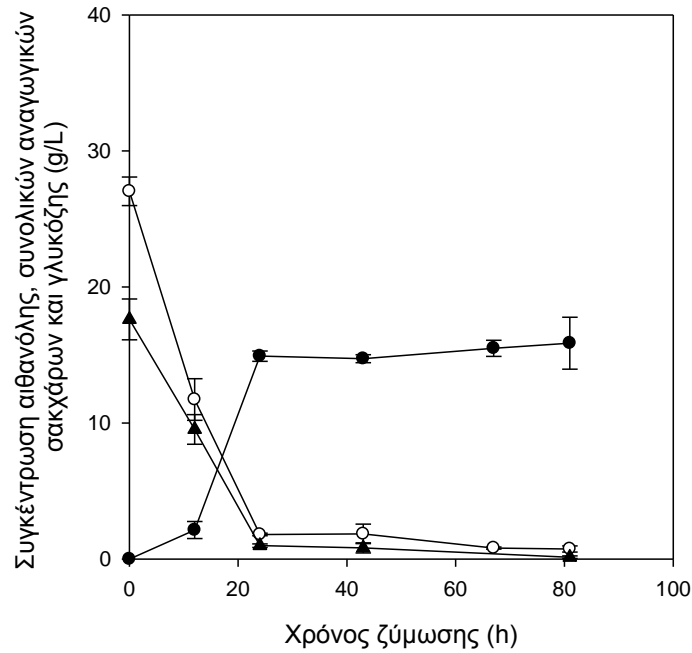
Διάγραμμα Δ44. Χρονική μεταβολή παραγόμενης αιθανόλης (●) και μείωσης ολικών αναγωγικών ομάδων (○) και γλυκόζης (▲) κατά τη βιομετατροπή του στερεού υπολείμματος αλκαλικής προκατεργασίας στελεχών βαμβακιού. *Συνθήκες βιομετατροπής:* $C_{\text{υποστρώματος}}$: 15% β/ο, ενζυμικό σκεύασμα: Cellic[®] CTec2, ενζυμικό φορτίο: 7 FPU/g κυτταρίνης, T: 30°C, pH=5.0, 15 mg/g προκατεργασμένων στελεχών βαμβακιού μαγιά αρτοποιίας.



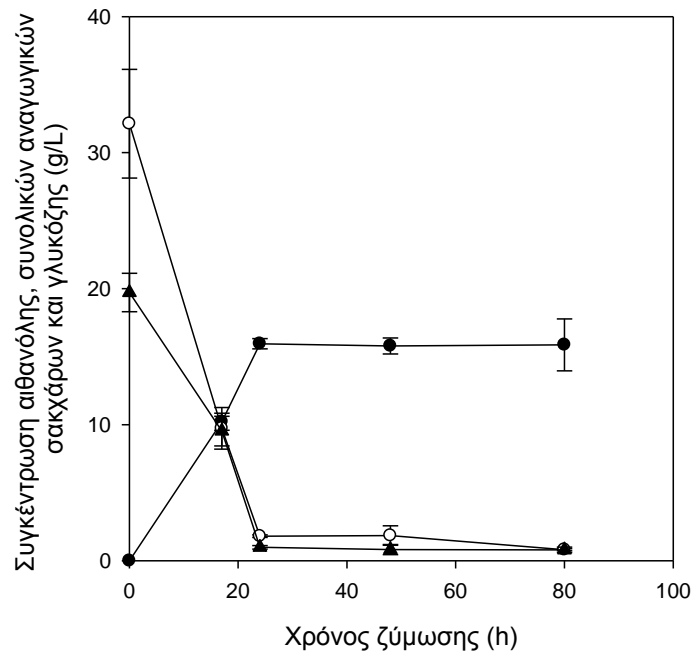
Διάγραμμα Δ45. Χρονική μεταβολή παραγόμενης αιθανόλης (●) και μείωσης ολικών αναγωγικών ομάδων (○) και γλυκόζης (▲) κατά τη βιομετατροπή του στερεού υπολείμματος αλκαλικής προκατεργασίας στελεχών βαμβακιού. *Συνθήκες βιομετατροπής:* $C_{\text{υποστρώματος}}$: 15% β/ο, ενζυμικό σκεύασμα: Cellic[®] CTec2, ενζυμικό φορτίο: 9 FPU/g κυτταρίνης, T: 30°C, pH=5.0, 15 mg/g προκατεργασμένων στελεχών βαμβακιού μαγιά αρτοποιίας.



Διάγραμμα Δ45. Χρονική μεταβολή παραγόμενης αιθανόλης (●) και μείωσης ολικών αναγωγικών ομάδων (○) και γλυκόζης (▲) κατά τη βιομετατροπή του στερεού υπολείμματος αλκαλικής προκατεργασίας στελεχών βαμβακιού. *Συνθήκες βιομετατροπής:* $C_{\text{υποστρώματος}}$: 15% β/ο, ενζυμικό σκεύασμα: Cellic[®] CTec2, ενζυμικό φορτίο: 20 FPU/g κυτταρίνης, T: 30°C, pH=5.0, 15 mg/g προκατεργασμένων στελεχών βαμβακιού μαγιά αρτοποιίας.



Διάγραμμα Δ47. Χρονική μεταβολή παραγόμενης αιθανόλης (●) και μείωσης ολικών αναγωγικών ομάδων (○) και γλυκόζης (▲) κατά τη βιομετατροπή του στερεού υπολείμματος αλκαλικής προκατεργασίας στελεχών βαμβακιού. Συνθήκες βιομετατροπής: $C_{\text{υποστρώματος}}$: 15% β/ο, ενζυμικό σκεύασμα: Cellic[®] CTec2, ενζυμικό φορτίο: 40 FPU/g κυτταρίνης, T: 30°C, pH=5.0, 15 mg/g προκατεργασμένων στελεχών βαμβακιού μαγιά αρτοποιίας.



Διάγραμμα Δ48. Χρονική μεταβολή παραγόμενης αιθανόλης (●) και μείωσης ολικών αναγωγικών ομάδων (○) και γλυκόζης (▲) κατά τη βιομετατροπή του στερεού υπολείμματος αλκαλικής προκατεργασίας στελεχών βαμβακιού. Συνθήκες βιομετατροπής: $C_{\text{υποστρώματος}}$: 15% β/ο, ενζυμικό σκεύασμα: Cellic[®] CTec2, ενζυμικό φορτίο: 80 FPU/g κυτταρίνης, T: 30°C, pH=5.0, 15 mg/g προκατεργασμένων στελεχών βαμβακιού μαγιά αρτοποιίας.

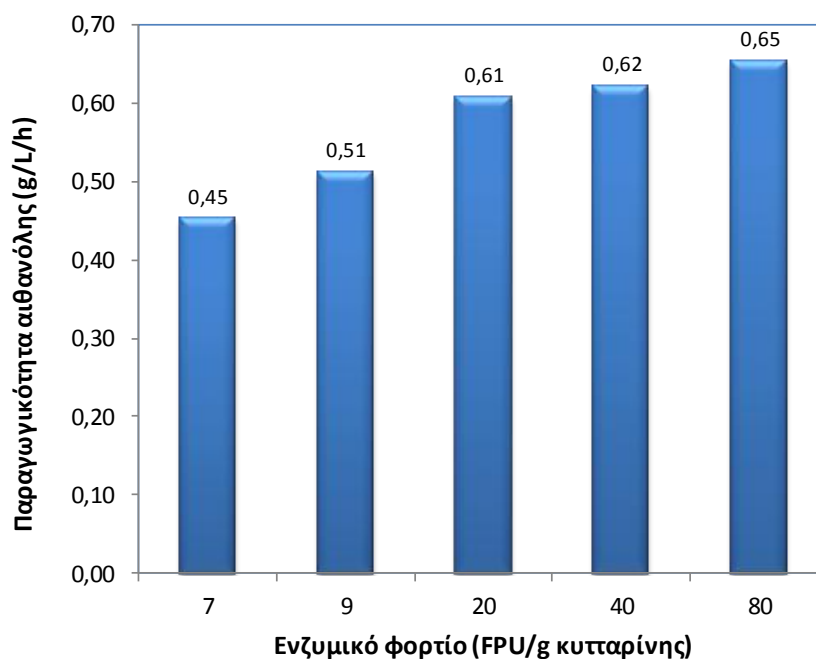
Πίνακας Π24. Μέγιστες τιμές αιθανόλης συναρτήσει ενζυμικού φορτίου κατά τη βιομετατροπή του στερεού υπολείμματος αλκαλικής προκατεργασίας στελεχών βαμβακιού.

Ενζυμικό φορτίο (FPU/gκυτταρίνης)	Αιθανόλη (g/L)	Απόδοση (g/100 gr προκ. CS)	Ποσοστό επί της μέγιστης θεωρητικής (%)*
7	6.00 ± 0.58	4.00 ± 0.39	12.75 ± 1.23
9	7.67 ± 0.11	5.13 ± 0.07	16.32 ± 0.24
20	9.21 ± 0.92	6.14 ± 0.61	19.60 ± 1.95
40	15.49 ± 0.59	10.33 ± 0.39	32.88 ± 1.25
80	15.95 ± 0.70	10.63 ± 0.47	33.86 ± 1.49

*Με βάση τη μέγιστη θεωρητική απόδοση αιθανόλης από τη βιομετατροπή της κυτταρίνης ($Y_{\text{αιθανόλης/σακχάρου}}=0.511$)

Από τα Διαγράμματα Δ42-Δ48 παρατηρείται ότι η μέγιστη παραγωγή αιθανόλης είναι περίπου στις 24 ώρες και στη συνέχεια διατηρείται σταθερή.

Η παραγωγικότητα της διεργασίας συναρτήσει του ενζυμικού φορτίου παρουσιάζεται στο Διάγραμμα Δ49.



Διάγραμμα Δ49. Μεταβολή της παραγωγικότητας αιθανόλης συναρτήσει το ενζυμικού φορτίου.

Η αύξηση του ενζυμικού φορτίου οδηγεί σε αύξηση της παραγόμενης αιθανόλης. Η εξάρτηση της παραγόμενης αιθανόλης από το ενζυμικό φορτίο περιγράφεται από την εξίσωση (1)

$$y = \frac{a \cdot x}{b + x} \quad \text{Εξ. (1)}$$

όπου,

y: η συγκέντρωση της παραγόμενης αιθανόλης (g/L)

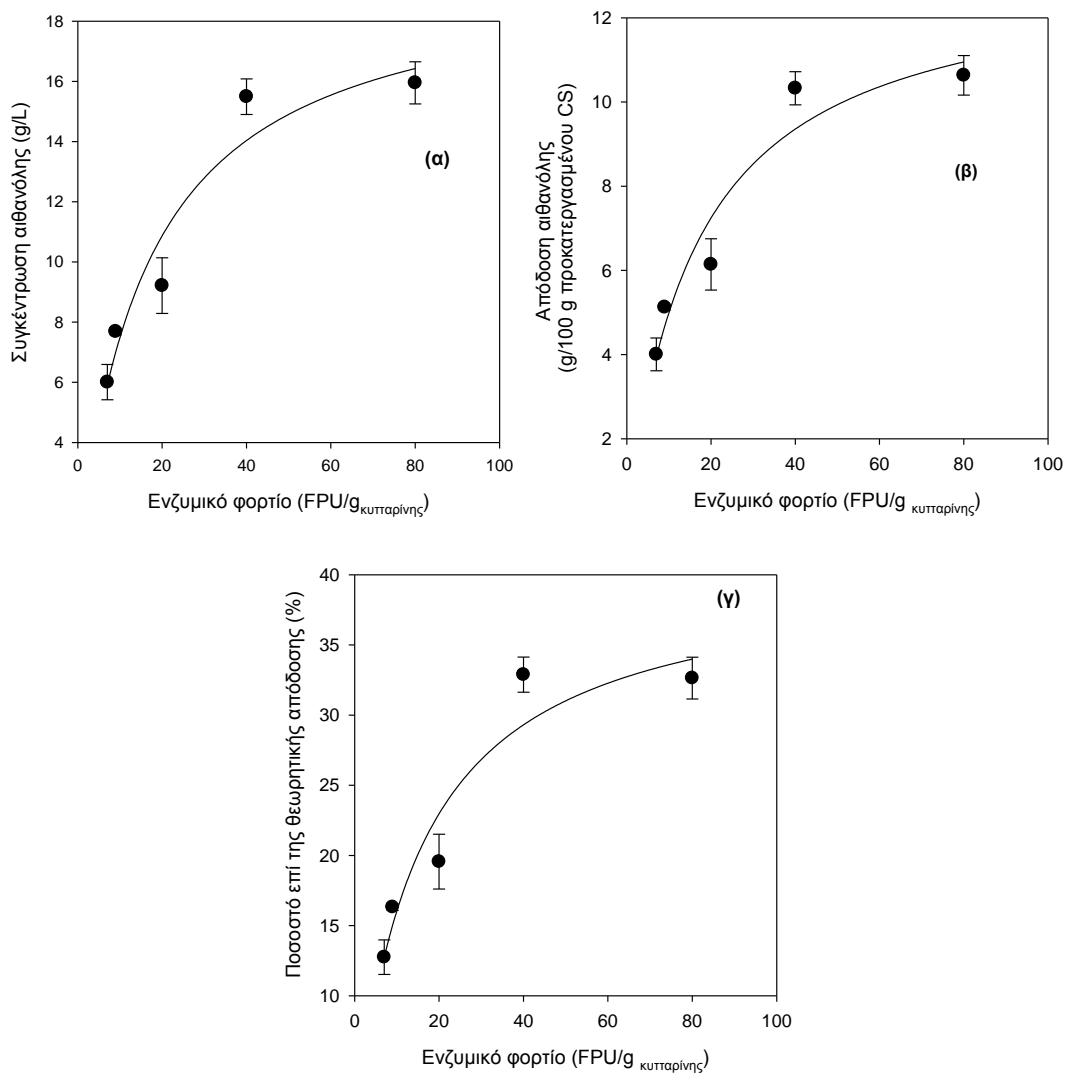
x: το ενζυμικό φορτίο (FPU/g κυτταρίνης)

a, b: συντελεστές της εξίσωσης (η φυσική σημασία των συντελεστών είναι α: η

μέγιστη τιμή της εξαρτημένης μεταβλητής και β: η τιμή της ανεξάρτητης

μεταβλητής για την οποία επιτυγχάνεται το 50% της μέγιστης τιμής της εξαρτημένης μεταβλητής)

Η προσαρμογή της εν λόγω εξίσωσης στα πειραματικά παρουσιάζεται στο διάγραμμα Δ50 και οι συντελεστές της εξίσωσης στον Πίνακα Π25.



Διάγραμμα Δ50. Προσαρμογή της εξίσωσης (2) στην (α) παραγωγή αιθανόλης (g/L), (β) απόδοση αιθανόλης (g/100 g προκατεργασμένου CS) και (γ) στο ποσοστό επί της θεωρητικής απόδοσης (%)

Πίνακας Π25. Συντελεστές της εξίσωσης που περιγράφει την εξάρτηση

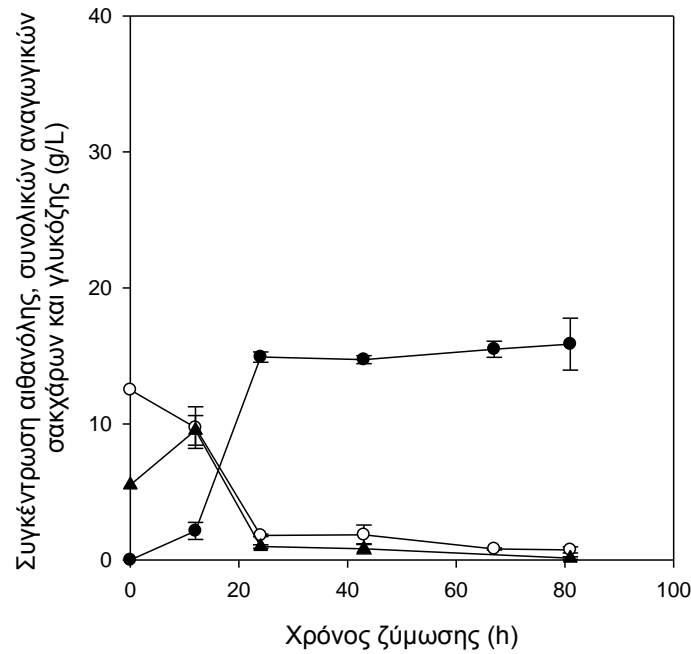
	a	b
Συγκέντρωση αιθανόλης (g/L)	19.80 ± 2.45 (R ² =0.96, P=0.007)	16.44 ± 5.20
Απόδοση (g/100 gr προκ. CS)	13.20 ± 1.49 (R ² =0.96, P=0.007)	16.44 ± 5.20
Ποσοστό επί της μέγιστης θεωρητικής απόδοσης (%)	40.46 ± 4.81 (R ² =0.96, P=0.007)	15.23 ± 5.17

Τα πειραματικά αποτελέσματα προσαρμόζονται ικανοποιητικά στην εξίσωση (2) όπως προκύπτει τόσο από τον συντελεστή συσχέτισης (R²) όσο και από την τιμή του p (p<0.05). Η εν λόγω προσαρμογή για τα αποτελέσματα της συγκέντρωσης αιθανόλης προβλέπει ότι η μέγιστη επιτευχθείσα τιμή αιθανόλης υπό τις συνθήκες που πραγματοποιήθηκαν τα πειράματα είναι 19.80 g/L και για ενζυμικό φορτίο 16.44 FPU/γκυτταρίνης επιτυγχάνεται παραγωγή αιθανόλης ίση με το ήμισυ της μέγιστης τιμής (Πίνακας Π25).

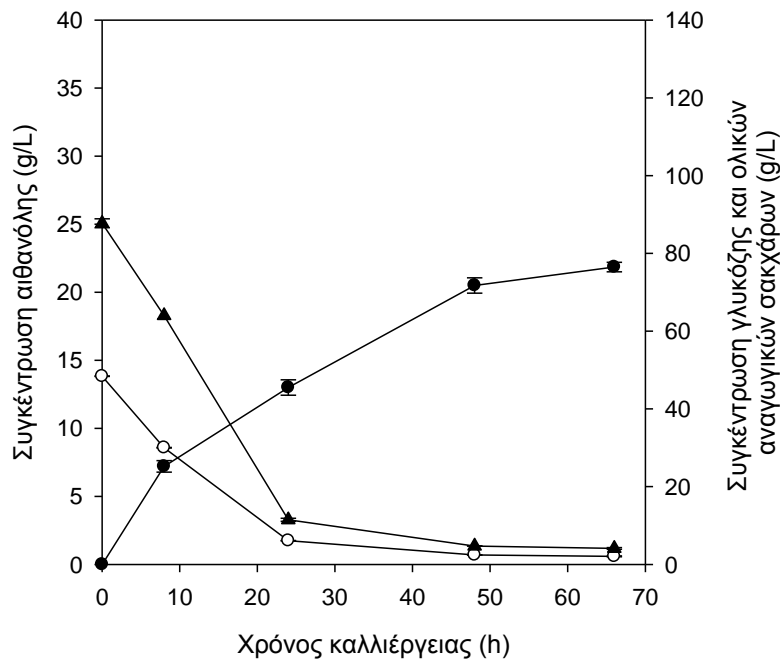
Πρακτικά για ενζυμικά φορτία > 50 FPU/γκυτταρίνης δεν επιδρά στην παραγωγή αιθανόλης υπό τις συνθήκες που διεξήχθησαν τα πειράματα.

3.3 Βιομετατροπή στερεού υπολείμματος αλκαλικής παροκατεργασίας στελεχών βαμβακιού: επίδραση του χρόνου προϋδρόλυσης

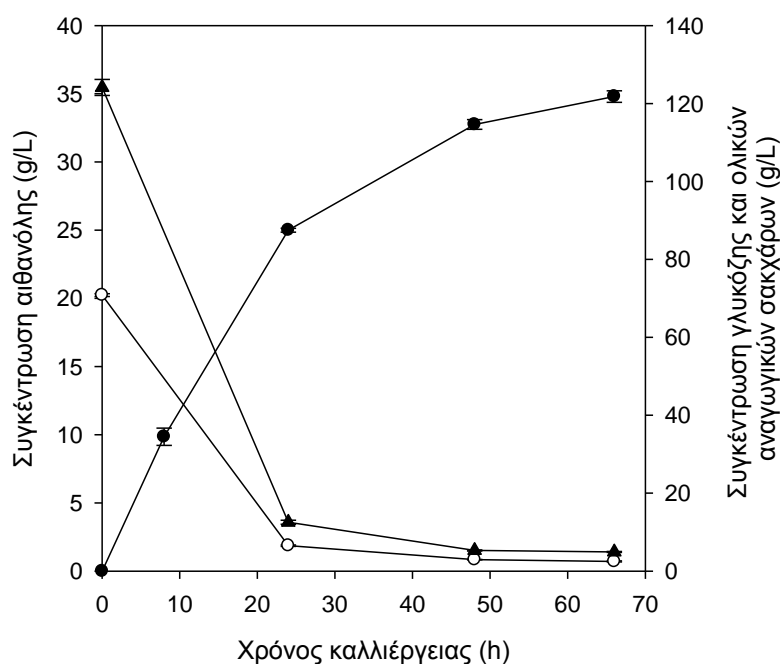
Μελετήθηκε η επίδραση της συγκέντρωσης του στερεού υπολείμματος αλκαλικής παροκατεργασίας στελεχών βαμβακιού (15% και 20%, β/ο) και του χρόνου προϋδρόλυσης (6 και 14 h). Τα αποτελέσματα παρουσιάζονται στα Διαγράμματα Δ51-Δ53 και συνοπτικά στον Πίνακα Π26.



Διάγραμμα Δ51. Χρονική μεταβολή συγκέντρωσης (g/L) αιθανόλης (●), ολικών αναγωγικών σακχάρων (▲) και γλυκόζης (○) κατά τη βιομετατροπή του στερεού υπολείμματος αλκαλικής προκατεργασίας στελεχών βαμβακιού. Συνθήκες βιομετατροπής: $C_{\text{υποστρώματος}}$: 15% β/ο, ενζυμικό σκεύασμα: Cellic[®] CTec2, ενζυμικό φορτίο: 80 FPU/g κυτταρίνης , T: 30°C, pH=5.0, 15 mg/g προκατεργασμένων στελεχών βαμβακιού μαγιά αρτοποιίας, χρόνος προύδρολυσης: 6 h.



Διάγραμμα Δ52. Χρονική μεταβολή συγκέντρωσης (g/L) αιθανόλης (●), ολικών αναγωγικών σακχάρων (▲) και γλυκόζης (○) κατά τη βιομετατροπή του στερεού υπολείμματος αλκαλικής προκατεργασίας στελεχών βαμβακιού. Συνθήκες βιομετατροπής: $C_{\text{υποστρώματος}}$: 15% β/ο, ενζυμικό σκεύασμα: Cellic[®] CTec2, ενζυμικό φορτίο: 80 FPU/g κυτταρίνης , T: 30°C, pH=5.0, 15 mg/g προκατεργασμένων στελεχών βαμβακιού μαγιά αρτοποιίας, χρόνος προύδρολυσης: 14 h.



Διάγραμμα Δ53. Χρονική μεταβολή συγκέντρωσης (g/L) αιθανόλης (●), ολικών αναγωγικών σακχάρων (▲) και γλυκόζης (○) κατά τη βιομετατροπή του στερεού υπολείμματος αλκαλικής προκατεργασίας στελεχών βαμβακιού. *Συνθήκες βιομετατροπής:* $C_{\text{υποστρώματος}}$: 20% β/ο, ενζυμικό σκεύασμα: Cellic[®] CTec2, ενζυμικό φορτίο: 80 FPU/g κυτταρίνης, T : 30°C, pH=5.0, 15 mg/g προκατεργασμένων στελεχών βαμβακιού μαγιά αρτοποιίας, χρόνος προϋδρόλυσης: 14 h.

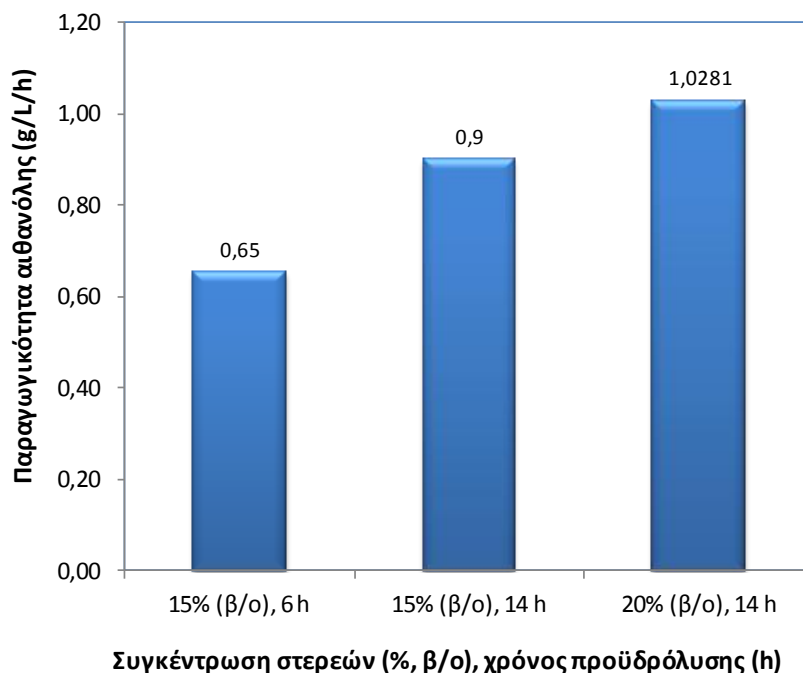
Πίνακας Π26. Μέγιστες τιμές αιθανόλης συναρτήσει του χρόνου προϋδρόλυσης και της συγκέντρωσης υποστρώματος

CS (% β/ο)	Χρόνος προϋδρόλυσης (h)	Αιθανόλη (g/L)	Απόδοση (g/100 gr προκ. CS)	Ποσοστό επί της μέγιστης θεωρητικής (%)*
15	6	15.95 ± 0.70	10.63 ± 0.47	33.86 ± 1.49
15	14	21.85 ± 0.35	14.57 ± 0.24	46.38 ± 0.75
20	14	34.80 ± 0.42	17.40 ± 0.21	55.40 ± 0.68

*Με βάση τη μέγιστη θεωρητική απόδοση αιθανόλης από τη βιομετατροπή της κυτταρίνης ($Y_{\text{αιθανόλης/σακχάρου}}=0.511$)

Από τα διαγράμματα Δ51-Δ53 προκύπτει ότι αυξάνοντας τον χρόνο προϋδρόλυσης 6-14 hr αυξάνεται η αρχική συγκέντρωση της γλυκόζης. Η παραγωγή αιθανόλης ολοκληρώνεται πρακτικά στις 50 h.

Η παραγωγικότητα της διεργασίας συναρτήσει του χρόνου προϋδρόλυσης και της συγκέντρωσης στερεών παρουσιάζεται στο Διάγραμμα Δ54.



Διάγραμμα Δ54. Μεταβολή της παραγωγικότητας αιθανόλης συναρτήσει της συγκέντρωσης στερεών (% β/ο) και του χρόνου προϋδρόλυσης.

Η αύξηση του χρόνου προϋδρόλυσης από 6 σε 14 ώρες αυξάνει κατά 27% περίπου την παραγόμενη αιθανόλη. Επίσης η αύξηση της συγκέντρωσης των στελεχών βαμβακιού αυξάνει περαιτέρω την παραγωγή αιθανόλης. Πιο συγκεκριμένα για συγκέντρωση υποστρώματος 15%, χρόνο προϋδρόλυσης 6 hr και συγκέντρωση ενζύμου 80 FPU/g κυτταρίνης η παραγόμενη αιθανόλη από αλκαλικά προκατεργασμένα στελέχη βαμβακιού μετρήθηκε 15.95 g/L ενώ αυξάνοντας το χρόνο προϋδρόλυσης στις 14 hr παρατηρήθηκε αύξηση στην τιμή της αιθανόλης στα 21.85 g/L. Με ταυτόχρονη αύξηση της συγκέντρωσης υποστρώματος (20%) σημειώθηκε περαιτέρω αύξηση της παραγόμενης αιθανόλης 34.86 g/L. Η τιμή αυτή της αιθανόλης ήταν και η μέγιστη που επιτεύχθηκε στην παρούσα μελέτη.

3.4. Συμπεράσματα βιομετατροπής

Μελετήθηκε η επίδραση του είδους της προκατεργασίας (αλκαλική, υδροθερμική παρουσία οξέος) στην βιομετατροπή των προκατεργασμένων στελεχών βαμβακιού εφαρμόζοντας διαφορετικά ενζυμικά φορτία. Παρατηρήθηκε ότι με αύξηση του ενζυμικού φορτίου επιτυγχάνεται αύξηση της παραγόμενης αιθανόλης. Ειδικότερα

στην περίπτωση του στερεού υπολείμματος υδροθερμικής προκατεργασίας η μέγιστη παραγόμενη αιθανόλη ανήλθε στα 15.31 g/L (10.21 g/100 g προκατεργασμένων στελεχών βαμβακιού, 44.52% της μέγιστης θεωρητικής) ενώ στην περίπτωση του στερεού υπολείμματος αλκαλικής προκατεργασίας στελεχών βαμβακιού η αιθανόλη ανήλθε στα 15.95 g/L (10.63 g/100 g προκατεργασμένων στελεχών βαμβακιού, 33.86% της μέγιστης θεωρητικής).

Η αύξηση του χρόνου προϋδρόλυσης από 6 σε 14 ώρες οδήγησε σε αύξηση της παραγόμενης αιθανόλης (21.85 g/L, 14.63 g/100 g προκατεργασμένων στελεχών βαμβακιού, 46.38% της μέγιστης θεωρητικής). Επιπλέον αυξάνοντας τη συγκέντρωση του υποστρώματος από 15 σε 20% και διατηρώντας το χρόνο προϋδρόλυσης στις 14 ώρες παρατηρήθηκε περαιτέρω αύξηση της παραγόμενης αιθανόλης (34.80 g/L, 17.40 g/100 g προκατεργασμένων στελεχών βαμβακιού, 55.40% της μέγιστης θεωρητικής).

Στον Πίνακα Π27 παρουσιάζονται συγκριτικά στοιχεία υδρόλυσης προκατεργασμένου CS. Οι Kaur et al (2012) εφάρμοσαν μη ισοθερμοκρασιακή ταυτόχρονη σακχαροποίηση και ζύμωση (NSSF) για την βιομετατροπή 10% (β/ο) αλκαλικά (40 g NaOH/100 g CS, 121°C, 60 min) προκατεργασμένων στελεχών βαμβακιού, χρησιμοποιώντας το μικροοργανισμό *Pichia kudriavzevii* HOP-1 και προσθέτοντας 20 FPU/g DM (ή 35.7 FPU/g κυτταρίνης) κυτταρινολυτικού σκευάσματος. Η προϋδρόλυση του υλικού διήρκεσε 12 h. Η παραγόμενη αιθανόλη ανήλθε στα 19.48 g/L (19.48 g/100 g προκατεργασμένου CS) ενώ η παραγωγικότητα του συστήματος στα 0.41 g/L/h. Η εφαρμογή διαδικασίας διακριτής υδρόλυσης και ζύμωσης (SHF) στο υδρόλυμα που προέκυψε από τις προαναφερθείσες συνθήκες προκατεργασίας και προσθήκης ενζύμου οδήγησε σε παραγωγή 19.82 g/L αιθανόλης (19.82 g/100 g προκατεργασμένου CS), ενώ χαμηλότερη απόδοση (10.96 g/L αιθανόλης, 10.96 g/100 g προκατεργασμένου CS) παρατηρήθηκε στις ίδιες συνθήκες υδρόλυσης και βιομετατροπής αλλά με διαφορετική προκατεργασία της πρώτης ύλης (Kaur et al., 2012).

Οι Haykir and Bakir (2013), εφάρμοσαν διακριτή υδρόλυση και ζύμωση σε προκατεργασμένα με άλκαλι (20 g NaOH/100 g CS, 121°C, 60 min) και ιοντικά ρευστά (EMIMAc) στελέχη βαμβακιού. Χρησιμοποίησαν το μικροοργανισμό *S. cerevisiae* NRRL Y-132 και το στάδιο της υδρόλυσης πραγματοποιήθηκε σε συγκέντρωση υποστρώματος 15% (β/ο) με χρήση του σκευάσματος Cellic Ctec2 (30

FPU/g DM ή 33.50 FPU/g κυτταρίνης). Παρήχθησαν 19.8 και 22.9 g/L αιθανόλης (13.3 και 15.3 g/100 g προκατεργασμένου CS, αντίστοιχα) από στελέχη βαμβακιού αλκαλικά προκατεργασμένα και προκατεργασμένα με ιοντικά ρευστά αντίστοιχα. Οι παραγωγικότητες της διεργασίας βρέθηκαν ίσες με 1.67 και 1.92 g/L/h αντίστοιχα.

Πίνακας Π27. Παραγωγή βιοαιθανόλης από προκατεργασμένα στελέχη βαμβακιού.

Μικροοργανισμός	Προκατεργασία	Προσθήκη ενζύμων	Απόδοση αιθανόλης (g/100 g προκατ. CS)	Αναφορά
<i>Saccharomyces cerevisiae</i> ATCC 24859	Βιολογική προκατεργασία, 14 ημέρες, SSC, <i>Phanerochaete chrysosporium</i> ATCC 24725	Celluclast 1.5 L- Novozyme 188 (1:1.75) 40 FPU/g κυτταρίνης	2.5	Shi et al., 2009
Dry yeast	Υδροθερμική (SF: 4.34)	20 FPU/g DM (ή 44.7 FPU/g κυτταρίνης)	16.81	Jinag et al., 2015
<i>Pichia kudriavzevii</i> HOP-1	Αλκαλική (40 g NaOH/100 g CS, 121°C, 60 min)	20 FPU/g DM (ή 35.7 FPU/g κυτταρίνης)	19.48 ⁽¹⁾	Kaur et al., 2012
<i>P. kudriavzevii</i> HOP-1	Όζον	20 FPU/g DM (ή 35.7 FPU/g κυτταρίνης)	10.96 ⁽²⁾	Kaur et al., 2012
<i>P. kudriavzevii</i> HOP-1	Αλκαλική (40 g NaOH/100 g CS, 121°C, 60 min)	20 FPU/g DM (ή 35.7 FPU/g κυτταρίνης)	19.82 ⁽²⁾	Kaur et al., 2012
<i>S. cerevisiae</i> NRRL Y-132	Αλκαλική (20 g NaOH/100 g CS, 121°C, 60 min)	Cellic Ctec2 / 30 FPU/g DM (ή 33.50 FPU/g κυτταρίνης)	13.3 ⁽²⁾	Haykir & Bakir 2013
<i>S. cerevisiae</i> NRRL Y-132	Ιοντικά ρευστά (EMIMAc)	Cellic Ctec2 / 30 FPU/g DM (ή 33.50 FPU/g κυτταρίνης)	15.33 ⁽²⁾	Haykir & Bakir 2013
<i>S. cerevisiae</i>	Αλκαλική (10 g NaOH/100 g CS, 121°C, 60 min)	Cellic Ctec2 / 44.24 FPU/g DM (ή 80 FPU/g κυτταρίνης)	17.40	Παρούσα εργασία

⁽¹⁾ Ταυτόχρονη σακχαροποίηση και ζύμωση (SSF) και μη ισοθερμοκρασιακή ταυτόχρονη σακχαροποίηση και ζύμωση (NSSF), ⁽²⁾ Διακριτή Υδρόλυση και Ζύμωση (SHF)

Υδροθερμικά προκατεργασμένο βαμβάκι υπεβλήθει σε μη ισοθερμοκρασιακή ταυτόχρονη σακχαροποίηση και ζύμωση (συγκέντρωση υποστρώματος 8%, β/ο), η προϋδρόλυση του υλικού διήρκεσε 24 h, με χρήση 20 FPU/g DM (ή 44.7 FPU/g κυτταρίνης) κυτταρινολυτικών ενζύμων και ζυμώθηκε με χρήση ξηρής μάγιας παράγοντας 16.81 g/100 g προκατεργασμένου CS (Jiang et al., 2015).

Χρησιμοποιώντας άχυρο σίτου, οι Saha et al (2005), παράγααν 19.00 g/L αιθανόλη (24 g/100 g άχυρου σίτου) έχοντας κάνει προκατεργασία με 0,75% H₂SO₄ στους 121 °C για 1 hr εφαρμόζοντας διακριτή υδρόλυση και ζύμωση, ενώ όταν εφαρμόστηκε ταυτόχρονη σακχαροποίηση και ζύμωση η αντίστοιχη τιμή ήταν 13.00 g/L αιθανόλη (17 g/100 g άχυρου σίτου).

Οι Dogaris et al., (2012) πραγματοποίησαν υδροθερμική προκατεργασία παρουσία αραιού οξέος (2%, β/β H₂SO₄, 210°C, 10 min) της βγάσσης σόργου και βιομετατροπή του υγρού ρεύματος και του στερεού υπολείμματος της προκατεργασίας με χρήση του μύκητα *Neurospora crassa* DSM 1129 και προσθήκη εμπορικών κυτταρινασών (6 FPU/g SB). Η παραγόμενη αιθανόλη με διεργασία ταυτόχρονης σακχαροποίησης και ζύμωσης έφτασε τα 27.6 g/L (31.5 g/100g συνολικών στερεών).

Συμπερασματικά, η προσέγγιση που εφαρμόστηκε στην παρούσα εργασία οδήγησε σε παραγωγή αιθανόλης συγκρίσιμη με αποτελέσματα της βιβλιογραφίας.

Συμπεράσματα

Συμπεράσματα

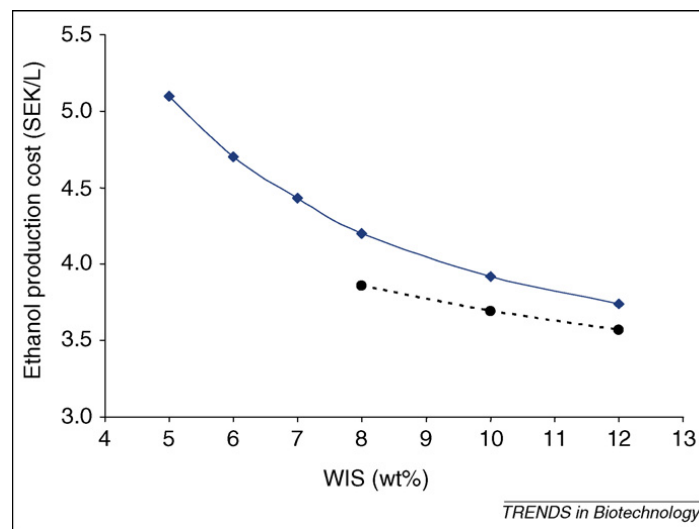
Τα στελέχη βαμβακιού αποτελούν περίπου το 80% του βάρους του συσπόρου βαμβακιού, η ετήσια παραγωγή των στελεχών βαμβακιού υπολογίζεται σε 984.000 τόνους περίπου. Είναι μία πρώτη ύλη με υψηλό περιεχόμενο σε κυτταρίνη αλλά και λιγνίνη.

Το πρώτο στάδιο για τη βιομετατροπή λιγνινοκυτταρινούχων υλικών σε αιθανόλη είναι η προκατεργασία. Το είδος της προκατεργασίας επηρεάζει τα επόμενα στάδια βιομετατροπής. Στην παρούσα εργασία εφαρμόστηκαν δυο διαφορετικές προκατεργασίες μία χημική προκατεργασία (με άλκαλι) και μία φυσικοχημική (υδροθερμική παρουσία οξέος). Η προκατεργασία λιγνινοκυτταρινούχων υλικών με NaOH προκαλεί κυρίως απολιγνίνωση του υλικού διασπώντας τους εστερικούς δεσμούς που συνδέουν την λιγνίνη με την ημικυτταρίνη αυξάνοντας έτσι το πορώδες της βιομάζας. Στα πλαίσια της παρούσας εργασίας παρατηρήθηκε ότι η αύξηση της συγκέντρωσης του αλκάλειου στην προκατεργασία οδηγεί σε αύξηση της απώλειας στερεών και της λιγνίνης. Η περιεκτικότητα του στερεού υπολείμματος της προκατεργασίας σε λιγνίνη κυμαίνεται από 26-23% με εξάρτηση από τη συγκέντρωση του NaOH. Ειδικότερα στη μέγιστη χρησιμοποιηθείσα συγκέντρωση αλκάλειου (10%, β/β) απομακρύνεται περίπου το 30% της περιεχόμενης λιγνίνης και στις δύο συγκεντρώσεις CS (10 και 15% β/ο), τιμή όχι πολύ υψηλή συγκρινόμενη με τη βιβλιογραφία, ούτε όμως χαμηλή θα μπορούσε να χαρακτηριστεί λαμβάνοντας υπόψη τις υψηλότερες συγκεντρώσεις αλκάλειου που χρησιμοποιούνται στη βιβλιογραφία. Η ημικυτταρίνη απομακρύνεται σε μικρότερα ποσοστά (περίπου 19%). Ακολούθως ελέγχθηκε η υδροθερμική προκατεργασία παρουσία οξέος. Ο κύριος στόχος της εν λόγω προκατεργασίας είναι η διαλυτοποίηση κλάσματος ημικυτταρίνης της βιομάζας. Στην παρούσα διπλωματική η υδροθερμική προκατεργασία με 2%, β/β H₂SO₄ οδήγησε σε σχεδόν πλήρη απομάκρυνση της ημικυτταρίνης. Ένα μειονέκτημα της εν λόγω προκατεργασίας είναι ότι λόγω της παρουσίας του οξέος αυξάνονται τα προϊόντα καταστροφής των σακχάρων τα οποία στη συνέχεια δημιουργούν παρεμποδίσεις στο στάδιο της ζύμωσης.

Το στάδιο της προκατεργασίας ακολουθεί η ενζυμική υδρόλυση του προκύπτοντος στερεού. Ένας καθοριστικός παράγοντας που επηρεάζει την υδρόλυση είναι η συγκέντρωση του ενζύμου. Για να επιτευχθεί μεγάλο ποσοστό υδρόλυσης της

κυτταρίνης πρέπει να χρησιμοποιηθούν υψηλές συγκεντρώσεις ενζύμου. Το κόστος των ενζύμων όμως είναι ένας ακόμα καταλυτικός παράγοντας ώστε να καταστεί βιώσιμη μια διεργασία παραγωγής αιθανόλης. Λαμβάνοντας υπόψη τα παραπάνω μελετήθηκαν διάφορες συγκεντρώσεις ενζύμου (από 1 έως και 80 FPU/gr κυτταρίνης) ώστε να προσδιοριστεί το βέλτιστο ενζυμικό φορτίο για την υδρόλυση (α) του στερεού υπολείμματος της αλκαλικής και υδροθερμικής προκατεργασίας και (β) του υγρού και στερεού ρεύματος της υδροθερμικής προκατεργασίας. Σε όλες τις περιπτώσεις η αύξηση του ενζυμικού φορτίου οδηγεί σε αύξηση του ποσοστού υδρόλυσης της κυτταρίνης. Ειδικότερα στην περίπτωση του στερεού υπολείμματος αλκαλικής προκατεργασίας στελεχών βαμβακιού ο μέγιστος βαθμός υδρόλυσης της κυτταρίνης βρέθηκε ίσος με 74.68 %, ενώ στην περίπτωση του στερεού υπολείμματος υδροθερμικής προκατεργασίας καθώς και στην ταυτόχρονη υδρόλυση του υγρού και στερεού ρεύματος της υδροθερμικής προκατεργασίας οι τιμές ανήλθαν στο 77.17 και 45.33% αντίστοιχα στη μέγιστη χρησιμοποιηθείσα συγκέντρωση ενζύμου (80 FPU/gr κυτταρίνης). Η μελέτη της εξάρτησης του ενζυμικού φορτίου από το ποσοστό υδρόλυσης της κυτταρίνης οδήγησε σε εξίσω υπερβολικού τύπου από την οποία προκύπτει ότι πρακτικά ενζυμικά φορτία > 50 FPU/g κυτταρίνης δεν επιδρούν στην αποικοδόμηση της κυτταρίνης υπό τις συνθήκες που διεξήχθησαν τα πειράματα. Επιπλέον θα πρέπει να σημειωθεί ότι ήταν χαμηλά τα ποσοστά της ταυτόχρονης υδρόλυσης του υγρού και στερεού ρεύματος της υδροθερμικής προκατεργασίας και το γεγονός αυτό μπορεί να αποδοθεί στην ύπαρξη των παρεμποδιστικών ενώσεων στο υγρό ρεύμα της προκατεργασίας. Συγκρίνοντας τις δυο προκατεργασίες ως προς την συγκέντρωση της παραγόμενης γλυκόζης αποδείχτηκε ως πιο αποδοτική η αλκαλική προκατεργασία έναντι της υδροθερμικής (68.19 g γλυκόζης/L έναντι 53.3 g γλυκόζης/L).

Μία σημαντική παράμετρος με συνεισφορά στο συνολικό κόστος παραγωγής βιοαιθανόλης είναι η συγκέντρωση των στερεών στο στάδιο υδρόλυσης-βιομετατροπής των λιγνινοκυτταρινούχων σε αιθανόλη. Σύμφωνα με μελέτη των Hahn-Hägerdal et al., (2006) το κόστος παραγωγής βιοαιθανόλης σε διεργασία SSF είναι αντιστρόφως ανάλογο της συγκέντρωσης των στερεών στο στάδιο υδρόλυσης-βιομετατροπής (Διάγραμμα Δ55). Ουσιαστικά απαιτούνται υψηλές συγκεντρώσεις στερεών ώστε η παραγωγή αιθανόλης να ξεπεράσει το όριο του 4% (β/β), συγκέντρωση απαραίτητη προκειμένου να μειωθούν οι ενεργειακές απαιτήσεις του σταδίου της απόσταξης και να καταστήσει οικονομικότερη τη διεργασία.



Διάγραμμα Δ55. Κόστος παραγωγής αιθανόλης από ελάτη ως συνάρτηση της συγκέντρωσης στερεών στη διεργασία SSF. Δυναμικότητα 20000 DM (ξηρή μάζα) πρώτης ύλης ανά έτος. Διακεκομμένη γραμμή: χρήση μηχανικής ανασυμπίεσης ατμών στην εξάτμιση (1 SEK = \$0.13) (Hahn-Hägerdal et al., 2006).

Στα πλαίσια της παρούσας εργασίας χρησιμοποιήθηκαν υψηλές συγκεντρώσεις υποστρώματος, 15% β/ο. Σε αυτές τις συγκεντρώσεις στερεών η υδρόλυση καθίσταται δύσκολη λόγω τεχνικών δυσκολιών που οφείλονται στο υψηλό αρχικό ιξώδες των υλικών. Για το λόγο αυτό στο στάδιο της βιομετατροπής εφαρμόστηκε ένα σύντομο στάδιο προϋδρόλυσης του υλικού σε θερμοκρασία 50°C (που είναι και η βέλτιστη θερμοκρασία δράσης των κυτταρινολυτικών ενζύμων που χρησιμοποιήθηκαν) ακολούθησε μείωση της θερμοκρασίας στους 30°C και έναρξη της ζύμωσης με προσθήκη της ζύμης. Η προαναφερθείσα διεργασία ονομάζεται μη ισοθερμοκρασιακή ταυτόχρονη σακχαροποίηση και ζύμωση (NSSF). Συνδυάζει τα πλεονεκτήματα της ταυτόχρονης σακχαροποίησης και ζύμωσης (SSF) δηλαδή εξαλείφει την παρεμπόδιση από τα προϊόντα υδρόλυσης και την ανάγκη για διαφορετικούς αντιδραστήρες υδρόλυσης και ζύμωσης ενώ ταυτόχρονα άρει μερικώς το βασικό μειονέκτημα της διεργασίας SSF την ανάγκη δηλαδή συμβιβασμού των θερμοκρασιών υδρόλυσης (50°C) και ζύμωσης (30-37°C).

Η βιομετατροπή του στερεού υπολείμματος αλκαλικής και υδροθερμικής προκατεργασίας στελεχών βαμβακιού, πραγματοποιήθηκε αρχικά διατηρώντας το χρόνο προϋδρόλυσης στις 6 ώρες και μεταβάλλοντας το ενζυμικό φορτίο. Όπως και στην υδρόλυση η αύξηση του ενζυμικού φορτίου οδηγεί σε αύξηση της παραγόμενης αιθανόλης. Ειδικότερα στην περίπτωση του στερεού υπολείμματος υδροθερμικής

προκατεργασίας η μέγιστη παραγομενη αιθανόλη ανήλθε στα 15.31 g/L (10.21 g/100 g προκατεργασμένων στελεχών βαμβακιού, 44.52% της μέγιστης θεωρητικής) ενώ στην περίπτωση του στερεού υπολείμματος αλκαλικής προκατεργασίας στελεχών βαμβακιού η αιθανόλη ανήλθε στα 15.95 g/L (10.63 g/100 g προκατεργασμένων στελεχών βαμβακιού, 33.86% της μέγιστης θεωρητικής).

Η αύξηση του χρόνου προϋδρόλυσης από 6 σε 14 ώρες οδήγησε σε αύξηση της παραγόμενης αιθανόλης (21.85 g/L, 14.63 g/100 g προκατεργασμένων στελεχών βαμβακιού, 46.38% της μέγιστης θεωρητικής). Επιπλέον αυξάνοντας τη συγκέντρωση του υποστρώματος από 15 σε 20% και διατηρώντας το χρόνο προϋδρόλυσης στις 14 ώρες παρατηρήθηκε περαιτέρω αύξηση της παραγόμενης αιθανόλης (34.80 g/L, 17.40 g/100 g προκατεργασμένων στελεχών βαμβακιού, 55.40% της μέγιστης θεωρητικής).

Τα αποτελέσματα της παρούσας εργασίας συγκρινόμενα με ανάλογα της βιβλιογραφίας κρίνονται ικανοποιητικά παρότι δεν επιτεύχθηκε το προσδοκώμενο όριο του 4% (β/β) παραγόμενης αιθανόλης. Οι περαιτέρω ενέργειες που θα μπορούσαν να γίνουν για να προσεγγιστεί περισσότερο η τιμή αυτή είναι:

- (α) να αυξηθεί ακόμα περισσότερο ο χρόνος προϋδρόλυσης
- (β) να δοκιμαστεί άλλη προκατεργασία πιο φιλική προς το περιβάλλον, όπως η έκρηξη ατμού αφού η αλκαλική κυρίως προκατεργασία παρουσιάζει το πρόβλημα της διαχείρισης του αλκάλειου.
- (γ) χρήση μικτών μικροβιακών καλλιιεργειών. Μικροοργανισμών που μεταβολίζουν εξόζες με μικροοργανισμούς που μεταβολίζουν πεντόζες δεδομένου ότι το κλάσμα της ημικυτταρίνης παραμένει αναξιοποίητο. Πιο συγκεκριμένα ο μικροοργανισμός που χρησιμοποιήθηκε (*S. cerevisiae*) μεταβολίζει τις εξόζες. Θα μπορούσε λοιπόν να συνδυαστεί με ένα μικροοργανισμό που να μεταβολίζει τις πεντόζες (*Pichia stipitis*, *Kluyveromyces fragilis*).
- (δ) η εφαρμογή διεργασίας διαλείποντος έργου δηλαδή να υπάρχει τροφοδοσία του συστήματος ανά συγκεκριμένα χρονικά διαστήματα με προκατεργασμένο υλικό και να μελετηθεί η βέλτιστη συγκέντρωση υλικού που πρέπει να προστίθεται κάθε φορά.

Βιβλιογραφία

- Agblevor, F.A., Batz, S., Trumbo, J., 2003. Composition and ethanol production potential of cotton gin residues. *Appl. Biochem. Biotechnol.* 105, 219–230.
- Almeida J.R., Modig T, Petersson A., Hahn-Hägerdal B., Lidén G., Gorwa-Grauslund M.F. (2007) Increased tolerance and conversion of inhibitors in lignocellulosic hydrolysates by *Saccharomyces cerevisiae*. *J Chem Technol Biotechnol* 82:340–349.
- Alvarez-Peral F.J., Zaragoza O., Pedreno Y., Arguelles J.C. (2002) Protective role of trehalose during severe oxidative stress caused by hydrogen peroxide and the adaptive oxidative stress response in *Candida albicans*. *Microbiol* 148:2599–2606.
- Alvira P., Tomás-Pejo E., M. Ballesteros, M.J. Negro (2009). Pretreatment Technologies for an Efficient Bioethanol Production Process based on Enzymatic Hydrolysis: A Review, *Biosource Technology*, 101(13), 4851-4861.
- Arguelles J.C. (2000) Physiological roles of trehalose in bacteria and yeasts: a comparative analysis. *Arch Microbiol* 174:217–224.
- Balat M., Balat H., Öz C. Progress in bioethanol processing (2008) *Progress in Energy and Combustion Science*, 34 (5):551-573.
- Banerjee N., Bhatnagar R., Viswanathan L. (1981) Inhibition of glycolysis by furfural in *Saccharomyces cerevisiae*. *Appl Microbiol Biotechnol* 11:226–228.
- Benaroudj N., Lee D.H., Goldberg A.L. (2001) Trehalose accumulation during cellular stress protects cells and cellular proteins from damage by oxygen radicals. *J Biol Chem* 276:24261–24267.
- 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.
- Ben-Ghedalia, D., Shefet, G., 1983. Chemical treatments for increasing the digestibility of cotton straw. *J. Agric. Sci.* 100, 393–400.
- Brandberg T., Franzén C.J., Gustafsson L. (2004) The fermentation performance of nine strains of *Saccharomyces cerevisiae* in batch and fed-batch cultures in dilute-acid wood hydrolysate. *J Biosci Bioeng* 98:122–125.
- Cardona C.A., Sánchez O.J. (2007) Fuel ethanol production: Process design trends and integration opportunities. *Bioresource Technology*, 98 (12), pp. 2415-2457.
- Carere C.R., Sparling R., Cicek N., Levin D.B. (2008) Third generation biofuels via direct cellulose fermentation. *International Journal of Molecular Sciences*, 9 (7), pp. 1342-1360.
- Carvalho F., Duarte L.C., Gírio F.M. (2008) Hemicellulose biorefineries: A review on biomass pretreatments. *Journal of Scientific and Industrial Research*, 67 (11), pp. 849-864.
- Chandel A.K., Chan E.S., Rudravaram R., Narasu M. L., Rao L.W., Ravindra, P. (2007). Economics and environmental impact of bioethanol production technologies: an appraisal. *Biotechnology and Molecular Biology Review* 2 (1), 14-32
- Demirbas A., (2009) Biofuels securing the planet's future energy needs. *Energy Conversion and Management*, Volume 50, Issue 9, pp. 2239-2249.
- Dien B.S., Cotta M.A., Jeffries T.W. (2003) Bacteria engineered for fuel ethanol production: current status. *Appl Microbiol Biotechnol* 63, pp. 258–66.
- Eklund, R., Galbe, M., Zacchi, G. (1995). The influence of SO₂ and H₂SO₄ impregnation of willow prior to steam pretreatment, *Bioresource Technology*, 52(3), 225-229.

- Elmherst College. Charles E. Ophardt, Virtual Chembook: Starch Διαθέσιμο: <http://www.elmherst.edu/~chm/vchembook/547starch.html>
- Ewanick M.S., Bura R., Saddler N.J. (2007) Acid-Catalyzed Steam Pretreatment of Lodgepole Pine and Subsequent Enzymatic Hydrolysis and Fermentation to Ethanol. *Biotechnology and Bioengineering*, Vol. 98, No. 4, pp. 737-746.
- Fan, L.T., Gharpuray, M.M., Lee, Y.-H., 1987. In: *Cellulose Hydrolysis Biotechnology Monographs*. Springer, Berlin, p. 57.
- FAO, 2007. Available from: <<http://www.fao.org>>.
- Galbe M., Zacchi G. (2007) Pretreatment of lignocellulosic materials for efficient bioethanol production *Advances in Biochemical Engineering/ Biotechnology* 108, pp. 41-65.
- Ghose, T.K., 1987. Measurement of cellulase activities. *Pure Appl. Chem.* 59, 257–268.
- Grant C.M., Collinson L.P., Roe J-H., Dawes I.W. (1996) Yeast glutathione reductase is required for protection against oxidative stress and is a target gene for yAP-1 transcriptional regulation. *Mol Microbiol* 21, pp. 171–179.
- Gray K.A., Zhao L., Emptage M. (2006) Bioethanol. *Current Opinion in Chemical Biology*, 10 (2), pp. 141-146.
- Hahn-Hägerdal, B., Galbe, M., Gorwa-Grauslund, M.F., Lidén G., Zacchi, G. (2006) Bio-ethanol – the fuel of tomorrow from the residues of today. *TRENDS in Biotechnology*, 24(12), 549-556
- Hamelinck C.N., Van Hooijdonk G., Faaij A.P.C. (2005) Ethanol from lignocellulosic biomass: Techno-economic performance in short-, middle- and long-term. *Biomass and Bioenergy*, 28 (4), pp. 384-410.
- Hayes D.J (2009). An examination of biorefining processes, catalysts and challenges, *Catalysis Today*, 145(1-2), 138-151.7
- Heer D., Sauer U. (2008) Identification of furfural as a key toxin in lignocellulosic hydrolysates and evolution of a tolerant yeast strain. *Microb Biotechnol* 1, pp. 497–506
- Heeren G., Jarolim S., Laun P., Rinnerthaler M., Stolze K., Perrone G.G., Kohlwein S.D., Nohl H., Dawes I.W., Breitenbach M. (2004) The role of respiration, reactive oxygen species and oxidative stress in mother cell-specific ageing of yeast strains defective in the RAS signalling pathway. *FEMS Yeast Res* 5, pp. 157–167.
- Holtzapple, M.T., Jun, J-H., Ashok, G., Patibandla, S.L., Dale, B.E., 1991. The ammonia freeze explosion (AFEX) process: a practical lignocellulose pretreatment. *Appl. Biochem. Biotechnol.* 28/29, 59–74.
- Huang H-J., Ramaswamy S., Tschirner U.W., Ramarao B.V. (2008) A review of separation technologies in current and future biorefineries. *Sep Pur Technol* 62, pp. 1–21.
- Ioannis Dogaris, Sofia Karapati, Diomi Mamma, Emmanuel Kalogeris, Dimitris Kekos Hydrothermal processing and enzymatic hydrolysis of sorghum bagasse for fermentable carbohydrates production *Bioresource Technology* 100 (2009) 6543–6549
- Jeffries T.W., Grigoriev I.V., Grimwood J., Laplaza J.M., Aerts A., Salamov A., Schmutz J., Lindquist E., Dehal P., Shapiro H., Jin Y.S., Passoth V., Richardson P.M. (2007) Genome sequence of the lignocellulose-bioconverting and xylose-fermenting yeast *Pichia stipitis*. *Nat. Biotechnol.* 25 (3), pp. 319–326.
- Jiang W, Chang S, Li H, Oleskowicz-Popiel P, Xu J 2015. Liquid hot water pretreatment on different parts of cotton stalk to facilitate ethanol production. *Bioresource technology* 176 175-180

- Kaur U, Oberoia, H.S , Bhargav V.K, Sharma-Shivappa R, Dhaliwal S.S. 2012. Ethanol production from alkali- and ozone-treated cotton stalks using thermotolerant *Pichia kudriavzevii* HOP-1 . *Industrial Crops and Products* 37 219–226
- Kilzer, F.J., Broido, A., 1965. Speculations on the nature of cellulose pyrolysis. *Pyrolysis* 2, 151–163.
- Kumar R., Singh S., Singh O.V. (2008) Bioconversion of lignocellulosic biomass: Biochemical and molecular perspectives. *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology*, 35 (5), pp. 377-391.
- L. Viikari a, J. Vehmaanpera, A. Koivula 2012 Lignocellulosic ethanol: From science to industry biomass and bioenergy 46 13-24
- Lee S.K., Chou H., Ham T.S., Lee T.S., Keasling J.D. (2008) Metabolic engineering of microorganisms for biofuels production: from bugs to synthetic biology to fuels. *Current Opinion in Biotechnology*, 19 (6), pp. 556-563.
- Limayem, A., Ricke, S.C. (2012) Lignocellulosic biomass for bioethanol production: Current perspectives, potential issues and future prospects. *Progress in Energy and Combustion Scienc*, 38, 449-467
- Liu Z.L., Slininger P.J., Dien B.S., Berhow M.A., Kurtzman C.P., Gorsich S.W. (2004) Adaptive response of yeasts to furfural and 5-hydroxymethylfurfural and new chemical evidence for HMF conversion to 2,5-bis-hydroxymethylfuran. *J Ind Microbiol Biotechnol* 31, pp. 345–352.
- Lynd L.R., Weimer P.J., van Zyl W.H., Pretorius I.S. (2002) Microbial cellulose utilization: Fundamentals and Biotechnology. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* 66, pp. 506-577.
- Małgorzata Jaworska, Otmar Vogt, Sorbitol and cellulose derivatives as gelling agents, 2013
- Margeot, A., Hahn-Hagerdal, B., Edlund, M., Slade, R., Monot, F. (2009). New improvements for lignocellulosic ethanol. *Current Opinion in Biotechnology*, 20, 1-9
- Marie Linde, Eva-Lena Jakobsson, Mats Galbe, Guido Zacchi. Steam pretreatment of dilute H₂SO₄-impregnated wheat straw and SSF with low yeast and enzyme loadings for bioethanol production *Biomass and Bioenergy* Volume 32, Issue 4, April 2008, Pages 326–332
- 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.
- Miller, G. L. 1959. Use of Dinitro-Salicylic as Reagent for the determination of reducing sugars. *Anal. Chem.* 31, 426–428.
- Millet, M.A., Baker, A.J., Scatter, L.D., 1976. Physical and chemical pretreatment for enhancing cellulose saccharification. *Biotech. Bioeng. Symp.* 6, 125–153.
- Modig T., Lidén G., Taherzadeh M.J. (2002) Inhibition effects of furfural on alcohol dehydrogenase, aldehyde dehydrogenase and pyruvate dehydrogenase. *Biochem J* 363, pp. 769–776.
- Mosier, N., C. Wyman, B. Dale, R. Elander, Y. Y. Lee, M. Holtzapple & M. Ladisch (2005). Features of promising technologies for pretreatment of lignocellulosic biomass. *Bioresource Technology* 96(6), 673-686.
- Mussatto S.I., Roberto I.C. (2004) Alternatives for detoxification of diluted-acid lignocellulosic hydrolyzates for use in fermentative processes: a review. *Biores Technol* 93, pp. 1–10.

- Nichols N.N., Sharma L.N., Mowery R.A., Chambliss C.K., van Walsum G.P., Dien B.S., Iten L.B. (2008) Fungal metabolism of fermentation inhibitors present in corn stover dilute acid hydrolysate. *Enz Microb Technol* 42, pp. 624–630.
- Octave S., Thomas D. (2009) Biorefinery: Toward an industrial metabolism, *Biochimie*, 91 (6), Lipids for the future - from agro-resources to human health, pp. 659-664.
- Olofsson, K., Bertilsson, M., Lidén, G. (2008). A short review on SSF – an interesting process option for ethanol production from lignocellulosic feedstocks. *Biotechnology for Biofuels*, 1, 7 (available from: <http://www.biotechnologyforbiofuels.com/content/1/1/7>)
- Palmqvist E., Almeida J.S., Hahn-Hägerdal B. (1999) Influence of furfural on anaerobic glycolytic kinetics of *Saccharomyces cerevisiae* in batch culture. *Biotechnol Bioeng* 62 pp. 447–454.
- Pauly M, Keegstra K (2008) Cell wall carbohydrates and their modifications as a resource for biofuels. *The Plant Journal* 54, 559-568.
- Qing Zhao X, Zi L. H, Bai F.W, Lin H.L , Hao X.M,
- Renu Singh a, Ashish Shukla b,n, Sapna Tiwari a, Monika Srivastava (2014). A review on delignification of lignocellulosic biomass for enhancement of ethanol production potential *Renewable and Sustainable Energy Reviews* 32, 713–728.
- Reshamwala, S., Shawky, B.T., Dale, B.E., 1995. Ethanol production from enzymatic hydrolysates of AFEX-treated coastal Bermuda grass and switchgrass. *Appl. Biochem. Biotechnol.* 51/52, 43–55.
- Rob Vierhout, ePURE, Renewable ethanol :driving jobs, growth and innovation throughout Europe, state of the industry report 2014
- Saha B.C, Iten L.B, Cotta M.A, Y. Victor Wu 2005 Dilute acid pretreatment, enzymatic saccharification and fermentation of wheat straw to ethanol. *Process Biochemistry* 40 3693-3700
- Sánchez O.J., Cardona C.A. (2008) Trends in biotechnological production of fuel ethanol from different feedstocks. *Bioresource Technology* 99 (13), pp. 5270-5295.
- Segal, L., Creely, J.J., Martin, A.E., Conrad, C.M., 1959. An empirical method for estimation the degree of crystallinity of native cellulose using the X-ray diffractometer. *Text. Res J.* 29 (10), 786–794.
- Shafizadeh, F., Bradbury, A.G.W., 1979. Thermal degradation of cellulose in air and nitrogen at low temperatures. *J. Appl. Poly. Sci.* 23, 1431–1442
- Shafizadeh, F., Lai, Y.-Z., 1975. Thermal degradation of 2-deoxy-Darabino-hexonic acid and 3-deoxy-D-ribo-hexono-1,4-lactone. *Carbohyd.Res.* 42, 39–53.
- Sigler K., Chaloupka J., Brozmanová J., Stadler N., Höfer M. (1999) Oxidative stress in microorganisms-I. *Folia Microbiol* 44 pp. 587–624.
- Sluiter, A., Hames, B., Ruiz, R., Scarlata, C., Sluiter, J., Templeton, D., Crocker, D.: Determination of structural carbohydrates and lignin in biomass. Technical report NREL/TP-510- 42618 (2012)
- Sun Y., Cheng J. (2002) Hydrolysis of lignocellulosic materials for ethanol production: A review. *Bioresource Technology*, 83 (1), pp. 1-11.
- Taherzadeh M.J., Gustafsson L., Niklasson C., Lidén G. (2000) Physiological effects of 5-hydroxymethylfurfural on *Saccharomyces cerevisiae*. *Appl Microbiol Biotechnol* 53, pp. 701–708.
- Taherzadeh M.J., Karimi K. (2008) Pretreatment of lignocellulosic wastes to improve ethanol and biogas production: A review. *Int. J. Mol. Sci.* 9, pp. 1621-1651.
- Thomsen M.H., Thygesen A., Thomsen A.B. (2009) Identification and characterization of fermentation inhibitors formed during hydrothermal treatment

- and following SSF of wheat straw. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 83 (3), pp. 447-455.
- Tomás-Pejó E., Oliva J.M., Ballesteros M. (2008) Realistic approach for full-scale bioethanol production from lignocellulose: A review. *Journal of Scientific and Industrial Research*, 67(11), pp. 874-84.
- Vidal, P.F., Molinier, J., 1988. Ozonolysis of lignin – improvement of in vitro digestibility of poplar sawdust. *Biomass* 16, 1–17
- Vlasenko, E.Y., Ding, H., Labavitch, J.M., Shoemaker, S.P., 1997. Enzymatic hydrolysis of pretreated rice straw. *Bioresour. Technol.* 59, 109–119.
- Wei H., Xu Q., Taylor II L.E., Baker J.O., Tucker M.P., Ding S.-Y. (2009) Natural paradigms of plant cell wall degradation. *Current Opinion in Biotechnology*, 20 (3), pp. 330-338.
- www.biomassenergy.gr
- Xu, Q., Singh, A., Himmel, M.E. (2009) Perspectives and new directions for the production of bioethanol using consolidated bioprocessing of lignocellulose. *Current Opinion in Biotechnology* 20 (3), pp. 364-371.
- Ye Sun, Jiayang Cheng (2002): Hydrolysis of lignocellulosic materials for ethanol production: a review. *Bioresource Technology* 83, 1-11
- Yu Z, Zhang H 2003 Pretreatments of cellulose pyrolysate for ethanol production by *Saccharomyces cerevisiae*, *Pichia* sp. YZ-1 and *Zymomonas mobilis*. *Biomass and bioenergy* 24, 257-262
- Yue G.J and Nancy W. Y. Ho, (2012). Bioethanol from Lignocellulosic Biomass, 2011 *Biochem Engin/Biotechnol* 128: 25–51
- Zaldivar J., Nielsen J., Olsson L. (2001) Fuel ethanol production by *Zymomonas mobilis*. *Adv Biochem Bioeng.* 23, pp. 37–84.
- Αυγουλάς, Ε.Χ., 1995. Το βαμβάκι και η καλλιέργειά του. Σημειώσεις Γεωπονικού Πανεπιστημίου Αθηνών.