



ΕΘΝΙΚΟ ΜΕΤΣΟΒΙΟ ΠΟΛΥΤΕΧΝΕΙΟ

ΣΧΟΛΗ ΧΗΜΙΚΩΝ ΜΗΧΑΝΙΚΩΝ

ΤΟΜΕΑΣ ΣΥΝΘΕΣΗΣ ΚΑΙ ΑΝΑΠΤΥΞΗΣ

ΒΙΟΜΗΧΑΝΙΚΩΝ ΔΙΑΔΙΚΑΣΙΩΝ

ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΟ ΒΙΟΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑΣ

**ΜΕΛΕΤΗ ΤΗΣ ΥΔΡΟΘΕΡΜΙΚΗΣ
ΠΡΟΚΑΤΕΡΓΑΣΙΑΣ ΣΤΕΛΕΧΩΝ
ΑΡΑΒΟΣΙΤΟΥ ΓΙΑ ΤΗΝ ΠΑΡΑΓΩΓΗ
ΒΙΟΑΙΘΑΝΟΛΗΣ**



Αντώνιος Χ. Κοτσοβόλης

Αθήνα, Σεπτέμβριος 2015

Επιβλέπων: Επ. Καθηγητής Τόπακας Ε.

Περιεχόμενα

Ευχαριστίες.....	4
Abstract	5
Περίληψη.....	6
1 ΘΕΩΡΗΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ.....	8
1.1 Βιοκαύσιμα και λιγνινοκυτταρινούχες πρώτες ύλες	8
1.1.1 Εισαγωγή.....	8
1.1.1.1 Περιβαλλοντολογικά Προβλήματα.....	8
1.1.1.2 Βιοκαύσιμα.....	9
1.1.1.3 Βιοαιθανόλη ως καύσιμο και η παγκόσμια παραγωγή.....	12
1.2 Παραγωγή Βιοαιθανόλης	21
1.2.1 Γενικά.....	21
1.2.2 Παραγωγή βιοαιθανόλης από λιγνινοκυτταρινούχο βιομάζα	22
1.3 Υδρόλυση της λιγνινοκυτταρίνης.....	23
1.3.1 Προκατεργασία	23
1.3.1.1 Μέθοδοι Προκατεργασίας.....	24
1.3.2 Όξινη υδρόλυση	29
1.3.3 Ενζυμική υδρόλυση.....	29
1.3.3.1 Γενικά.....	29
1.3.3.2 Παράγοντες που επηρεάζουν την ενζυμική υδρόλυση.....	31
1.4 Διεργασίες παραγωγής βιοαιθανόλης.....	31
1.5 Μικροβιακή Βιομετατροπή λιγνινοκυτταρινούχων υλικών	32
1.5.1 Μικροοργανισμοί στην παραγωγή βιοαιθανόλης	32
1.5.2 Μικροοργανισμοί στην παραγωγή ενζύμων	34
1.5.3 Μικροοργανισμοί για ενοποιημένες βιοδιεργασίες (CPB).....	35
1.5.4 Γενετική Μηχανική Μικροοργανισμών	36
1.6 Παραγόμενοι παρεμποδιστές.....	37
1.7 Οικονομικά στοιχεία παραγωγής βιοαιθανόλης.....	40

2	Υλικά και Μέθοδοι.....	43
2.1	Μικροοργανισμός.....	43
2.2	Πρώτες ύλες και χημικά αντιδραστήρια.....	43
2.3	Όργανα	44
2.4	Υδροθερμική προκατεργασία Στελεχών Αραβόσιτου.....	45
2.5	Υδρόλυση Στελεχών Αραβόσιτου.....	46
2.6	Μέτρηση αναγωγικών σακχάρων με τη μέθοδο DNS.....	46
2.7	Μέτρηση γλυκόζης.....	47
2.8	Ανάλυση στερεού υπολείμματος – Μέθοδος NREL.....	47
2.9	Μέτρηση ενεργότητας ενζύμων	48
2.10	Αναλύσεις για τον προσδιορισμό αιθανόλης και σακχάρων	48
2.11	RSM (Response Surface Methodology).....	48
2.12	Ηλεκτρονικό Μικροσκόπιο Σάρωση (SEM: Scanning Electron Microscopy).....	49
2.13	Σακχαροποίηση προκατεργασμένων Στελεχών Αραβόσιτου.....	49
2.14	Ζύμωση.....	50
3	Αποτελέσματα	51
3.1	Σύσταση Στελεχών Αραβόσιτου.....	51
3.2	Βελτιστοποίηση Υδροθερμικής Προκατεργασίας.....	51
3.3	Μεθοδολογία Αποκριτικών Επιφανειών (RSM).....	51
3.4	Μορφολογική Ανάλυση Στελέχους Αραβόσιτου ύστερα από επεξεργασία Σάρωσης Ηλεκτρονικού Μικροσκοπίου.....	57
3.5	Ενζυμική Υδρόλυση.....	59
3.6	Παραγωγή Βιοαιθανόλης.....	74
4	Συμπεράσματα.....	78
	Βιβλιογραφία.....	80

Ευχαριστίες

Θα ήθελα να εκφράσω τις θερμές μου ευχαριστίες στον Επίκουρο καθηγητή του ΕΜΠ κ. Ε. Τόπακα για την εμπιστοσύνη που μου έδειξε αναθέτοντάς μου την εργασία αυτή και για την πολύτιμη καθοδήγηση που μου παρείχε σε όλη τη διάρκεια εκπόνησης της.

Ιδιαίτερες ευχαριστίες οφείλω και στον Υ.Δ. Κ. Κατσίμπουρα για τη βοήθειά του στην πραγματοποίηση των πειραμάτων, τις επιστημονικές του συμβουλές και για την υπέρμετρη βοήθειά του στη διεκπεραίωση της διπλωματικής μου εργασίας.

Abstract

The present thesis was carried out in the Laboratory of Biotechnology, in the School of Chemical Engineering of the National Technical University of Athens. The subject was the study and optimization of the conditions of hydrothermal pretreatment of corn stover (CS) and the enzymatic hydrolysis of the pretreated material. As a byproduct of corn production, corn stover is a low-cost agricultural residue that is available in large quantities representing a potential feedstock for second-generation biofuel production. Firstly, the CS was treated hydrothermally in various operational conditions, where the time of treatment ranged from 9 to 51 minutes and the temperature was adjusted between 170 and 230 °C. The conditions of treatment were determined based on the RSM where the relationship between the temperature and the time of treatment was investigated. Afterwards, the hydrolysis of the pretreated CS with the use of the commercial enzyme mixture Celluclast[®] 1.5L and Novozyme 188 at ratio 5:1 v/v (total cellulase activity 10 FPU/g CS) and for solids concentration equal to 3% w/v, was performed. The model, which was derived from the experiments, showed that the optimal conditions of pretreatment that lead to the maximum glucose release is 230 °C and 15 min with a maximum predicted glucose release of 7.71 g/L which is very close to the experimental value of 7.96 g/L. This pair of values was close to those of run #2 (220 °C and 15 min) where glucose release found to be 7.55 g/L. Finally, the ability of the hydrothermally pretreated CS to produce ethanol by implementing processes of SSF (Simultaneous Saccharification and Fermentation) with pre-hydrolysis was investigated. The optimum enzymatic load was investigated to achieve a sufficient amount of the product considering its production's cost. 9 mg/g DM enzymatic load was found to be the best solution because it can produce such an ethanol amount while the cost is the lowest it can be. It was calculated that additional amount of enzyme, nevertheless, contributed to the increase of the ethanol concentration since the produced ethanol was increased from 14,74 g/L (for 9 mg/g DM enzymatic load) to 15,07 g/L (12 mg/g DM enzymatic load) (2,2% increase) but not enough to balance the enzyme cost. For that reason, 9 mg/g DM enzymatic load was the optimum choice for ethanol production.

Περίληψη

Η παρούσα διπλωματική εργασία πραγματοποιήθηκε στο Εργαστήριο Βιοτεχνολογίας της Σχολής Χημικών Μηχανικών του Εθνικού Μετσόβιου Πολυτεχνείου.

Ο σκοπός της παρούσας διπλωματικής είναι η μελέτη και η βελτιστοποίηση των συνθηκών υδροθερμικής προκατεργασίας Στελεχών Αραβόσιτου (Σ.Α.) και η ενζυμική υδρόλυση του προκατεργασμένου υλικού. Τα Σ.Α. θεωρούνται εξαιρετικές πρώτες ύλες για την παραγωγή βιοαιθανόλης, λόγω των υψηλών αποδόσεων τους σε βιομάζα και για το λόγο του ότι βρίσκονται σε μεγάλες ποσότητες χαμηλής γεωργικής αξίας μιας και τα στελέχη αποτελούνται από υπολείμματα του αραβόσιτου, που το καθιστά σημαντικό λόγο για παραγωγή βιοκαυσίμων δευτερης γενιάς.

Αρχικά, τα Σ.Α. υπέστησαν υδροθερμική προκατεργασία σε ένα πλήθος από διαφορετικές συνθήκες λειτουργίας, όπου ο χρόνος προκατεργασίας κυμάνθηκε μεταξύ 9 και 51 min και η θερμοκρασία ρυθμίστηκε σε τιμές μεταξύ 170 και 230 °C. Οι συνθήκες της προκατεργασίας προσδιορίστηκαν με βάση τη μεθοδολογία αποκριτικών επιφανειών (RSM) όπου διερευνήθηκε σχέση μεταξύ θερμοκρασίας και χρόνου προκατεργασίας καθώς και ο τρόπος κατά τον οποίο αυτή η μεταξύ τους αλληλεπίδραση επηρεάζει την επιθυμητή απόκριση.

Ακολούθησε υδρόλυση της προκατεργασμένων Σ.Α. με χρήση μίγματος των εμπορικών ενζυμικών σκευασμάτων Celluclast[®] 1.5L και Novozyme 188 σε αναλογίες 5:1 v/v (ενεργότητα ολικής κυτταρινάσης 10 FPU/g Σ.Α.) και για συγκέντρωση στερεών 3% w/v. Το μοντέλο που προέκυψε από τα πειράματα, δείχνει ότι οι βέλτιστες συνθήκες προκατεργασίας προκειμένου να επιτευχθεί η μέγιστη απελευθέρωση γλυκόζης ήταν 230 °C και 15 min με μέγιστη προβλεπόμενη απελευθερούμενη γλυκόζη ίση με 7.71 g/L η οποία είναι πολύ κοντά στην πειραματική τιμή των 7.96 g/L. Αυτό το ζεύγος τιμών πλησιάζει τις τιμές της δοκιμής #2 (220 °C και 15 min) όπου το ποσοστό της απελευθερούμενης γλυκόζης βρέθηκε να είναι 7.55 g/L.

Τέλος, μελετήθηκε η ικανότητα παραγωγής αιθανόλης από τα υδροθερμικά προκατεργασμένα Σ.Α. εφαρμόζοντας τη διεργασία ταυτόχρονης σακχαροποίησης και ζύμωσης, SSF (Simultaneous Saccharification and Fermentation) με

προϋδρόλυση. Προσδιορίστηκε η ιδανική ποσότητα ενζυμικού φορτίου (Ε.Φ) για τη βέλτιστη παραγωγή βιοαιθανόλης με ταυτόχρονο μειωμένο κόστος. Βρέθηκαν ότι τα 9 mg/g ξ.β Ε.Φ είναι η βέλτιστη ποσότητα που απαιτείται για να επιτευχθεί η ισορροπία μεταξύ ικανοποιητικής ποσότητας προϊόντος και του κόστους παραγωγής της. Προσδιορίστηκε ότι η προσθήκη επιπλέον ποσότητας ενζύμων συντέλεσε στην αύξηση της συγκέντρωσης αιθανόλης, καθώς η παραγόμενη αιθανόλη αυξήθηκε από 14,74 g/L (9 mg/g ξ.β Ε.Φ) σε 15,07 g/L (12 mg/g ξ.β Ε.Φ) με ποσοστό δηλαδή κατά 2,2%. Για το λόγο του ότι αυτή η μικρή αύξηση στην παραγωγή δεν δικαιολογεί την αύξηση του ολικού κόστους της διεργασίας, επιλέγεται η χρήση 9 mg/g ξ.β Ε.Φ για την παραγωγή του προϊόντος.

1 ΘΕΩΡΗΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ

1.1 Βιοκαύσιμα και λιγνινοκυτταρινούχες πρώτες ύλες

1.1.1 Εισαγωγή

1.1.1.1 Περιβαλλοντολογικά προβλήματα

Τους τελευταίους αιώνες έχει αλλάξει ριζικά η σχέση μεταξύ του ανθρώπου και του περιβάλλοντος. Σ' αυτό ευθύνεται η ανάπτυξη της τεχνολογίας. Η αφειδής χρήση των μη ανανεώσιμων πηγών ενέργειας και τα παραγόμενα απόβλητα δεν μπορούν να αφομοιωθούν και έτσι συσσωρεύονται με τη μορφή διαφόρων ειδών ρύπανσης. Τα αυξανόμενα περιβαλλοντικά προβλήματα δεν έγιναν κατανοητά ούτε τον προηγούμενο αιώνα που το περιβάλλον θεωρούνταν ανεξάντλητος πόρος για την ικανοποίηση των ανθρώπινων αναγκών. Το αποτέλεσμα αυτό είναι οι αρνητικές συνέπειες και η εμφάνιση οικολογικής κρίσης. Βασικές αιτίες αυτής της κρίσης είναι (Αθανασάκης και Κουσούρης, 1999):

1. οι μέθοδοι της βιομηχανικής παραγωγής
2. η τεχνοκρατική αντίληψη για την ανάπτυξη της βιομηχανικής, οικονομικής και τουριστικής ανάπτυξης εις βάρος των φυσικών πόρων της Γης
3. ο υπερκαταναλωτισμός και
4. η αστυφιλία

Επιπλέον μπορούν να αριθμηθούν και άλλα περιβαλλοντικά, οικολογικά ζητήματα που βρίσκονται στο στάδιο της έρευνας. Αυτά είναι (Αθανασάκης και Κουσούρης, 1999):

- το φαινόμενο του θερμοκηπίου
- η τρύπα του όζοντος
- η όξινη βροχή
- η ατμοσφαιρική ρύπανση
- η ηχορύπανση
- η καταστροφή του εδάφους
- τα οικιακά απορρίμματα
- τα φυτοφάρμακα

- τα ραδιενεργά κατάλοιπα
- η τουριστική ανάπτυξη
- η ποικιλότητα του οργανικού κόσμου στην ελληνική φύση

Εξαιτίας των παραπάνω λόγων έχουν στραφεί οι επιστήμονες, οι κυβερνήσεις καθώς και ιδιώτες στην ανάπτυξη και υιοθέτηση εφαρμογών και καινοτομιών που ενσωματώνουν πιο «φιλικές προς το περιβάλλον» πηγές ενέργειας. Επειδή οι προκλήσεις αυξάνονται καθημερινά, έχει διαμορφωθεί ένα πλαίσιο πρωτοβουλιών και πολιτικών θέτοντας συγκεκριμένες προτεραιότητες ώστε να διασφαλιστεί η βιωσιμότητα των ενεργειακών πόρων (Ress, 1998).

Στο πλαίσιο αυτό η αξιοποίηση των Ανανεώσιμων και Εναλλακτικών Βιώσιμων Πηγών Ενέργειας (ηλιακή, αιολική, θαλάσσια, υδραυλική, βιομάζα, γεωθερμική) σε συνδυασμό με την προσπάθεια για την εξοικονόμηση ενέργειας είναι άρρηκτα συνδεδεμένη με θετικά αποτελέσματα για το περιβάλλον, την οικονομία, τον τουρισμό, τον πολιτισμό και την ποιότητα ζωής των κατοίκων γενικότερα. Οι Ανανεώσιμες Πηγές Ενέργειας και οι πρακτικές Εξοικονόμησης Ενέργειας πρέπει να συμμετέχουν σήμερα περισσότερο από ποτέ στον ενεργειακό σχεδιασμό όλων των χωρών και των αναπτυγμένων και των αναπτυσσόμενων αλλά και του τρίτου κόσμου, ενώ η ανάπτυξη Βιώσιμων Ενεργειακών Σχεδίων και Μέτρων πρέπει να αποτελούν βασικό στόχο όλων των εμπλεκόμενων φορέων, σε τοπικό, περιφερειακό, ευρωπαϊκό και παγκόσμιο επίπεδο. Τα μέτρα αυτά είναι η χρήση ανανεώσιμων μορφών ενέργειας (κυρίως ηλιακής και αιολικής) αντί των ορυκτών καυσίμων καθώς και η εξοικονόμηση ενέργειας αυτή καθ' αυτή. (Φλογαίτη, 1993)

1.1.1.2 Βιοκαύσιμα

Τα ορυκτά καύσιμα (πετρέλαιο, φυσικό αέριο, γαιάνθρακας) συνεισφέρουν στο 80% περίπου της συνολικής παγκόσμιας παραγωγής ενέργειας (Goldemberg & Johansson 2004; Goldemberg, 2007). Ανάλογα με τους ρυθμούς παραγωγής και κατανάλωσης, τα σημερινά αποθέματα των ορυκτών καυσίμων εκτιμάται ότι θα διαρκέσουν από 41 έως 700 χρόνια (Goldemberg & Johansson 2004; Goldemberg, 2007). Η αναπόφευκτη εξάντληση των παραπάνω αποθεμάτων, η ανησυχία για ενεργειακή ασφάλεια και η ανάγκη αντίδρασης στην κλιματική αλλαγή έχουν οδηγήσει σε αυξανόμενο ενδιαφέρον για εναλλακτικές πηγές ενέργειας, όπως τα βιοκαύσιμα (Lin

& Tanaka 2006; Chandel *et al.*, 2007; Blottnitz & Curran 2007; Reijnders & Huijbregts 2007; Sánchez & Cardona 2008; Agarwal 2008; Koh & Ghazoul 2008; Balat *et al.*, 2008; Festel 2008; Demirbas 2009).

Σύμφωνα με την οδηγία 2003/30/EC της Ευρωπαϊκής Επιτροπής ως ‘‘βιοκαύσιμο’’ ορίζεται το υγρό ή αέριο μίγμα για τις μεταφορές το οποίο παράγεται από βιομάζα. Πολλές χώρες αρχίζουν να υποστηρίζουν τα βιοκαύσιμα ως στρατηγική, αφενός για τη μείωση της εξάρτησής τους από το πετρέλαιο και αφετέρου για την ελάττωση των εκπομπών των αερίων του φαινομένου του θερμοκηπίου (Fulton *et al.*, 2004; Bothast & Schlicher 2005; Armbruster & Coyle 2006; Pickett *et al.*, 2008; Agarwal 2008; Saxena *et al.*, 2009). Μεταξύ του 1980 και 2005 η παγκόσμια ετήσια παραγωγή βιοκαυσίμων παρουσίασε εξαιρετική αύξηση, από 4.4 σε 50.1 δις λίτρα (Murray 2005; Armbruster & Coyle 2006).

Παρ’ όλα αυτά η υποστήριξη της ανάπτυξης των βιοκαυσίμων σε πολλά κράτη ήρθε αντιμέτωπη με ανησυχίες για το περιβάλλον και την επάρκεια των τροφίμων καθώς και με κάποιες πρόσφατες αναφορές που αμφισβητούν τη μείωση των εκπομπών αερίων του φαινομένου του θερμοκηπίου που μπορεί να επιφέρει η αξιοποίηση των βιοκαυσίμων (Reijnders & Huijbregts 2007; Wyman 2007; Koh & Ghazoul 2008; Cockerill & Martin 2008). Η αλλαγή χρήσης των γεωργικών εκτάσεων για ενεργειακές καλλιέργειες ευθύνεται κατά ένα ποσοστό για την παγκόσμια έλλειψη τροφής και έχει συσχετιστεί με τις αυξανόμενες τιμές βασικών προϊόντων διατροφής, όπως είναι ο αραβόσιτος και το ρύζι (James *et al.*, 2008; Jossierand 2008; Rahman *et al.*, 2008; Sarath *et al.*, 2008). Πολλές έρευνες αναφέρουν ότι ορισμένες διαδικασίες παραγωγής βιοκαυσίμων μπορεί εν τέλει να οδηγήσουν σε επιπλέον έκλυση αερίων του φαινομένου του θερμοκηπίου ή απαιτούν πολλά χρόνια για την απόσβεση του προστιθέμενου CO₂ (Crutzen *et al.*, 2008; Fargione *et al.*, 2008; Scharlemann & Laurance 2008; Searchinger *et al.*, 2008; Cockerill & Martin 2008).

Καλό είναι να αναφερθεί ότι πολλοί πολιτικοί και επιστήμονες εκφράζουν με αισιοδοξία ότι με την ανάπτυξη και αξιοποίηση των βιοκαυσίμων ‘‘2^{ης} γενιάς’’, όπως η βιοαιθανόλη από λιγνινοκυτταρινούχες πρώτες ύλες, θα ικανοποιηθούν αρκετές από τις παγκόσμιες ενεργειακές ανάγκες. Τα τελευταία χρόνια η τεχνολογία παραγωγής βιοαιθανόλης από γεωργικά-λιγνινοκυτταρινούχα υπολείμματα έχει αναπτυχθεί σε τέτοιο βαθμό ώστε σε μερικά χρόνια να αποτελέσει πραγματικότητα η παραγωγή σε

βιομηχανική κλίμακα (Lin & Tanaka 2006; Farrell *et al.*, 2006; Ragauskas *et al.*, 2006; Chandel *et al.*, 2007; Wyman 2007; Field *et al.*, 2008; Agarwal 2008; Balat *et al.*, 2008; Demain 2009).

Τέλος, αναφέρονται ορισμένα παραδείγματα προϊόντων που θεωρούνται βιοκαύσιμα (Ευρωπαϊκή Επιτροπή, 2003):

- **“βιοαιθανόλης”**: αιθανόλη η οποία παράγεται από βιομάζα ή/και από το βιοαποικοδομήσιμο κλάσμα απόβλητων, για χρήση ως βιοκαύσιμο.
- **“βιο-diesel βιολογικής προέλευσης”**: μεθυλεστέρας ο οποίος παράγεται από φυτικά ή ζωικά έλαια, ποιότητα ντίζελ για χρήση ως βιοκαύσιμο.
- **“βιοαέριο”**: αέριο καύσιμο που παράγεται από βιομάζα ή/και από το βιοαποικοδομήσιμο κλάσμα αποβλήτων, το οποίο μπορεί να καθαριστεί φτάνοντας την ποιότητα του φυσικού αερίου, για χρήση ως βιοκαύσιμο ή ξυλαέριο.
- **“βιομεθανόλη”**: μεθανόλη η οποία παράγεται από βιομάζα, για χρήση ως βιοκαύσιμο.
- **“βιοδιμεθυλεστέρας”**: διμεθυλεστέρας ο οποίος παράγεται από βιομάζα, για χρήση ως βιοκαύσιμο
- **“βιο-ETBE (αιθυλοτριτοβουτυλαιθέρας)”**: ETBE ο οποίος παράγεται από βιοαιθανόλη.
- **“βιο-MTBE (μεθυλοτριτοβουτυλαιθέρας)”**: καύσιμο το οποίο παράγεται από βιομεθανόλη.
- **“συνθετικά βιοκαύσιμα”**: συνθετικοί υδρογονάνθρακες ή μίγματα συνθετικών υδρογονανθράκων που έχουν παραχθεί από βιομάζα.
- **“βιοϋδρογόνο”**: υδρογόνο το οποίο παράγεται από βιομάζα ή/και από το βιοαποικοδομήσιμο κλάσμα αποβλήτων για χρήση ως βιοκαύσιμο.
- **“καθαρά φυτικά έλαια”**: έλαια από ελαιούχα φυτά, παραγόμενα με συμπίεση, έκθλιψη ή ανάλογες μεθόδους, φυσικά ή εξευγενισμένα αλλά μη χημικώς τροποποιημένα, όταν είναι συμβατά με τον τύπο του οικείου κινητήρα και τις αντίστοιχες προϋποθέσεις όσον αφορά τις εκπομπές.

1.1.1.3 Βιοαιθανόλη ως καύσιμο και η παγκόσμια παραγωγή

Η βιοαιθανόλη κατέχει την πρώτη θέση στην παγκόσμια παραγωγή βιοκαυσίμων (Sánchez & Cardona 2008; Koh & Ghazoul 2008). Οι ιδιότητες της αιθανόλης την καθιστούν ένα σημαντικό εναλλακτικό καύσιμο για τον τομέα των μεταφορών. Έχει υψηλότερο βαθμό οκτανίων από τη βενζίνη, αντέχει μεγαλύτερους λόγους συμπίεσης αποδίδοντας έτσι περισσότερη ισχύ πιο οικονομικά. Η καύση της αιθανόλης είναι πιο καθαρή από αυτή της βενζίνης, με μειωμένες εκπομπές CO, NO_x και μικροσωματιδίων (Kim & Dale 2005; Gnansounou *et al.*, 2005; Balat 2007; Saxena *et al.*, 2009). Παρ' όλα αυτά η αιθανόλη έχει χαμηλότερη πυκνότητα από τη βενζίνη (περιέχει το 66% της ενέργειας της βενζίνης), χαμηλότερη τάση ατμών και η καύση της οδηγεί σε αυξημένη παραγωγή αλδευδών, οι οποίες συνεισφέρουν στο σχηματισμό του φωτοχημικού νέφους (Balat *et al.*, 2008; Agarwal 2008).

Η αιθανόλη αποδίδει πολύ καλά ως καύσιμο στα αυτοκίνητα, είτε σε καθαρή μορφή είτε ως μίγμα με βενζίνη. Τα μίγματα της βιοαιθανόλης κωδικοποιούνται συνδυάζοντας το γράμμα "E" (Ethanol) με το ποσοστό της βιοαιθανόλης και τα πιο συνηθισμένα είναι τα E85 (85% αιθανόλη-15% βενζίνη) και E10 (10% αιθανόλη-90% βενζίνη). Υπάρχουν επίσης το E100 (100% αιθανόλη) και το oxy-diesel, ένα μίγμα από 80% diesel, 10% αιθανόλη και 10% πρόσθετα και ενώσεις ανάμιξης (Demirbas 2005; Gnansounou *et al.*, 2005; Balat *et al.*, 2008; Carere *et al.*, 2008).

Εκτός από τις μηχανές εσωτερικής καύσης, η αιθανόλη μπορεί να χρησιμοποιηθεί και σε κυψέλες καυσίμων (fuel cells) με υψηλές ενεργειακές αποδόσεις και χαμηλές εκπομπές ρύπων. Για την ανάπτυξη και εμπορική εφαρμογή των πολλά υποσχόμενων κυψελών καυσίμων αιθανόλης απαιτείται ακόμα αρκετή έρευνα (Gnansounou *et al.*, 2005).

Οι μεγαλύτεροι παραγωγοί βιοαιθανόλης είναι οι ΗΠΑ (18 δις λίτρα το 2006), η Βραζιλία (17 δις λίτρα το 2006) και η Κίνα (3.8 δις λίτρα το 2006). Η βιοαιθανόλη παράγεται στη Βραζιλία από σακχαροκάλαμο ενώ στις ΗΠΑ από αραβόσιτο (Lin & Tanaka 2006; Sánchez & Cardona 2008; Koh & Ghazoul 2008; Balat *et al.*, 2008; Demirbas 2009). Στην Ευρωπαϊκή Ένωση η παραγωγή της βιοαιθανόλης συνολικά έχει φτάσει τα 10 δις λίτρα. Στην Ευρώπη οι κύριες πηγές βιοαιθανόλης είναι το

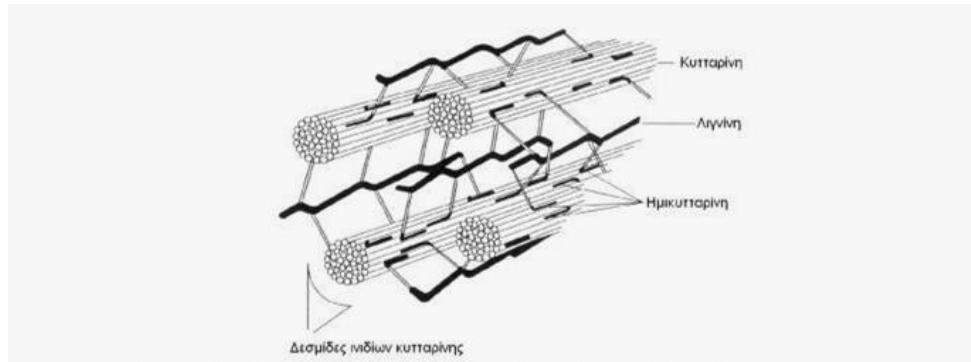
σιτάρι, το σακχαρότευτλο καθώς και υπολείμματα βιομηχανίας οίνου (Balat *et al.*, 2008; Demirbas 2009).

Λιγνινοκυτταρινούχες πρώτες ύλες

Η διαθεσιμότητα των πρώτων υλών αποτελεί μείζον θέμα για την παραγωγή βιοαιθανόλης. Οι πρώτες ύλες ποικίλλουν σημαντικά από εποχή σε εποχή και εξαρτώνται από την γεωγραφική τοποθεσία. Οι συχνές μεταβολές στην τιμή των πρώτων υλών επηρεάζουν και το κόστος παραγωγής της βιοαιθανόλης, καθώς το κόστος των πρώτων υλών αποτελεί το 1/3 του συνολικού κόστους παραγωγής (Tomás-Pejó *et al.*, 2008; Kumar *et al.*, 2008; Balat *et al.*, 2008; Olofsson *et al.*, 2008).

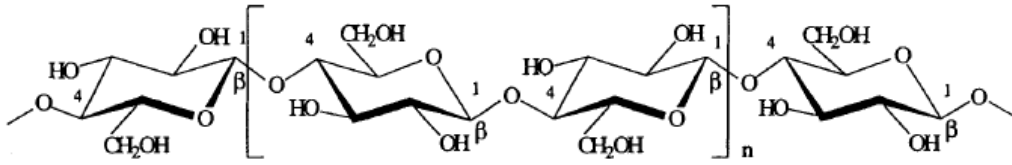
Οι φυτικές πηγές που παρέχουν σάκχαρα για την παραγωγή βιοαιθανόλης κατηγοριοποιούνται με βάση τη σύστασή τους σε: (α) **σακχαρούχες**, (όπως σακχαροκάλαμο και σακχαρότευτλο), (β) **αμυλούχες** (όπως σίτος, αραβόσιτος και κριθάρι) και (γ) **λιγνινοκυτταρινούχες** (Demirbas 2005; Sánchez & Cardona 2008; Balat *et al.*, 2008; Tomás-Pejó *et al.*, 2008). Στις λιγνινοκυτταρινούχες φυτικές πηγές ανήκουν τα υπολείμματα της υλοτομίας, της γεωργίας, της βιομηχανίας τροφίμων, τα αστικά στερεά λύματα καθώς και οι ενεργειακές καλλιέργειες (Gnansounou *et al.*, 2005; Lin & Tanaka 2006; Koh & Ghazoul 2008; Sánchez & Cardona 2008; Saxena *et al.*, 2009; Demain 2009).

Οι λιγνινοκυτταρινούχες πρώτες ύλες αποτελούν τον πιο άφθονο, ανανεώσιμο και φθηνό φυσικό πόρο σε ολόκληρο τον πλανήτη. Αποτελούν το 50% της παγκόσμιας βιομάζας. Η λιγνινοκυτταρινούχα βιομάζα αποτελεί σημαντική εναλλακτική πηγή για την παραγωγή “2^{ης} γενιάς” βιοαιθανόλης διότι δεν ανταγωνίζεται τη βιομηχανία τροφίμων και είναι αρκετά πιο φθηνή από τις συμβατικές σακχαρούχες-αμυλούχες πρώτες ύλες (Chandel *et al.*, 2007; Cardona & Sánchez 2007; Balat *et al.*, 2008; Kumar *et al.*, 2008; Sánchez & Cardona 2008; Tomás-Pejó *et al.*, 2008; Demain 2009). Ο βασικός παράγοντας που περιορίζει την εκμετάλλευση των λιγνινοκυτταρινούχων υλικών για παραγωγή βιοαιθανόλης σε βιομηχανική κλίμακα είναι ο υψηλός βαθμός πολυπλοκότητας της δομής (**Σχήμα 1.1**) και επεξεργασίας αυτών των υλικών (Lynd *et al.*, 2005; Cardona & Sánchez 2007; Sánchez & Cardona 2008; Kumar *et al.*, 2008; Olofsson *et al.*, 2008).

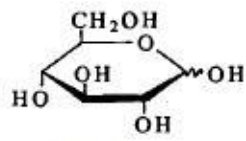


Σχήμα 1.1: Κύρια συστατικά φυτικού τοιχώματος. (Πηγή: Shleser 1994)

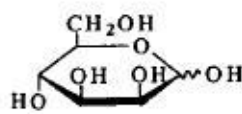
Τα κύρια συστατικά της λιγνινοκυτταρινούχου βιομάζας είναι η κυτταρίνη, η ημικυτταρίνη και η λιγνίνη (**Σχήμα 1.1**). Η κυτταρίνη είναι ένα γραμμικό ομοπολυμερές από μονάδες β-D-γλυκο-πυρανόζης, συνδεδεμένων με β-(1→4)-γλυκοζιτικούς δεσμούς και σχηματίζει ινίδια που προσδίδουν αντοχή στο φυτό. Η ημικυτταρίνη είναι ετερογενές πολυμερές αποτελούμενο από πεντόζες (D-ξυλόζη, D-αραβινόζη), εξόζες (D-μαννόζη, D-γλυκόζη, D-γαλακτόζη) και οξέα σακχάρων. Η ημικυτταρίνη αποτελείται από μικρότερα μήκη αλυσίδων με αρκετές διακλαδώσεις αντίθετα από την κυτταρίνη (Χριστακόπουλος & Τόπακας 2013). Οι βασικές αλυσίδες της ημικυτταρίνης που παρατηρούνται στη φύση είναι κυρίως ξυλάνες ή μαννάνες ανάλογα με την προέλευσή της. Η λιγνίνη είναι διακλαδισμένο, υποκατεστημένο, αρωματικό πολυμερές το οποίο βρίσκεται στο τοίχωμα των φυτικών κυττάρων και συνδέεται ισχυρά με τα ινίδια κυτταρίνης και ημικυτταρίνης με ομοιοπολικούς δεσμούς και δεσμούς υδρογόνου. Τα λιγνινοκυτταρινούχα υλικά είναι αρκετά ανθεκτικά εξαιτίας της ισχυρής σύνδεσης της λιγνίνης με την κυτταρίνη και ημικυτταρίνη. Γι' αυτό το λόγο παρεμποδίζεται η ενζυμική αποικοδόμησή τους (Demirbas 2005; Lyn & Tanaka 2006; Tomás-Pejó *et al.*, 2008; Kumar *et al.*, 2008; Balat *et al.*, 2008; Lee *et al.*, 2008; Pu *et al.*, 2008; Saxena *et al.*, 2009; Demain 2009; Fukuda 2009; Hayes 2009).



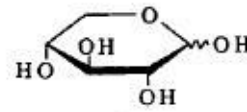
Σχήμα 1.2: Διαμόρφωση της αλυσίδας της κυτταρίνης



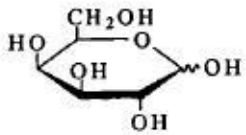
D-γλυκόζη



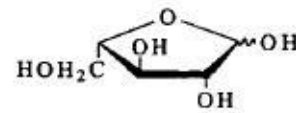
D-μαννόζη



D-ξυλόζη

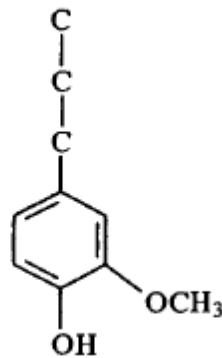


D-γαλακτόζη

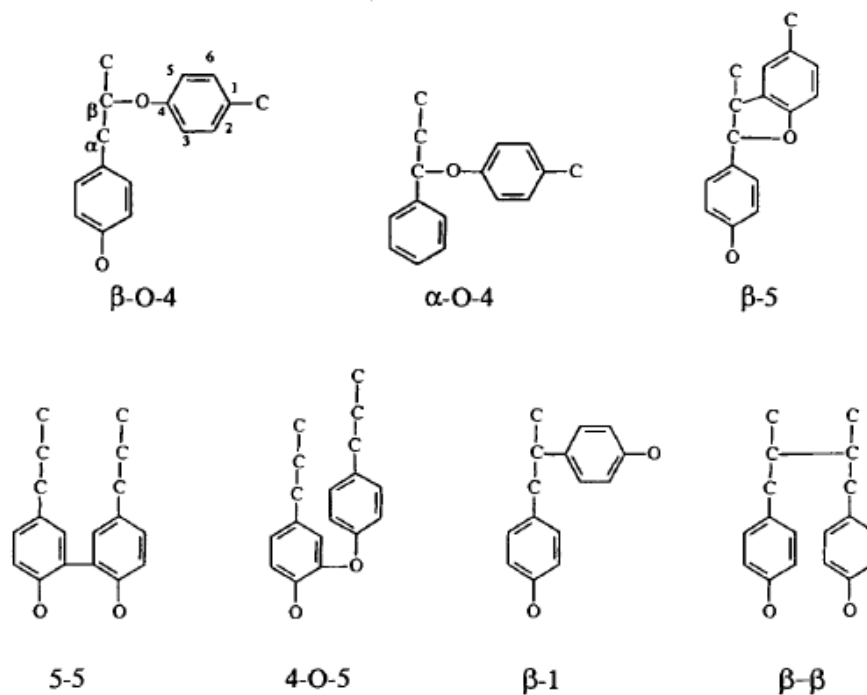


L-αραβινόζη

Σχήμα 1.3: Δομικά στοιχεία ημικυτταρίνης



Σχήμα 1.4: Μονάδα φαινυλ-προπανίου της λιγνίνης



Σχήμα 1.5: Συνήθεις τύποι δεσμών μεταξύ μονάδων φαινυλ- προπανίου στη λιγνίνη

ΕΚΧΥΛΙΣΙΜΑ

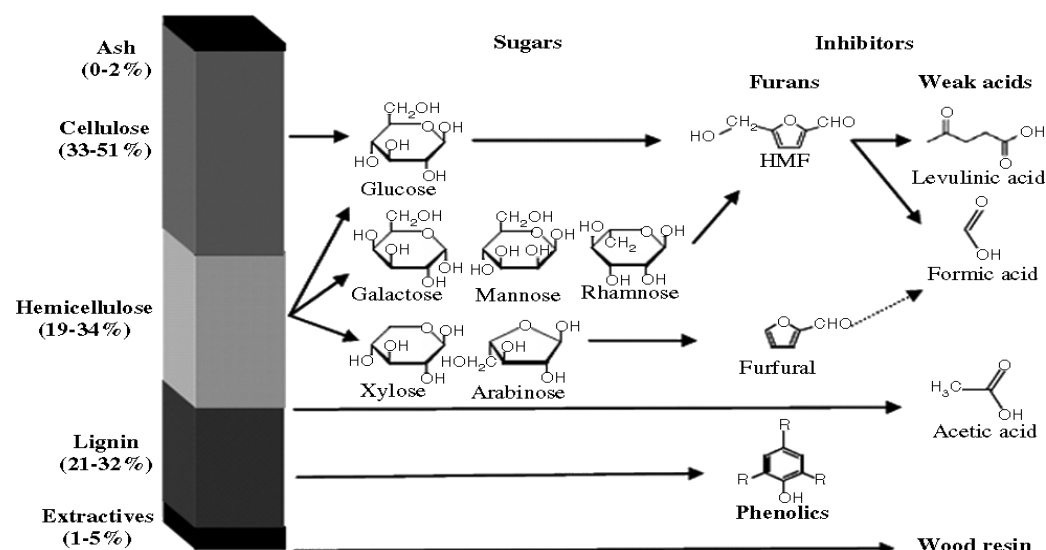
Είναι ομάδα ουσιών, που παραλαμβάνεται με εκχύλιση σε διάφορους διαλύτες. Ο διαλύτης εκχύλισης μπορεί να είναι νερό, αιθέρας, αλκοόλη ή μείγμα βενζόλιου – αλκοόλης (2:1). Τα εκχυλίσματα διαιρούνται γενικά σε 3 ομάδες :

- Τερπένια
- Ρητίνες
- φαινόλες

Στα εκχυλίσματα συγκαταλέγονται επίσης μικρές ποσότητες ουσιών που δεν ανήκουν στο κυτταρικό τοίχωμα, όπως πρωτεΐνες αιθέρια έλαια και χρωστικές ουσίες. Μερικές από τις ουσίες αυτές μπορεί να έχουν τεχνολογικό ενδιαφέρον ενώ άλλες μπορεί να παίζουν παρεμποδιστικό ρόλο στις κατεργασίες της φυτικής ύλης.

ΤΕΦΡΑ

Περιλαμβάνει όλα τα ανόργανα συστατικά που χρειάζονται για την ανάπτυξη φυτικής ύλης και προσδιορίζεται με καύση και πύρωση της φυτικής ύλης στους 500-600 °C. Τα κυρίαρχα συστατικά της είναι ανθρακικά άλατα αλκαλίων και αλκαλικών γαιών, όπως και διάφορα άλλα άλατα. Η περιεκτικότητα του ξύλου σε τέφρα είναι συνήθως μικρότερη του 1% κατά βάρος. Γενικά τα αγροτικά υπολείμματα έχουν μεγαλύτερο περιεχόμενο σε τέφρα και πρωτεΐνες. Η τέφρα διαλύεται σε μεγάλο βαθμό στα αλκάλια, στα αραιά οξέα, αυξάνει την κατανάλωση χημικών αντιδραστηρίων και δημιουργεί προβλήματα στην ποιότητα του υδrolύματος που λαμβάνεται κατά την όξινη υδρόλυση.



Σχήμα 1.6: Μέση σύνθεση της λιγνινοκυτταρινούχας βιομάζας και κύρια παραγόμενα προϊόντα υδρόλυσης.

ΕΝΕΡΓΕΙΑΚΗ ΑΞΙΟΠΟΙΗΣΗ ΒΙΟΜΑΖΑΣ

Η βιομάζα μπορεί να αξιοποιηθεί ενεργειακά με αρκετές μεθόδους, με διαφορετικές αποδόσεις και κόστος για κάθε περίπτωση. Συνοπτικά παρουσιάζονται παρακάτω οι κυριότερες από αυτές τις μεθόδους.

Η **απ' ευθείας καύση** οργανικού υλικού για την παραγωγή ατμού ή ηλεκτρισμού είναι η περισσότερο χρησιμοποιούμενη από τις μετατροπές και όταν γίνεται κάτω από καλά ελεγχόμενες συνθήκες είναι από τις αποδοτικότερες ενεργειακά.

Η **πυρόλυση** είναι η θερμική κατεργασία της βιομάζας απουσία αέρα και οξυγόνου σε 300-700 °C. Κατά την διεργασία αυτή διασπώνται χημικοί δεσμοί και λαμβάνονται προϊόντα υψηλού ενεργειακού περιεχομένου, που ανάλογα με τις συνθήκες, μπορεί να είναι στερεά, υγρά ή αέρια. Η πυρόλυση παρέχει τη δυνατότητα για την παραγωγή πολλών καυσίμων από μια ποικιλία πρώτων υλών. Από την άλλη μεριά όμως τα προϊόντα της πυρόλυσης δεν είναι δυνατό να προβλεφθούν πλήρως, ενώ οι υψηλές θερμοκρασίες σε συνδυασμό με μερικά διαβρωτικά προϊόντα προκαλούν μείωση του χρόνου ζωής των δοχείων αντίδρασης.

Στην **αεριοποίηση** γίνεται θέρμανση παρουσία περιορισμένων ποσοτήτων αέρα και οξυγόνου σε υψηλές θερμοκρασίες (700 – 1.100 °C). Κυρίως στόχος είναι η μέγιστη απελευθέρωση CO και H₂, μίγμα γνωστό ως αέριο σύνθεσης (syngas).

Η **υγροποίηση** περιλαμβάνει την απ' ευθείας αναγωγή της υγρής βιομάζας με χημικά και φυσικά μέσα σε σχετικά χαμηλές θερμοκρασίες προς υγρά καύσιμα προϊόντα. Το πλεονέκτημα της μεθόδου αυτής είναι ότι μετατρέπονται τόσο η κυτταρίνη όσο και η λιγνίνη που περιέχονται στους ξυλώδεις ιστούς. Ακόμη και τοξικές ουσίες είναι δεκτές, γεγονός που αφορά την αξιοποίηση αποβλήτων.

Η **αναερόβια χώνευση** μέσω αποσύνθεσης του οργανικού υλικού, απουσία οξυγόνου, μετατρέπει την βιομάζα σε CH₄ και CO₂. Οι ενδιάμεσες δράσεις περιλαμβάνουν την ενζυμική μετατροπή των αδιάλυτων οργανικών ενώσεων σε διαλύτες (π.χ. μετατροπή της κυτταρίνης με κυτταρινάσες) και τη ζύμωση των προϊόντων της πρώτης μετατροπής, με μικροοργανισμούς που δεν παράγουν μεθάνιο, σε οργανικά οξέα (κυρίως οξικό και προπιονικό). Ακολουθώντας τα οξέα αυτά μετατρέπονται σε μεθάνιο και διοξείδιο του άνθρακα σε αναλογία περίπου 0,25 : 0,69 από ειδικά βακτηρίδια.

Η **αλκοολική ζύμωση** είναι μία πολύ ενδιαφέρουσα εφαρμογή στη μετατροπή της βιομάζας σε καύσιμο υψηλής ενεργειακής απόδοσης και φιλικό προς το περιβάλλον όπως είναι η αιθυλική αλκοόλη. Υπάρχουν διάφορες τεχνικές και μέθοδοι σε αυτή την κατεύθυνση (Χριστακόπουλος & Τόπακας, 2013).

Αραβόσιτος (Καλαμπόκι)

Το **καλαμπόκι** ή **αραβόσιτος** έχει την επιστημονική ονομασία *Zea mays*. Είναι σιτηρό της οικογένειας των Ποοειδών (Poaceae) ή Αγρωστωδών (Gramineae).

Χαρακτηριστικά

Είναι ετήσιο, ψηλό φυτό με χοντρό όρθιο και συμπαγή βλαστό, στενά και μακριά φύλλα σε σχήμα σπαθιού και κυματιστά άκρα.

Καρπός

Ο καρπός του αραβοσίτου είναι καρύωση, δηλαδή είδος ξηρού καρπού, μονόσπερμου, με πολύ λεπτό περικάρπιο που περιβάλλει το σπέρμα. Αποτελείται από τέσσερα τμήματα: το περικάρπιο, το ενδοσπέρμιο, το έμβρυο και τον ποδίσκο. Το περικάρπιο αποτελείται από κυτταρίνη και ημικυτταρίνες και έχει ρόλο να προστατεύει το σπέρμα από εχθρούς, μολύνσεις και την είσοδο του νερού .

Χρήσεις

Παρότι το καλαμπόκι είναι βασική πηγή διατροφής σε πολλές χώρες, η θρεπτική του αξία είναι μικρότερη απ' ό τι στα άλλα σιτηρά.

Στη διατροφή επίσης χρησιμοποιείται και το λάδι του καλαμποκιού, το γνωστό αραβοσιτέλαιο. Οι κόκκοι του καλαμποκιού, με κατάλληλη επεξεργασία, μπορεί να γίνουν και αλκοόλη βιομηχανικής χρήσης.

Όμως χρήσιμα είναι και τα μη φαγώσιμα μέρη. Έτσι από το καλάμι φτιάχνεται χαρτί και χαρτόνι. Οι άξονες των σπαδικών μπορούν να χρησιμοποιηθούν σαν καύσιμο (συνήθως σε φωτιά) και στην παραγωγή διαφόρων διαλυτών χρήσιμων στη βιομηχανία. Τα υπολείμματα από την κατεργασία του καλαμποκιού αποτελούν και μια από τις σημαντικότερες πηγές βιομάζας.

Παραγωγή

Το καλαμπόκι και η καλλιέργειά του είναι διαδεδομένη παγκοσμίως. Οι Η.Π.Α έχουν τη μεγαλύτερη παραγωγή στον κόσμο με 285 εκατομμύρια τόνους ετησίως. Ακολουθούν η Κίνα, η Βραζιλία και το Μεξικό. Στην Ελλάδα καλλιεργείται κυρίως στη Μακεδονία, τη Θράκη, τη Στερεά Ελλάδα και την Πελοπόννησο. Η ετήσια

παραγωγή φτάνει το 1,5 εκατομμύριο τόνους (Drew M.C., He C. J. and Morgan P.W. 1989; Αϊβαλάκης, Καραμπουρνιώτης, Φασσέας, 2003).

Η εξαγωγή των σακχάρων από τα στελέχη του αραβόσιτου οδηγεί σε ένα λιγνινοκυτταρινούχο υπόλειμμα, το στέλεχος αραβόσιτου, που χρησιμοποιείται ως πηγή για παραγωγή βιοκαυσίμων, ως ζωοτροφή, ως οργανικό λίπασμα ή εναλλακτικά καίγεται για παροχή άμεσης ενέργειας (Sakellariou-Makrantonaki *et al.*, 2007; Liu & Lin, 2009; Zhao *et al.*, 2009; Dogaris *et al.*, 2009). Η κυτταρίνη και η ημικυτταρίνη του στελέχους του αραβόσιτου μπορούν να υδρολυθούν για να απελευθερώσουν σάκχαρα για την παραγωγή βιοαιθανόλης, ενώ το υπόλειμμα της λιγνίνης και άλλα συστατικά μπορούν να καούν για την παραγωγή ενέργειας (Dogaris *et al.*, 2009).

Παρόλα αυτά, η παραγωγή βιοαιθανόλης από τον αραβόσιτο παραμένει ακόμα σε αρχικό στάδιο, λόγω προβλημάτων στην αποθήκευση και την προκατεργασία του υλικού (Wu *et al.*, 2009).

Πίνακας 1.1 Σύσταση λιγνινοκυτταρινούχων υλικών (% ξηρό w/w).

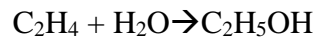
Πρώτη ύλη	Κυτταρίνη	Ημικυτταρίνη	Λιγνίνη
Λεύκα ^[1]	44	22	26
Πεύκο ^[3]	44	22	28
Switch grass ^[3]	32	25	18
Φλοιός ρυζιού ^[2]	36	15	19
Άχυρο σίτου ^[1]	30	22	17
Άχυρο κριθαριού ^[2]	40	20	15
Στέλεχος αραβόσιτου^[1]	38	30	23
Σπάδικας αραβόσιτου^[2]	42	39	14
Βαγάσση σόργου ^[4]	40	36	4

(Πηγές: [1] Tomás-Pejó *et al.* 2008, [2] Chandel *et al.* 2007, [3] Balat *et al.* 2008, [4] Dogaris *et al.* 2009a)

1.2 Παραγωγή Βιοαιθανόλης

1.2.1 Γενικά

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



Αιθένιο + νερό (ατμός) \rightarrow αιθανόλη

Η βιοαιθανόλη μπορεί να παραχθεί από πλήθος υδατανθράκων με γενικό μοριακό τύπο: $[(\text{CH}_2\text{O})_n]$. Στην περίπτωση της σακχαρόζης, αυτή αρχικά υδρολύεται και μετατρέπεται σε γλυκόζη και φρουκτόζη, γεγονός που μπορεί να επιτευχθεί είτε από τους μικροοργανισμούς είτε με την προσθήκη εμπορικών σκευασμάτων ινβερτάσης.



Σακχαρόζη \rightarrow γλυκόζη + φρουκτόζη

Έπειτα, η γλυκόζη και η φρουκτόζη μετατρέπονται σε αιθανόλη.



Γλυκόζη (φρουκτόζη) \rightarrow αιθανόλη + διοξείδιο του άνθρακα

Η μετατροπή συνεπώς έχει ως εξής:

$$\text{M.B.}[\text{C}_6\text{H}_{12}\text{O}_6] = 180$$

$$\text{M.B.}[\text{C}_2\text{H}_5\text{OH}] = 46 \cdot 2 = 92$$

$$\text{M.B.}[\text{CO}_2] = 44 \cdot 2 = 88$$

Η μέγιστη απόδοση κατά βάρος είναι:

$$(\text{C}_2\text{H}_5\text{OH} / \text{C}_6\text{H}_{12}\text{O}_6) = 92 / 180 = \mathbf{51\% \text{ w/w}}$$

Αντιστοίχως για το διοξείδιο του άνθρακα είναι:

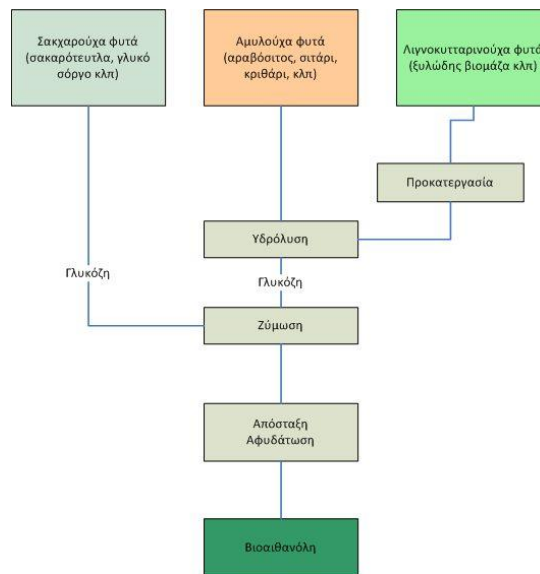
$$(\text{CO}_2 / \text{C}_6\text{H}_{12}\text{O}_6) = 88 / 180 = \mathbf{49\% \text{ w/w}}$$

Επίσης, το άμυλο μετατρέπεται σε D-γλυκόζη με τη βοήθεια του ενζύμου γλυκοαμυλάση. Μετά την ενζυμική υδρόλυση ακολουθεί η ζύμωση, η απόσταξη και η αφυδάτωση με σκοπό της παραγωγή άνυδρης βιοαιθανόλης (Dermibas, 2008).

1.2.2 Παραγωγή βιοαιθανόλης από λιγνινοκυτταρινούχα βιομάζα

Η ιδιαίτερα περίπλοκη δομή των λιγνινοκυτταρινούχων υλικών καθιστά πολύ δύσκολη την αποικοδόμησή τους από τους μικροοργανισμούς και γι' αυτό τον λόγο υπόκεινται σε κάποιες διεργασίες που έχουν στόχο την απομάκρυνσή της (Lee, 1997). Αργότερα λαμβάνει χώρα η υδρόλυση και η ζύμωση. Το σημαντικότερο στάδιο της παραγωγής βιοαιθανόλης αποτελεί το στάδιο της ενζυμικής επεξεργασίας της κυτταρίνης για την παραγωγή σακχάρων. Πριν από αυτό το στάδιο πραγματοποιείται το στάδιο της προκατεργασίας (Ye Sun, 2002).

Με την υδρόλυση διασπώνται οι δεσμοί υδρογόνου των κυτταρινών και των ημικυτταρινών με αποτέλεσμα τη μετατροπή τους σε σάκχαρα: πεντόζες και εξόζες. Αυτά τα σάκχαρα μπορούν ακολούθως να υποστούν ζύμωση για την παραγωγή βιοαιθανόλης. Οι πιο συχνά χρησιμοποιούμενες μέθοδοι υδρόλυσης μπορούν να ταξινομηθούν σε δύο βασικές κατηγορίες: στη *χημική υδρόλυση* (χρήση πυκνού ή αραιού οξέος) και στην *ενζυμική υδρόλυση*. Στη χημική υδρόλυση, η προκατεργασία και η υδρόλυση πραγματοποιούνται από κοινού σε ένα στάδιο (Ye Sun, 2002).



Σχήμα 1.7: Παραγωγή βιοαιθανόλης (Ye Sun, 2002)

Ένα από τα πλεονεκτήματα της βιομετατροπής λιγνινοκυτταρινούχων υλικών είναι και η δυνατότητα δημιουργίας ενός βιοδιωλιστηρίου αξιοποιώντας το σύνολο των συστατικών τους για παραγωγή βιοαιθανόλης, αυξάνοντας έτσι τη συνολική δυνατότητα κέρδους και παραγωγικότητας από τα λιγνινοκυτταρινούχα υλικά (Balat *et al.* 2008).

1.3 Υδρόλυση της λιγνινοκυτταρίνης

1.3.1 Προκατεργασία

Η λιγνινοκυτταρίνη προστατεύεται από τη συμπαγή και περιοριστική δομή της μήτρας της κυτταρίνης και της λιγνίνης. Γι' αυτό το λόγο και εξαιτίας της στενής σύνδεσης της ημικυτταρίνης και της κυτταρίνης με τη λιγνίνη, είναι απαραίτητο να λαμβάνει χώρα προκατεργασία της πρώτης ύλης, η οποία να εξασφαλίζει την ελαχιστοποίηση της χημικής καταστροφής των ζυμώσιμων σακχάρων ώστε να παραχθεί αιθανόλη σε μεγαλύτερες αποδόσεις. Με την προκατεργασία καθίσταται ευκολότερη η διάσπαση της κρυσταλλικής δομής της κυτταρίνης καθώς αυξάνεται το πορώδες της λιγνινοκυτταρίνης ώστε να επιτρέπεται η εισχώρηση των ενζύμων στις ίνες. Αυτό έχει ως αποτέλεσμα οι υδατάνθρακες να είναι πλέον διαθέσιμοι για τη

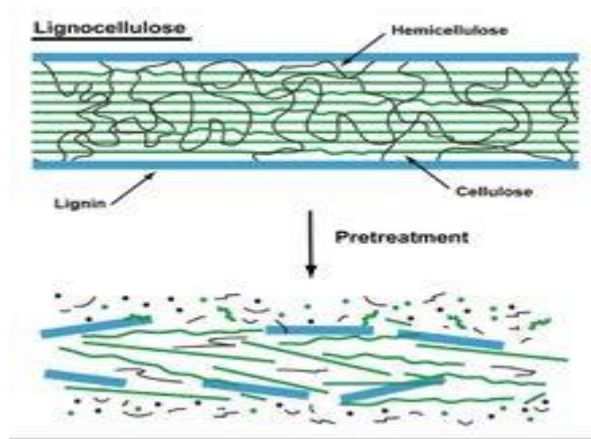
διεργασία της ενζυμικής υδρόλυσης, για την παραγωγή μονοσακχαριτών και στη συνέχεια για τη ζύμωση αυτών προς αιθανόλη (Chandel *et al.*, 2007; Balat *et al.*, 2008; Sánchez & Cardona, 2008; Tomás-Pejó *et al.*, 2008; Kumar *et al.*, 2008).

Μια αποτελεσματική προκατεργασία πρέπει να διαθέτει τα εξής στοιχεία: (α) να οδηγεί σε απελευθέρωση ή να αυξάνει την απόδοση παραγωγής σακχάρων κατά την ενζυμική υδρόλυση, (β) να αποφεύγεται η αποικοδόμηση ή απώλεια των υδατανθράκων, (γ) να παράγει ελάχιστα ή μηδενικά επίπεδα παραπροϊόντων που παρεμποδίζουν την μετέπειτα υδρόλυση και ζύμωση και (δ) να έχει χαμηλές απαιτήσεις σε ενέργεια, κεφάλαιο και λειτουργικά έξοδα (Balat *et al.*, 2008; Sánchez & Cardona 2008). Η προκατεργασία είναι από τα πιο δαπανηρά στάδια της παραγωγής βιοαιθανόλης από λιγνινοκυτταρινούχα υλικά αποτελώντας έως και το 33% του συνολικού κόστους παραγωγής (Chandel *et al.*, 2007; Tomás-Pejó *et al.*, 2008).

1.3.1.1 Μέθοδοι Προκατεργασίας

Τα τελευταία χρόνια έχει αναφερθεί ένα ευρύ φάσμα προκατεργασίας οι οποίες διακρίνονται σε τέσσερις κατηγορίες (Galbe & Zacchi, 2007; Sánchez & Cardona, 2008; Lee *et al.*, 2008; Tomás-Pejó *et al.*, 2008; Hayes, 2009):

1. Φυσικές (άλεση, κονιορτοποίηση, ακτινοβολήση κλπ),
2. Χημικές (αλκάλι, αραιό οξύ, οξειδωτικές ενώσεις, οργανικοί διαλύτες κτλ),
3. Φυσικοχημικές (προκατεργασία με ατμό, υδροθερμόλυση, υγρή οξείδωση κτλ)
4. Βιολογικές ή/και συνδυασμός των παραπάνω.



Σχήμα 1.8: Διαδικασία προκατεργασίας.

Φυσικές μέθοδοι προκατεργασίας

Η φυσική προκατεργασία είναι μία μέθοδος άλεσης και τεμαχισμού της βιομάζας που διευκολύνει την ενζυμική υδρόλυση αυξάνοντας την ενεργή επιφάνεια της κυτταρίνης και της ημικυτταρίνης και ταυτόχρονα μειώνει την κρυσταλλικότητα της κυτταρίνης (Galbe & Zacchi, 2007; Kumar *et al.*, 2008; Sánchez & Cardona, 2008; Tomás-Rejón *et al.*, 2008). Παρ' όλα αυτά, οι συγκεκριμένες μέθοδοι προκατεργασίας αποδεικνύονται ενεργοβόρες οπότε καθίστανται απαγορευτικές για εφαρμογή σε βιομηχανική κλίμακα, εκτός αν συνδυαστούν με θέρμανση ή προσθήκη χημικών, αλλά και πάλι θα είναι δύσκολο στην εφαρμογή διότι αυτά τα βήματα δεν θα είναι οικονομικά (Galbe & Zacchi, 2007; Tomás-Rejón *et al.*, 2008; Hayes 2009).

Χημικές μέθοδοι προκατεργασίας

Στις χημικές μεθόδους προκατεργασίας χρησιμοποιούν χημικές ενώσεις όπως όζον (O_3), οξέα, αλκάλια, υπεροξειδία και οργανικούς διαλύτες. Τα ανόργανα οξέα όπως H_2SO_4 και HCl χρησιμοποιούνται κατά κόρον για την προκατεργασία της βιομάζας. Η υδρόλυση με αραιό H_2SO_4 (συνήθως κάτω από 4 g/100 g υλικού) έχει εφαρμοστεί με μεγάλη επιτυχία, δεδομένου ότι υδρολύεται η ημικυτταρίνη και βελτιώνεται σημαντικά το ακόλουθο στάδιο της ενζυμικής υδρόλυσης (Galbe & Zacchi, 2007; Chandel *et al.*, 2007; Sánchez & Cardona, 2008; Balat *et al.*, 2008; Hayes 2009). Η χρήση ισχυρού H_2SO_4 αντιθέτως δεν ενδείκνυται, αφενός εξαιτίας του υψηλού κόστους και αφετέρου λόγω πρόκλησης σημαντικών λειτουργικών προβλημάτων, όπως διάβρωση των μηχανημάτων (Hamelinck *et al.*, 2005; Sánchez & Cardona, 2008). Επίσης χρησιμοποιείται εναλλακτικά το H_3PO_4 στο στάδιο της

προκατεργασίας. Το H_3PO_4 είναι ναί μεν ακριβότερο του H_2SO_4 αλλά έχει και κάποια πλεονεκτήματα τα οποία κάνουν ανταγωνιστική τη χρήση του. Το H_3PO_4 είναι φιλικό προς το περιβάλλον διότι ο φωσφόρος που περιέχει, αποτελεί στερεό κατάλοιπο ικανό για χρήση ως λίπασμα (Geddes *et al.*, 2010; Lee and Jeffries 2011). Επιπλέον ο φωσφόρος είναι ένα απαραίτητο θρεπτικό συστατικό για διάφορα μέσα ζύμωσης (Romero *et al.*, 2007). Μόνο ορισμένες μελέτες είναι διαθέσιμες για την προκατεργασία υπολειμμάτων στελέχους αραβόσιτου με αραιωμένο H_3PO_4 . Ωστόσο, καμία μελέτη δεν έδειξε ότι μεγιστοποιείται η απόδοση της ζάχαρης ύστερα από σακχαροποίηση των προκατεργασμένων υπολειμμάτων στελέχους αραβόσιτου, ελαχιστοποιώντας παράλληλα την εμφάνιση παρεμποδιστών όπως η φουρφουράλη και η υδρόξυ-μέθυλο-φουρφουράλη κατά το στάδιο της προκατεργασίας.

Τυπική αποτοξίνωση από παρεμποδιστές συνεπάγεται περαιτέρω βήμα όπως ασβέστωση (over-liming) και βιο-αποτοξίνωση χρησιμοποιώντας κάποιο στέλεχος ενός μύκητα πριν από τη ζύμωση του υδrolύματος που προσθέτει μεγαλύτερο κόστος στη διαδικασία παραγωγής αιθανόλης από βιομάζα λιγνινοκυτταρινούχων απορριμάτων (Saha B.C., 2004; Ayse Avcı *et al.*, 2013)

Στην αλκαλική προκατεργασία προστίθενται αραιές βάσεις [όπως NaOH και $Ca(OH)_2$] στη βιομάζα, οι οποίες δρουν αυξάνοντας την εσωτερική επιφάνεια του υλικού. Αυτό γίνεται κυρίως μέσω της διόγκωσης των πόρων του υλικού, μείωσης του βαθμού πολυμερισμού και της κρυσταλλικότητας της κυτταρίνης, διάσπασης των δεσμών λιγνίνης-υδατανθράκων και τέλος απομάκρυνσης της λιγνίνης (Galbe & Zacchi, 2007; Sánchez & Cardona, 2008; Tomás-Pejó *et al.*, 2008; Balat *et al.*, 2008; Hayes 2009).

Εναλλακτικά μπορεί να γίνει η χρήση οργανικών διαλυτών ή μιγμάτων νερού και οργανικών διαλυτών με προσθήκη ανόργανου οξέος (H_2SO_4 και HCl), με αποτέλεσμα τη διάσπαση των εσωτερικών δεσμών της λιγνίνης και της ημικυτταρίνης. Η μέθοδος αυτή αναφέρεται συνήθως ως "organosolv" και έχει υψηλό κόστος λόγω της χρήσης οργανικών διαλυτών (Pan *et al.*, 2005; Galbe & Zacchi, 2007).

Φυσικοχημικές μέθοδοι προκατεργασίας

Η φυσικοχημική προκατεργασία περιλαμβάνει μεθόδους που αποτελούν συνδυασμό φυσικών και χημικών μεθόδων. Η προκατεργασία με ατμό (steam pretreatment) είναι

μία από τις πλέον ευρέως χρησιμοποιούμενες μεθόδους προκατεργασίας λιγνινοκυτταρινούχων υλικών (Galbe & Zacchi, 2007; Tomás-Pejó *et al.*, 2008; Sánchez & Cardona, 2008; Hayes 2009). Η μέθοδος αυτή ονομάζεται διαφορετικά και ως ‘έκρηξη με ατμό’ (steam explosion), λόγω της απότομης εκτόνωσης της πίεσης οδηγώντας σε αποδιάταξη του πλέγματος των ινών των λιγνινοκυτταρινούχων υλικών. Μελέτες υποδεικνύουν επιπλέον ότι προκαλείται όξινη υδρόλυση από τα οργανικά οξέα που εμπεριέχονται σε ορισμένα είδη βιομάζας τα οποία με τη σειρά τους δρουν ως καταλύτες στην υδρόλυση της ημικυτταρίνης σε ολιγο- και μονοσακχαρίτες, καθιστώντας την κυτταρίνη πιο ευάλωτη στη δράση των ενζύμων. Λόγω της διαφοράς στη σύσταση σε οργανικά οξέα, ορισμένα λιγνινοκυτταρινούχα υλικά είναι πιο εύκολο να διασπαστούν σε σχέση με άλλα (Galbe & Zacchi, 2007; Hayes 2009). Η προκατεργασία με ατμό μπορεί να βελτιωθεί ως μέθοδος με την προσθήκη οξέος, όπως H_2SO_4 και SO_2 προσομοιάζοντας την υδρόλυση με αραιό οξύ με πολύ μικρότερο ποσοστό υγρασίας (Galbe & Zacchi, 2007; Tomás-Pejó *et al.*, 2008).

Η υδροθερμόλυση (hydrothermolysis, liquid hot-water treatment) είναι μία υδροθερμική κατεργασία η οποία δεν απαιτεί ραγδαία αποσυμπίεση και δε χρησιμοποιεί κανένα καταλύτη ή χημικό πρόσθετο. Εφαρμόζεται πίεση για τη διατήρηση του νερού σε υγρή μορφή σε υψηλές θερμοκρασίες (160 - 240 °C) και προκαλεί διάφορες αλλαγές στη δομή του λιγνινοκυτταρινούχου υλικού. Οι στόχοι αυτής της μεθόδου προκατεργασίας είναι η διαλυτοποίηση της ημικυτταρίνης, η αύξηση της προσβασιμότητας της κυτταρίνης και η αποφυγή σχηματισμού παρεμποδιστών. Το μίγμα που προκύπτει μετά την προκατεργασία μπορεί να φιλτραριστεί/διηθηθεί ώστε να ανακτηθούν δύο κλάσματα: α) ένα στερεό κλάσμα πλούσιο σε κυτταρίνη και β) ένα υγρό κλάσμα πλούσιο σε σάκχαρα που προέρχονται από την ημικυτταρίνη (κυρίως ξυλόζη). Για την αποφυγή σχηματισμού παρεμποδιστών το pH πρέπει να διατηρείται μεταξύ του διαστήματος 4-7. Η προκατεργασία με θερμό νερό απομακρύνει μέχρι και το 80% της ημικυτταρίνης και ενισχύει την επιδεκτικότητα του υλικού σε ένζυμα. Η λιγνίνη αποπολυμερίζεται και διαλυτοποιείται μερικώς κατά το στάδιο της προκατεργασίας, αλλά η απολιγνοποίηση δεν είναι δυνατή μόνο με θερμό νερό εξαιτίας της ανασυμπύκνωσης των διαλυτών ενώσεων που προέρχονται από την ίδια τη λιγνίνη. Γενικά, η προκατεργασία με θερμό νερό είναι αρκετά ελκυστική λόγω του χαμηλού της κόστους καθώς δεν

απαιτείται καταλύτης οπότε το κόστος κατασκευής και συντήρησης είναι χαμηλό εξαιτίας του μειωμένου κινδύνου για διάβρωση. Έχει, επίσης, το μεγάλο πλεονέκτημα της μειωμένης συγκέντρωσης αποικοδομήσιμων προϊόντων και αυτό οφείλεται στο γεγονός πως τα διαλυμένα προϊόντα της ημικυτταρίνης και της λιγνίνης βρίσκονται σε χαμηλή συγκέντρωση εξαιτίας των υψηλών ποσοτήτων νερού που χρησιμοποιούνται. Ωστόσο, αυτή η διεργασία απαιτεί μεγάλες ποσότητες νερού και περισσότερη ενέργεια από τις διεργασίες όπως προκατεργασία με εκτόνωση νερού (Hayes 2009).

Άλλες φυσικοχημικές μέθοδοι περιλαμβάνουν την υγρή οξείδωση (wet oxidation) και την “εκτόνωση ίνας με αμμωνία” (Ammonia Fiber Explosion, AFEX). Στην πρώτη, η βιομάζα επεξεργάζεται σε νερό και αέρα ή οξυγόνο (σε θερμοκρασίες μεγαλύτερες των 120 °C), με την προσθήκη ορισμένες φορές κάποιου αλκαλικού καταλύτη. Η μέθοδος αυτή είναι κατάλληλη για υλικά με χαμηλό ποσοστό λιγνίνης (Galbe&Zacchi, 2007). Η εκτόνωση ίνας με αμμωνία είναι μια αλκαλική μέθοδος, παρόμοια με την κατεργασία με ατμό η οποία όμως γίνεται σε υψηλή πίεση (μεγαλύτερη των 3 MPa). Κατά την προκατεργασία αυτή μόνο ένα μικρό μέρος της βιομάζας διαλυτοποιείται, αλλά η δομή του υλικού μεταβάλλεται. Διασπώνται δηλαδή οι δεσμοί μεταξύ λιγνίνης και υδατανθράκων αυξάνοντας έτσι την πρόσβαση και υδρόλυση των ενζύμων (Galbe & Zacchi, 2007; Balat *et al.*, 2008; Hayes 2009). Παρά τις ενδεχόμενες υψηλές αποδόσεις, η μέθοδος AFEX έχει μεγάλο κόστος λόγω της χρήσης αμμωνίας και της ανάκτησής της αλλά από την άλλη μεριά υστερεί σε θέματα ασφαλείας (Hayes 2009).

Βιολογικές μέθοδοι προκατεργασίας

Στις βιολογικές προκατεργασίες χρησιμοποιούνται μικροοργανισμοί, όπως οι βασιδιομύκητες, οι οποίοι μπορούν να αποικοδομούν τη λιγνίνη. Η μέθοδος αυτή θεωρείται φιλική προς το περιβάλλον και ενεργειακά οικονομική, καθώς δεν απαιτεί υψηλές θερμοκρασίες και χρήση χημικών προσθέτων. Όμως ο ρυθμός κατεργασίας των βιολογικών μεθόδων είναι πολύ χαμηλός για να εφαρμοστούν σε βιομηχανική κλίμακα και ένα μέρος της πρώτης ύλης χάνεται λόγω της κατανάλωσής του από τους μικροοργανισμούς (Galbe & Zacchi, 2007; Kumar *et al.*, 2008; Tomás-Pejó *et al.*, 2008; Balat *et al.*, 2008; Sánchez & Cardona, 2008).

1.3.2 Όξινη υδρόλυση

Η όξινη υδρόλυση της φυτικής λιγνινοκυτταρινούχου βιομάζας είναι γνωστή από το 1819. Η όξινη υδρόλυση μπορεί να λάβει χώρα με διάφορα είδη οξέων, συμπεριλαμβανομένου του θειώδους, του θειικού, του υδροχλωρικού, του υδροφθορικού, του φωσφορικού, του νιτρικού και του μεθανικού οξέος. Τα οξέα αυτά χρησιμοποιούνται είτε πυκνά είτε αραιά. Διεργασίες με πυκνά οξέα γίνονται σε ήπιες θερμοκρασίες και δίνουν υψηλές αποδόσεις (π.χ. 90% της μέγιστης απόδοσης σε γλυκόζη), αλλά οι μεγάλες ποσότητες των χρησιμοποιούμενων οξέων δημιουργούν προβλήματα διάβρωσης του εξοπλισμού και η απαίτηση για ανακύκλωση του μεγαλύτερου μέρους των οξέων συνεισφέρει επιπρόσθετη κατανάλωση ενέργειας. Αντιθέτως, η υδρόλυση με αραιό οξύ παρέχει ένα μεγάλο πλεονέκτημα. Παρουσιάζει σχετικά χαμηλή συγκέντρωση οξέων. Ωστόσο, για την επίτευξη αποδεκτών ρυθμών μετατροπής της κυτταρίνης σε γλυκόζη απαιτούνται υψηλές θερμοκρασίες, οι οποίες με τη σειρά τους αυξάνουν το ρυθμό της αποσύνθεσης των σακχάρων της ημικυτταρίνης και της διάβρωσης του εξοπλισμού. Η μέγιστη απόδοση γλυκόζης επιτυγχάνεται σε υψηλές θερμοκρασίες και μικρούς χρόνους παραμονής, αλλά δεν ξεπερνάει το 60% της θεωρητικής τιμής. Επίσης, ορισμένα προϊόντα της αποδόμησης των σακχάρων παρεμποδίζουν το ακόλουθο στάδιο που είναι η ζύμωση (Larsson *et al.*, 1999a; Larsson *et al.*, 1999b).

1.3.3 Ενζυμική υδρόλυση

1.3.3.1 Γενικά

Από το 1960 και έπειτα αρχίζει να αναπτύσσεται η βιοαποικοδόμηση της λιγνινοκυτταρίνης. Λαμβάνει χώρα σε χαμηλές σχετικά θερμοκρασίες με τη χρήση ενζύμων ως καταλύτες και παρέχει εξειδικευμένη μετατροπή της κυτταρίνης. Η κυτταρίνη είναι ο κύριος πολυσακχαρίτης που απομένει μετά από τις περισσότερες προκατεργασίες. Επομένως, θεωρείται ότι έχει τη δυνατότητα επίτευξης μεγαλύτερων αποδόσεων και μειωμένου σχηματισμού τοξικών ενώσεων σε σχέση με την όξινη υδρόλυση. Η παραγωγή κυτταρινασών είναι κοινή για τους μύκητες. Τα ένζυμα αυτά υδρολύουν τους β-(1→4)-γλυκοζιτικούς δεσμούς. Η δράση των κυτταρινασών είναι συνεργιστική, δηλαδή η συνδυασμένη δραστηριότητα των ενζύμων είναι μεγαλύτερη

από το άθροισμα των δράσεων όλων των ενζύμων ξεχωριστά. Τρία είδη ενζύμων δρουν συνεργιστικά για την υδρόλυση της κυτταρίνης (Galbe & Zacchi, 2002; Balat *et al.*, 2008; Kumar *et al.*, 2008; Hayes 2009):

1. Οι ενδο-β-(1→4)-γλουκανάσες, οι οποίες προσβάλλουν εσωτερικά τις άμορφες περιοχές της αλυσίδας της κυτταρίνης,
2. Οι κελλοβιοϋδρολάσες ή εξωγλουκανάσες, οι οποίες προσβάλλουν τα άκρα του πολυμερούς απελευθερώνοντας κελλοβιόζη
3. Οι β-γλυκοζιδάσες, οι οποίες διασπούν την κελλοβιόζη σε δύο μόρια γλυκόζης

Όπως προαναφέρθηκε ανωτέρω, η σχηματιζόμενη κελλοβιόζη διασπάται σε δύο μόρια γλυκόζης με τη δράση των β-γλυκοζιδασών. Αυτό είναι σημαντικό για την πορεία της υδρόλυσης επειδή η κελλοβιόζη παρεμποδίζει τη δράση πολλών κυτταρινασών.

Από την άλλη μεριά, οι β-γλυκοζιδάσες παρεμποδίζονται από τη γλυκόζη. Έτσι, από τη στιγμή που τα ένζυμα παρεμποδίζονται από τα τελικά προϊόντα, ο σχηματισμός τους επηρεάζει αρνητικά την υδρόλυση της κυτταρίνης. Δεν είναι δυνατόν να βρεθούν μοναδικές βέλτιστες συνθήκες της υδρόλυσης καθώς αυτές εξαρτώνται από παράγοντες όπως η σύσταση σε ξηρή μάζα, το pH, η θερμοκρασία, ο χρόνος παραμονής και η πηγή των ενζύμων. Γενικά, μικρότερες συγκεντρώσεις στερεών οδηγούν σε υψηλότερες αποδόσεις της υδρόλυσης. Η συγκέντρωση των κυτταρινασών έχει μεγάλη επίδραση στη μετατροπή της κυτταρίνης. Τέλος, αυξομειώσεις στο χρόνο της υδρόλυσης επηρεάζουν τη βέλτιστη θερμοκρασία, το pH και τις υπόλοιπες συνθήκες (Galbe & Zacchi, 2002).

Για την αποτελεσματική αξιοποίηση των λιγνινοκυτταρινούχων υλικών απαιτείται η αποικοδόμηση τόσο της κυτταρίνης όσο και της ημικυτταρίνης (Galbe & Zacchi, 2002; Lee *et al.*, 2006). Η ξυλάνη, η οποία αποτελεί το βασικό πολυμερές της ημικυτταρίνης, υδρολύεται σε ξυλο-ολιγοσακχαρίτες από ενδο-β-(1→4)-ξυλανάσες και στη συνέχεια οι β-ξυλοζιδάσες υδρολύουν τους ξυλο-ολιγοσακχαρίτες (κυρίως την ξυλοβιόζη) σε μόρια ξυλόζης. Άλλα ένζυμα που συνεισφέρουν στην αποικοδόμηση της ημικυτταρίνης είναι οι α-γλυκουρονοζιδάσες, οι α-L-αραβινοφουρανοζιδάσες, οι ακετυλεστεράσες και οι εστεράσες του φερουλικού

οξέος. Η αποικοδόμηση των γλυκομαννάνων γίνεται από β-μαννανάσες και β-μανναζιδάσες (Gray *et al.*, 2006; Kumar *et al.*, 2008).

Τα υδρολυτικά ένζυμα βρίσκονται είτε ελεύθερα είτε σε συμπλέγματα. Τα συμπλέγματα ενζυμικών συστημάτων είναι γνωστά και ως ‘‘cellulosomes’’ και συνήθως υπάρχουν σε αναερόβια βακτήρια και μύκητες, ενώ οι αερόβιοι μικροοργανισμοί παράγουν συνήθως ξεχωριστά ένζυμα που εκκρίνονται στο μέσο ανάπτυξης (Kumar *et al.*, 2008).

1.3.3.2 Παράγοντες που επηρεάζουν την ενζυμική υδρόλυση

Οι κύριοι παράγοντες που επηρεάζουν την ενζυμική υδρόλυση περιλαμβάνουν το είδος και τα χαρακτηριστικά του υποστρώματος, την ενεργότητα των ενζύμων και τις συνθήκες της αντίδρασης (Sun & Cheng, 2002; Balat *et al.*, 2008). Η μη-αναστρέψιμη προσρόφιση των ενζύμων στο υπόστρωμα είναι μερικώς υπεύθυνη για τη σταδιακή απενεργοποίησή τους, το οποίο όμως μπορεί να ελαχιστοποιηθεί με την προσθήκη κάποιων επιφανειοδραστικών ουσιών, όπως Tween και πολυαιθυλενογλυκόλη (Kristensen & Börjesson, 2007; Balat *et al.*, 2008; Lee *et al.*, 2008). Τέλος, η δυνατότητα ανακύκλωσης των ενζύμων μπορεί να μειώσει το κόστος της υδρόλυσης (Steele *et al.*, 2005; Cardona & Sánchez, 2007; Tu *et al.*, 2009).

1.4 Διεργασίες παραγωγής βιοαιθανόλης

Στη βιβλιογραφία συχνά ορίζεται ότι μία διαδικασία παραγωγής αιθανόλης βασισμένη στη λιγνινοκυτταρίνη απαιτεί έναν οργανισμό που με ζύμωση να μπορεί να μετατρέψει ταυτόχρονα τις πεντόζες και εξόζες σε αιθανόλη (Lachke, 2002; Hahn-Hägerdal *et al.*, 2007). Η διεργασία της ενζυμικής υδρόλυσης μπορεί να σχεδιαστεί με διάφορους τρόπους. Τα βήματα που ακολουθούν την προκατεργασία, δηλαδή η ενζυμική υδρόλυση και η ζύμωση των σακχάρων, μπορούν να διεξαχθούν ξεχωριστά σε διαφορετικούς αντιδραστήρες (διακριτή υδρόλυση και ζύμωση, SHF) ή ταυτόχρονα στον ίδιο αντιδραστήρα (ταυτόχρονη σακχαροποίηση και ζύμωση, SSF) (Galbe & Zacchi, 2002). Η βέλτιστη θερμοκρασία για την ενζυμική υδρόλυση γίνεται

περίπου στους 45-50 °C και η ζύμωση στους 30-33 °C. Βασικό πλεονέκτημα της διεργασίας SHF είναι η ικανότητα εφαρμογής των άριστων συνθηκών και για τις δύο διεργασίες. Ωστόσο η διεργασία SHF μειονεκτεί έναντι της SSF καθώς τα σάκχαρα που απελευθερώνονται, παρεμποδίζουν τα ένζυμα κατά την υδρόλυση, ενώ στη διεργασία SSF, τα παραγόμενα σάκχαρα καταναλώνονται άμεσα από το μικροοργανισμό της ζύμωσης και αποφεύγεται η παρεμπόδιση της δράσης της β-γλυκοζιδάσης. Επιπλέον, η ζύμη μπορεί να παρεμποδιστεί από τις υψηλές συγκεντρώσεις της γλυκόζης. Επομένως αποτελεί ακόμη ένα πλεονέκτημα για τη ζύμωση, η προσθήκη της ζύμης, προτού η συγκέντρωση της γλυκόζης φτάσει σε υψηλά επίπεδα. Αξίζει, εντούτοις, να σημειωθεί ότι η αιθανόλη μπορεί επίσης να εμποδίσει τα κυτταρινολυτικά ένζυμα (Holtzapfel *et al.*, 1990; Yourchisin, 2004). Ένα ακόμη πλεονέκτημα της διεργασίας SSF σε σύγκριση με την SHF είναι η ενσωμάτωση των διεργασιών της υδρόλυσης και της ζύμωσης σε έναν κοινό αντιδραστήρα. Η διεργασία γίνεται συμβιβαστικά στους 35 °C, αλλά η ανάπτυξη ανασυνδυασμένων στελεχών ζύμης αναμένεται να βελτιώσει την απόδοσή της. Τέλος, ένα σημαντικό μειονέκτημα της SSF είναι η δυσκολία ανακύκλωσης και επαναχρησιμοποίησης της ζύμης γιατί αναμιγνύεται με τα υπολείμματα της λιγνίνης (Galbe & Zacchi, 2002).

Επίσης, μια άλλη μέθοδος είναι η άμεση μικροβιακή μετατροπή (Direct Microbial Conversion, DMC ή Consolidated Bioprocessing, CBP). Σ' αυτήν, όλα τα απαραίτητα στάδια βιομετατροπής του κυτταρινούχου υλικού σε αιθανόλη, δηλαδή η παραγωγή των σακχαρολυτικών ενζύμων (κυτταρινάσες, ημικυτταρινάσες), η υδρόλυση του υποστρώματος σε απλούστερα σάκχαρα (πεντόζες και εξόζες) και η ζύμωση αυτών των σακχάρων σε αιθανόλη, πραγματοποιούνται σε ένα μόνο στάδιο (Panagiotou *et al.*, 2005).

1.5 Μικροβιακή Βιομετατροπή Λιγνινοκυτταρινούχων υλικών

1.5.1 Μικροοργανισμοί στην παραγωγή βιοαιθανόλης

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 δημοσιευθεί για την παραγωγή

αιθανόλης από διάφορους μικροοργανισμούς, όπως βακτήρια, ζύμες και μύκητες (Demirbas 2005; Lin & Tanaka 2006). 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 (Galbe & Zacchi, 2002; Sonderegger *et al.*, 2004; Lin & Tanaka 2006; Almeida *et al.*, 2007). Η ζύμη *S. cerevisiae* μεταβολίζει την γλυκόζη σε αιθανόλη μέσω του μονοπατιού Embden-Meyerhof-Parnas (EMP). 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; Lin & Tanaka 2006; 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 *Zymomonas* να παράγουν λιγότερη κυτταρική βιομάζα σε σχέση με τη ζύμη και να διοχετεύουν μεγαλύτερο ποσοστό της πηγής άνθρακα προς μεταβολικά προϊόντα.

Το βακτήριο *Zymomonas 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 (Galbe & Zacchi, 2002; Dien *et al.*, 2003; Lin & Tanaka 2006; Olofsson *et al.*, 2008).

Η επεξεργασία των λιγνινοκυτταρινούχων υποστρωμάτων οδηγεί σε πεντόζες, αντίθετα από την επεξεργασία των σακχαρούχων και αμυλούχων υποστρωμάτων όπου εδώ απελευθερώνονται μόνο μονομερή γλυκόζης. Όμως η ζύμη *S. cerevisiae* και το βακτήριο *Z. mobilis* δε 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 χαμηλές τιμές pH (Prasad *et al.*, 2006; Agbogbo & Coward-Kelly, 2008; 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 ξυλάνης (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 των αντιδράσεων που καταλύονται από την αναγωγή της ξυλόζης (XR) και την αφυδρογονάση της ξυλιτόλης (XDH), αντίστοιχα (Zaldivar *et al.*, 2001; vanVleet *et al.*, 2009).

1.5.2 Μικροοργανισμοί στην παραγωγή ενζύμων

Η αξιοποίηση των λιγνινοκυτταρινούχων υποστρωμάτων απαιτεί τη χρήση εξειδικευμένων υδρολυτικών ενζύμων, όπως κυτταρινάσες και ημικυτταρινάσες, τα οποία διασπούν τα υλικά σε ζυμώσιμα σάκχαρα. Υπάρχουν αρκετοί μικροοργανισμοί που διαβιούν επί των φυσικών λιγνινοκυτταρινούχων υποστρωμάτων και παράγουν τα απαραίτητα υδρολυτικά ένζυμα, τόσο βακτήρια όσο και μύκητες, αερόβιοι ή αναερόβιοι, μεσόφιλοι ή θερμοφιλοι (Tengerdy & Szakacs 2003; Balat *et al.*, 2008; Kumar *et al.*, 2008; Olofsson *et al.*, 2008). Όπως έχει ήδη αναφερθεί, τα υδρολυτικά ένζυμα βρίσκονται είτε ελεύθερα είτε σε συμπλέγματα. Τα συμπλέγματα υδρολυτικών ενζύμων (cellulosomes) συνήθως υπάρχουν σε αναερόβια βακτήρια και μύκητες, ενώ οι αερόβιοι μικροοργανισμοί παράγουν συνήθως ξεχωριστά ένζυμα που εκκρίνονται στο μέσο ανάπτυξης (Gray *et al.*, 2006; Kumar *et al.*, 2008).

Οι νηματοειδείς μύκητες είναι η κύρια πηγή εμπορικών κυτταρινασών και ημικυτταρινασών (Gusakov *et al.*, 2007; Kumar *et al.*, 2008). Οι μύκητες του γένους *Trichoderma* είναι από τους πιο αποδοτικούς μικροοργανισμούς στην υδρόλυση της κυτταρίνης, ιδιαίτερα ο *T. reesei* που έχει χρησιμοποιηθεί ευρέως για την παραγωγή

εμπορικών κυτταρινασών (Galbe & Zacchi 2002; Howard *et al.*, 2003; Tengerdy & Szakacs 2003; Balat *et al.*, 2008; Olofsson *et al.*, 2008; Kumar *et al.*, 2008).

1.5.3 Μικροοργανισμοί για ενοποιημένες βιοδιεργασίες (CBP)

Υποψήφιοι μικροοργανισμοί για ενοποιημένες βιοδιεργασίες (CBP) παραγωγής βιοαιθανόλης από λιγνινοκυτταρινούχα υλικά είναι ορισμένοι μύκητες όπως *Fusarium oxysporum*, *Neurospora crassa*, *Monilia*, *Rhizopus*, *Aspergillus* και *Trichoderma*. Οι μύκητες αυτοί παράγουν έναν μεγάλο αριθμό από υδρολυτικά ένζυμα και μπορούν να μετατρέπουν τα παραγόμενα από την υδρόλυση σάκχαρα σε αιθανόλη (Lynd *et al.*, 2005; Panagiotou *et al.*, 2005; Cardona & Sánchez, 2007; Van Zyl *et al.*, 2007; Chandel *et al.*, 2007; Xu 2009).

Ο μύκητας *Fusarium oxysporum* είναι ένας νηματοειδής μύκητας, ο οποίος διαθέτει την ικανότητα μετατροπής της κυτταρίνης και της ημικυτταρίνης άμεσα σε αιθανόλη, μέσω διαδοχικών σταδίων υδρόλυσης και πολυσακχαριτών και ζύμωσης των ολιγοσακχαριτών που προκύπτουν (Christakopoulos *et al.*, 1989; Panagiotou *et al.*, 2003; Panagiotou *et al.*, 2005a; Xiros *et al.*, 2009). Ο *F.oxysporum* παράγει ένα μεγάλο εύρος χαρακτηρισμένων κυτταρινασών και ξυλανασών (Christakopoulos *et al.*, 1996; Panagiotou *et al.*, 2005a; Xiros *et al.*, 2009) αλλά η μετατροπή της κυτταρίνης προς αιθανόλη είναι μια αργή διαδικασία και έχει ως αποτέλεσμα τον σχηματισμό σημαντικών ποσοτήτων οξικού οξέος ως παραπροϊόν (Panagiotou *et al.*, 2005a; Chandel *et al.*, 2007).

Ο μύκητας *N. crassa* είναι ένας νηματοειδής μύκητας, ικανός να συνθέτει και να εκκρίνει υψηλά επίπεδα από τους τρεις τύπους ενζύμων που απαιτούνται για την αποικοδόμηση της κυτταρίνης (Yazdi *et al.*, 1990; Romero *et al.*, 1999; Dogaris *et al.*, 2009a; Xiros *et al.*, 2008) καθώς και τα ημικυτταρινολυτικά ένζυμα ενδοξυλανάση και β-ξυλοζιδάση (Mishra *et al.*, 1986; Deshpande *et al.*, 1986a; Xiros *et al.*, 2008; Dogaris *et al.*, 2009a). Ο *N. crassa* είναι ένας από τους λίγους μικροοργανισμούς που μπορούν να ζυμώσουν την κυτταρίνη και την ημικυτταρίνη προς αιθανόλη σε ένα στάδιο (Rao *et al.*, 1985; Deshpande *et al.*, 1986b; Christakopoulos *et al.*, 1989; Rawat *et al.*, 1983; Phadtare *et al.*, 1997; Xiros *et al.*, 2008; Dogaris *et al.*, 2009a).

1.5.4 Γενετική Μηχανική Μικροοργανισμών

Λόγω της έλλειψης ενός φυσικού μικροοργανισμού για την πλήρη και αποτελεσματική ζύμωση των λιγνινοκυτταρινούχων υποστρωμάτων έχει δοθεί έμφαση στην κατασκευή ενός αποδοτικού οργανισμού μέσω τεχνικών γενετικής και μεταβολικής μηχανικής από διαφορετικούς μικροοργανισμούς. Σήμερα οι προσπάθειες έχουν επικεντρωθεί πάνω σε τρεις μικροβιακούς φορείς, *S. cerevisiae*, *Z. Mobilis* και *E. coli* (Claassen *et al.*, 1999; Aristidou & Penttila 2000; Zaldivar *et al.*, 2001; Mielenz 2001; Galbe & Zacchi 2002; Dien *et al.*, 2003; Howard *et al.*, 2003; Sondereger *et al.*, 2004; Demirbas 2005; Mosier 2005; Prasad *et al.*, 2007).

Υπάρχουν πολλές αναφορές για γενετική τροποποίηση συγκεκριμένων βακτηρίων, όπως *Escherichia Coli* και *Klebsiella oxytoca* με σκοπό να αποκτήσουν την ικανότητα παραγωγής αιθανόλης (Ingram *et al.*, 1987; de Carcahlo Lima *et al.*, 2002; Dien *et al.*, 2000; Dumsday *et al.*, 1999; Qian *et al.*, 2003; Zaldivar *et al.*, 2000; Zhou *et al.*, 2001; Dien *et al.*, 2003). Επειδή αυτά τα στελέχη μπορούν να αξιοποιούν ένα μεγάλο εύρος υδατανθράκων, όπως εξόζες και πεντόζες, θεωρούνται εξοπλισμένα για την παραγωγή αιθανόλης από υδατάνθρακες προερχόμενους από λιγνινοκυτταρινούχα υλικά (Ingram *et al.*, 1999; Prasad *et al.*, 2007). Παρ' όλα αυτά ο ρυθμός μεταβολισμού εξοζών του βακτηρίου *E. coli* είναι κατώτερος αυτού του *Z. mobilis* το οποίο είναι ένα υποχρεωτικά αιθανολοπαραγωγό βακτήριο (Zhang *et al.*, 1995).

Αξιοποιώντας γενετικά τροποποιημένους μικροοργανισμούς, που μπορούν να μετατρέψουν τις πεντόζες σε αιθανόλη, αυξάνεται σημαντικά η αποτελεσματικότητα παραγωγής αιθανόλης από λιγνινοκυτταρινούχα υλικά. Τα κατασκευασμένα οπερόνια που περιλαμβάνουν γονίδια αφομοίωσης της ξυλόζης καθώς και απαραίτητων ενζύμων του μονοπατιού των φωσφορικών πεντοζών (PPP) έχουν μεταφερθεί στο βακτήριο *Z. mobilis* με σκοπό την αποτελεσματική ζύμωση της ξυλόζης σε αιθανόλη (Zhang *et al.*, 1995; Dien *et al.*, 2003).

Η ζύμη *S. cerevisiae* δεν είναι ικανή να μεταβολίζει την ξυλόζη λόγω έλλειψης των ενζύμων XR και XDH, τα οποία καταλύουν τα δύο πρώτα βήματα του μεταβολισμού της ξυλόζης στις ζύμες. Οι προσπάθειες της μεταβολικής μηχανικής της ζύμης *S. cerevisiae* για αξιοποίηση ξυλόζης περιλάμβαναν την εισαγωγή των γονιδίων που

κωδικοποιούν για τα XR και XDH από τη ζύμη *P. stipitis* και την υπερέκφραση ενδογενούς XK, αλλά είχαν ως αποτέλεσμα τη χαμηλή παραγωγή αιθανόλης με παραγωγή κυρίως ξυλιτόλης υπό αναερόβιες συνθήκες (Jin *et al.*, 2000; Che & Lee 2007; Hahn-Hagerdal *et al.*, 2007a; Hahn-Hagerdal *et al.*, 2007b; Jeffries 2006; Jeffries&Jin 2004). Έτσι έχουν μελετηθεί αρκετές στρατηγικές μεταβολικής μηχανικής για την βελτίωση της ζύμωσης της ξυλόζης από τα τροποποιημένα XR-XDH-XK στελέχη *S. cerevisiae* και οι οποίες περιλαμβάνουν την αριστοποίηση του λόγου των ενζύμων XR/XDH/XK (Eliasson *et al.*, 2001; Matsushika & Sawayama 2008), την ετερόλογη έκφραση μεταφορέων της ξυλόζης από *Trichoderma reesei* (Xlt1) (Hector *et al.*, 2008) και *Arabidopsis thaliana* (At5g59250 και At5g17010) (Saloheimo *et al.*, 2007) καθώς και τη χρήση συνενζύμων με τροποποιημένη συγγένεια προς το υπόστρωμα (Matsushika *et al.*, 2008a; Matsushika *et al.*, 2008b).

1.6 Παραγόμενοι παρεμποδιστές

Υπάρχουν ουσίες που είτε απελευθερώνονται κατά την προκατεργασία, είτε βρίσκονται ήδη στο αρχικό υλικό όπως το οξικό οξύ, ή σχηματίζονται κατά την προκατεργασία, δρουν παρεμποδιστικά για τους μικροοργανισμούς (Klinke HB, Thomsen A Band Ahring BK, 2004; Palmqvist E & Hahn-Hagerdal B, 2000). Οι κυριότερες παρεμποδιστικές ενώσεις που ανιχνεύονται στην υγρή φάση μετά την κατεργασία είναι η φουρφουράλη ή 2-φουραλεϋδη και η υδροξυμεθυλ-φουρφουράλη ή 5-υδροξυμεθυλ-2-φουραλεϋδη (HMF), οι οποίες προκύπτουν από την αποικοδόμηση των πεντοζών και εξοζών, αντίστοιχα.

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

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). Οι φουρφουράλες παρεμποδίζουν ενδοκυτταρικά ένζυμα, όπως την

αλκοολική αφυδρογονάση, την αλδεϋδική αφυδρογονάση και την πυροσταφυλική αφυδρογονάση (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 (Almeida *et al.*, 2007; Joao RM Almeida, Tobias Modig, Anneli Petersson, Barbel Hahn-Hagerdal, Gunnar Liden and Marie F Gorwa Grauslund, 2007; Almeida J R *et al.*, 2007).

Η παρεμπόδιση της μαγιάς κατά τη διαδικασία της ζύμωσης από τις φουράνες, τα ασθενή οξέα και τις φαινόλες είναι ένα σημαντικό εμπόδιο για την παραγωγή αιθανόλης σε μεγάλη κλίμακα από λιγνινοκυτταρίνη. Υπάρχουν αρκετές μελέτες στρατηγικής για να ξεπεραστούν τα προβλήματα παρεμπόδισης. Η *αποτοξίνωση υδρολυμάτων* δηλαδή απομάκρυνση παρεμποδιστών αποτελεί μία μέθοδο αρκετά μεγάλου κόστους η οποία δεν ενδείκνυται για εφαρμογή (von Sivers M, Zacchi G, Olsson L and Hahn-Hagerdal B, 1994). Ένας άλλος λόγος μη εφαρμογής της μεθόδου είναι ότι υπάρχει δυνατότητα απώλειας ζυμώσιμων σακχάρων που έχει ως αποτέλεσμα τη μειωμένη παραγωγή αιθανόλης (Rivard C, Engel R, Hayward T, Nagle N, Hatzis C και Philippidis G, 1996). Μια αρκετά συμφέρουσα στρατηγική είναι η χρήση μαγιάς με βελτιωμένη ανοχή στους παρεμποδιστές. Αυτό μπορεί να επιτευχθεί είτε με τη Γενετική Μηχανική είτε με την Εξελικτική μηχανική, μέθοδος που είναι ακόμα σε στάδιο συζήτησης.

Ο ρόλος της Φουρφουράλης

Η φουρφουράλη παρεμποδίζει την *in vitro* δραστηριότητα σημαντικών γλυκολυτικών ενζύμων με αποτέλεσμα την μείωση του ρυθμού αναπαραγωγής του μικροβιακού πληθυσμού και της παραγωγικότητας της καλλιέργειας σε αιθανόλη (Taherzadeh M.J. *et al.*, 1999).

Ο σαφής προσδιορισμός της σχέσης συγκέντρωσης φουρφουράλης και παρεμπόδισης δεν είναι μία εύκολη διαδικασία καθώς επηρεάζεται από πολλούς παράγοντες. Κύριο ρόλο για τον προσδιορισμό αυτής έχει το είδος του μικροοργανισμού που χρησιμοποιείται αλλά και η αρχική συγκέντρωση εμβολιασμού της καλλιέργειας (Lisbeth Olsson and Bebel Hahn-Hiigerdal, 1996; Taherzadeh M.J. *et al*, 1999).

Στην διεθνή βιβλιογραφία συναντάται πλήθος μελετών πάνω στο ζήτημα μεποικίλες απόψεις. Συγκεντρώσεις πάνω από 1 g/L σε καλλιέργειες Sc έχει βρεθεί ότι μειώνουν σημαντικά το ρυθμό απόληψης CO₂ (Sanchez B., Bautista J., 1988; Banerjee N. *et al*, 1981b) και τον πολλαπλασιασμό των κυττάρων στο αρχικό στάδιο της ζύμωσης. Επίσης αναφέρεται πως αντίστοιχη προσθήκη σε καλλιέργεια *Pichiastipitis* μειώνει την αύξηση του πληθυσμού κατά 47% και κατά 71% την απόδοση της ζύμωσης (Martin M. *et al*, 1992). Παρόλα αυτά στις έρευνες αυτές δεν αναφέρεται η αρχική ποσότητα εμβολιασμού.

Σε έρευνα με χρήση υψηλής αρχικής ποσότητας εμβολιασμού Sc (Azhar A.F. *et al*, 1981), της τάξης των 3,5 g/L παρατηρήθηκαν σημαντικές μειώσεις στο ρυθμό αύξησης του μικροβιακού πληθυσμού και στον ρυθμό παραγωγής αιθανόλης με προσθήκη 3,0 g/L φουρφουράλης. Σε αντίστοιχη έρευνα προσθήκη 4,0 g/L φουρφουράλης είχε ως αποτέλεσμα μείωση 65% στην απόληψη CO₂, 57% στην παραγωγή αιθανόλης και 89% στο ρυθμό αύξησης (M. J. Taherzadeh, 1999). Ωστόσο για μεγαλύτερη αρχική ποσότητα εμβολιασμού, της τάξης των 9,0 g/L, τα αντίστοιχα ποσοστά δεν εμφάνιζαν ιδιαίτερο ενδιαφέρον.

Γενικότερα είναι πλέον αποδεκτό πως η φουρφουράλη παρατείνει την φάση στασιμότητας των μικροοργανισμών. Εφόσον καταφέρουν να ξεπεράσουν την φάση αυτή η φουρφουράλη μεταβολίζεται σε φουρφουριλική αλκοόλη, η οποία δεν παρεμβαίνει στην παραγωγή αλκοόλης (M. J. Taherzadeh, 1999). Επίσης η συνολική παραγωγικότητα αιθανόλης δεν περιορίζεται αν και ο απαιτούμενος χρόνος παραγωγής της αυξάνεται. Τέλος τα προβλήματα αυτά μπορούν να περιοριστούν χρησιμοποιώντας μεγαλύτερη αρχική συγκέντρωση εμβολιασμού.

Ο ρόλος της HMF

Η 5-υδροξυ-μέθυλ-φουρφοουράλη επιδρά παρεμποδιστικά στην διαδικασία της ζύμωσης με τρόπο παρόμοιο με αυτό της φουρφοουράλης. Έχει βρεθεί πως η HMF έχει ασθενέστερη δράση, όμως παραμένει στην καλλιέργεια για τετραπλάσιο χρόνο από τον αντίστοιχο της φουρφοουράλης (M. J. Taherzadeh, 1999).

Συγκέντρωση HMF 1 g/L βρέθηκε να μην έχει παρεμποδιστική δράση σε ζύμη. Όμως αντίστοιχη προσθήκη 2 g/L είχε ως αποτέλεσμα την ελαφρά μείωση της ποσότητας πρωτεϊνών και μείωση της του ρυθμού ανάπτυξης κατά 23% (Brovenko GN, Gusel'nikova TV, 1993). Σε άλλη έρευνα πάνω σε καλλιέργεια *Sc* συγκέντρωση 2 g/L απλώς επιμήκυνε την φάση στασιμότητας της καλλιέργειας (Sanchez B, Bautista J, 1988). Προσθήκη 4 g/L είχε ως αποτέλεσμα μείωση 32% στην απόληψη CO₂, 40% στην παραγωγή αιθανόλης και 70% στο ρυθμό αύξησης των μικροοργανισμών (M. J. Taherzadeh, 1999). Ωστόσο έχει βρεθεί πως αύξηση στην αρχική συγκέντρωση γλυκόζης μειώνει την επίδραση της HMF (J. R. Mielenz, 2001).

1.7 Οικονομικά στοιχεία παραγωγής βιοαιθανόλης

Από τη στιγμή που τα Στελέχη Αραβόσιτου (Σ.Α.) (ως πρώτη ύλη) απέκτησαν ενδιαφέρον για την παραγωγή αιθανόλης και παραγωγή ενέργειας, αποδείχθηκε ότι μπορεί να αποτελέσει σημαντική πηγή κερδοφορίας για τους παραγωγούς. Τα Σ.Α. συλλέγονται σε μεγάλα, κυλινδρικά δέματα ύστερα από την περισυλλογή τους από ολόκληρη την έκταση της καλλιέργειας.



Σχήμα 1.9: Συγκομιδή αραβόσιτου



Σχήμα 1.10: Τεμαχισμός υπολειμμάτων αραβόσιτου (cornstover)



Σχήμα 1.11: Παραλαβή και εφοδιασμός τεμαχισμένων υπολειμμάτων αραβόσιτου (cornstover)

Ολόκληρη η διαδικασία απαιτεί κάποιο κόστος, το κόστος συγκομιδής και το κόστος εφοδιασμού. Το κόστος συγκομιδής περιλαμβάνει το κόστος του καυσίμου, του εργατικού δυναμικού, του εξοπλισμού καθώς και χρησιμοποιούμενα θρεπτικά συστατικά. Το κόστος εφοδιασμού περιλαμβάνει το κόστος αποθήκευσης, φορτώματος, ξεφορτώματος καθώς και τη μεταφορά τους. Το ολικό κόστος κυμαίνεται μεταξύ 82,19 \$/tn (92,88 €/tn) και 100,56 \$/tn (113,63 €/tn) (ξηρό βάρος). Ακόμη και στο κόστος των 88,19 \$/tn (99,66 €/tn) παρέχονται αρκετά κέρδη στους παραγωγούς ώστε να στραφούν σε μεγαλύτερη παραγωγή αραβόσιτου. Απαιτείται όμως περαιτέρω έρευνα πάνω στον αραβόσιτο ώστε να καθοριστεί η παραγωγή και η τιμή του.

Η διαδικασία συγκομιδής και εφοδιασμού των υπολειμμάτων στα βιοδυλιστήρια αποτελεί το βασικό πρώτο βήμα για την παραγωγή ενέργειας από λιγνινοκυτταρινούχα υλικά.

Ύστερα από μελέτη του τμήματος Γεωργικής Οικονομίας του πανεπιστημίου του Purdue των ΗΠΑ έδειξε ότι από έκταση 257,31 km² εξήχθησαν υπολείμματα καλαμποκιού με ρυθμό ίσο με 2,49 tn/ha (1 ha=4046,9 m²=0,0041 km²) με τιμή 88,19 \$/tn (99,66 €/tn) (ξηρό βάρος). (Ισοτιμία € και \$: 1 €=1,13 \$)

Μελετητές ερευνούν νέους τρόπους συγκομιδής ώστε με βελτίωση της τεχνολογίας συγκομιδής να επιτευχθεί μεγαλύτερη παραγωγή ενέργειας με χαμηλότερο κόστος (Thompson J.L., 2014).

2 Υλικά και Μέθοδοι

2.1 Μικροοργανισμός

Στην παρούσα μελέτη χρησιμοποιήθηκε η ζύμη *S. cerevisiae Ethanol Red^R* από την Fermentis σε αεροστεγείς συσκευασίες υπό κενό για τα πειράματα ζύμωσης (Lesaffre, France).

2.2 Πρώτες ύλες και χημικά αντιδραστήρια

Το υπόλειμμα στελέχους αραβόσιτου ($93.9\% \pm 0.1\%$ ξηρό βάρος) που χρησιμοποιήθηκε στην παρούσα διπλωματική εργασία προμηθεύτηκε από το τμήμα Γεωργίας, Φυτικής Παραγωγής και αγροτικού περιβάλλοντος του πανεπιστημίου Θεσσαλίας. Η συγκομιδή έγινε το Σεπτέμβριο του 2013 από τον πειραματικό αγρό του πανεπιστημίου, ο οποίος βρίσκεται στο Βελεστίνο Μαγνησίας, Ελλάδα (γεωγραφικό πλάτος $39^{\circ} 23'$ βόρεια, γεωγραφικό μήκος $22^{\circ} 45'$ Ανατολικά) και καλύπτει μια έκταση 15 εκταρίων αρόσιμης γης. Τα στελέχη αραβόσιτου αποξηράνθηκαν και εξήχθη το χονδροκομμένο υπόλειμμα, το οποίο στη συνέχεια αλέστηκε χρησιμοποιώντας εργαστηριακούς μύλους, περνώντας από οπές 75mm και αποθηκεύτηκε σε πλαστικά δοχεία. Τα δοχεία αποθηκεύτηκαν σε θερμοκρασία δωματίου ερμητικά κλειστά.

Τα χημικά αντιδραστήρια που χρησιμοποιήθηκαν ήταν καθαρότητας αναλυτικού βαθμού. Κατά τη διάρκεια των πειραμάτων ενζυμικής υδρόλυσης χρησιμοποιήθηκαν τα εμπορικά ενζυμικά σκευάσματα Cellic[®] CTec2, Celluclast[®] 1,5L (κυτταρινάσες από τον μύκητα *Trichoderma reesei*) και Novozyme 188 (β -γλυκοσιδάση από το μύκητα *Aspergillus niger*) της εταιρείας Novozymes (Δανία).

2.3 Όργανα

- Φωτόμετρο, Boeco (Γερμανία)
- pH-μετρο WTW-537 (Γερμανία)
- Ηλεκτρονικοί ζυγοί ακριβείας
- Θερμοστατούμενοι περιστροφικοί αναδευτήρες (Zhicheng 211C, Κίνα)
- Ξηραντήρες
- Φούρνος μικροκυμάτων (Microwave digestion equipment, speed-wave™ MWS-2, Berghof Instruments GmbH, Γερμανία)
- Thermomixer (Eppendorf)
- Microplate (Molecular devices)
- Συσκευή υγρής χρωματογραφίας υψηλής απόδοσης (HPLC-Shimadzu LC-20AD), με ανιχνευτή δείκτη διάθλασης (RI-Shimadzu RID 10A).

2.4 Υδροθερμική προκατεργασία Στελεχών Αραβόσιτου

Για την προκατεργασία των υπολειμμάτων του αραβόσιτου χρησιμοποιήθηκε συσκευή χώνεψης μικροκυμάτων (Microwave digestion equipment, speed wave TM 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 και θερμοκρασία. Η ισχύς της συσκευής μικροκυμάτων ορίστηκε στα 700 W.

Μελετήθηκαν ένα πλήθος από διαφορετικές συνθήκες λειτουργίας, όπου ο χρόνος προκατεργασίας κυμάνθηκε μεταξύ 9 και 51 λεπτών και η θερμοκρασία ρυθμίστηκε σε τιμές μεταξύ 170 και 230 °C. Για τη σύγκριση με τη βιβλιογραφία, ο συνδυασμός των παραπάνω παραγόντων εκφράστηκε με το δείκτη έντασης (Severity Factor) SF (Overend & Chornet, 1989), ο οποίος υπολογίζεται σύμφωνα με την ακόλουθη εξίσωση:

$$\log(\text{SF}) = \log[t \cdot e^{(T-100)/14,75}]$$

όπου **t**, ο χρόνος κατεργασίας (min) και **T**, η θερμοκρασία (°C).

Να σημειωθεί ότι διεξήχθησαν πειράματα σε ακραίες συνθήκες θερμοκρασίας (240 °C για 9 min) για να διαπιστωθεί η μετέπειτα εξέλιξη του υλικού, δηλαδή σε συνθήκες πέραν της βέλτιστης.

Όταν η προκατεργασία διεξάγεται υπό όξινες συνθήκες μπορεί να εκτιμηθεί και η επίδραση του pH χρησιμοποιώντας τον “συνδυασμένο παράγοντα έντασης” (combined severity) που ορίζεται ως (Galbe & Zacchi 2007; Olofsson *et al.*, 2008):

$$\text{Combined Severity (CS)} = \log(\text{SF}) - \text{pH}$$

Η διαδικασία της προκατεργασίας πραγματοποιήθηκε σε συγκέντρωση στερεών ίση με 10% w/v σε αραιό διάλυμα οξικού οξέος (0,3% v/v). Πριν τη διαδικασία προκατεργασίας, το εναιώρημα των υπολειμμάτων αραβόσιτου παρέμενε για μια

ώρα στους 80 °C. Σε κάθε δείγμα προκατεργασμένου υπολείμματος αραβόσιτου διαχωρίστηκε η υγρή από τη στερεή φάση με διήθηση υπό κενό σε προζυγισμένο διηθητικό χαρτί και ξηράθηκε μέχρι σταθερού βάρους στους 60 °C. Στη στερεή φάση έγινε εκτίμηση της σύστασής της σε κυτταρίνη και ημικυτταρίνη σύμφωνα με τη μέθοδο του NREL (§2.8) και πραγματοποιήθηκαν τα επακόλουθα πειράματα υδρόλυσης.

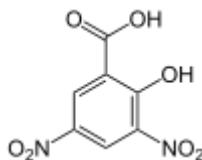
2.5 Υδρόλυση Στελεχών Αραβόσιτου

Για την υδρόλυση των υπολειμμάτων αραβόσιτου χρησιμοποιήθηκε το μίγμα Celluclast® 1.5L - Novozym 188 σε αναλογίες 5:1 v/v, ενώ οι αντιδράσεις πραγματοποιήθηκαν σε thermomixer (Eppendorf). Σε κάθε περίπτωση ο όγκος της αντίδρασης ήταν 1.5 mL, ενώ η συγκέντρωση στερεών ήταν 3% w/v. Το ενζυμικό σκεύασμα αραιωνόταν κατάλληλα με ρυθμιστικό διάλυμα κιτρικών/φωσφορικών 50 mM με pH=5.0 ώστε η τελική ενεργότητα ολικής κυτταρινάσης να είναι ίση με 10 FPU/g υπολειμμάτων αραβόσιτου. Η θερμοκρασία της υδρόλυσης ήταν 50 °C και σε κάθε μίγμα προστέθηκε αζίδιο του νατρίου (τελικής συγκέντρωσης 0.01% w/v) με σκοπό την αποτροπή μικροβιακής μόλυνσης. Σε τακτά χρονικά διαστήματα (2, 4, 6, 8, 24, 48 h) λαμβάνονταν δείγματα προκειμένου να μετρηθούν τα αναγωγικά σάκχαρα και η γλυκόζη μέσω ενζυμικού σκεύασματος (BIOSIS). Τα πειράματα πραγματοποιήθηκαν εις διπλούν. Τέλος να σημειωθεί ότι πραγματοποιήθηκαν αραιώσεις ώστε να γίνουν οι κατάλληλες μετρήσεις. Στις 2, 4, 6, και 8h έγινε αραιώση (1:10) ενώ στις 24, 48h (1:20).

2.6 Μέτρηση αναγωγικών σακχάρων με τη μέθοδο DNS

Τα αναγωγικά σάκχαρα είναι τα σάκχαρα που έχουν ελεύθερο το ημιακεταλικό OH και που περιέχουν αλδεϋδική ομάδα στην ανοιχτή τους μορφή. Η απελευθέρωση των αναγωγικών σακχάρων προσδιορίστηκε με τη μέθοδο του 3,5 δινιτροσακυλικού οξέως (DNS) (Miller, 1959). Σύμφωνα με τη μέθοδο του δινιτροσακυλικού οξέως, σε 250 μ L δείγματος προστίθενται 250 μ L διαλύματος DNS και πραγματοποιείται

βρασμός για 5 min. Ακολουθεί προσθήκη 2 mL απιονισμένου νερού και φωτομέτρηση στα 540 nm. Τα αναγωγικά σάκχαρα εκφράστηκαν μέσω καμπύλης αναφοράς σε ισοδύναμα γλυκόζης.



Σχήμα 2.1: Μοριακός Τύπος 3,5 δινιτροσακυλικού οξέως (DNS)

2.7 Μέτρηση γλυκόζης

Ο προσδιορισμός πραγματοποιήθηκε ενζυμικά με το σύστημα ενζύμων GOD/PAP (Glucose oxidase-peroxidase). Σύμφωνα με τη μέθοδο, σε 240 μL ενζύμου γίνεται προσθήκη 10 μL από το αραιωμένο διάλυμα. Αυτά τοποθετούνταν σε μία πλάκα 96-well ELISA microplate, η οποία επωαζόταν για 15 min σε θερμοκρασία 37 °C και η απορρόφηση μετρούταν στα 510 nm.

2.8 Ανάλυση στερεού υπολείμματος – Μέθοδος NREL

Η ανάλυση του στερεού υπολείμματος της προκατεργασίας 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 H_2SO_4 για 60 min στους 30 °C, έπειτα αραιώση με 84 mL απιονισμένο νερό και επώαση σε κλίβανο αποστείρωσης στους 121 °C για 60 min. Μετά από εξουδετέρωση με CaCO_3 , τα διαλύματα αφέθηκαν σε ηρεμία ώστε να διαχωριστούν τα στερεά από την υγρή φάση και ακολούθησε προσδιορισμός των σακχάρων της υγρής φάσης με τη χρήση DNS. Η λιγνίνη υπολογίστηκε με τη χρήση φωτόμετρου στα 210 nm. Το δείγμα (υγρό κλάσμα) αραιώθηκε με 4% H_2SO_4 w/v. Η τέφρα προσδιορίστηκε υπολογίζοντας τη διαφορά βάρους άδειας, προζυγισμένης κάψας με ξηρής η οποία είχε το υλικό. Η κάψα (με το υλικό) ξηράνθηκε στους 550 °C.

2.9 Μέτρηση ενεργότητας ενζύμων

Η ενεργότητα των ενζυμικών σκευασμάτων εκφράστηκε με την ολική κυτταρινολυτική ενεργότητα (Filter Paper Activity) και εκφράστηκε ως Filter Paper Unit/mL (FPU/mL) (Ghose, 1987). Πιο συγκεκριμένα, ως υπόστρωμα χρησιμοποιήθηκε χαρτί Whatman No 1, διαστάσεων 6x1 cm. Οι αντιδράσεις πραγματοποιήθηκαν σε erppendorf.

2.10 Αναλύσεις για τον προσδιορισμό αιθανόλης και σακχάρων

Ο προσδιορισμός της αιθανόλης πραγματοποιήθηκε σε συσκευή υγρής χρωματογραφίας υψηλής απόδοσης (HPLC, Shimadzu LC-20AD) με τη χρήση ανιχνευτή δείκτη διάθλασης (RI, Shimadzu RID 10A). Κατά τη διαδικασία προσδιορισμού της αιθανόλης χρησιμοποιήθηκε η στήλη Aminex HPX-87H (Bio-Rad), με κινητή φάση 5 mM H₂SO₄, ροή 0,6 mL/min και θερμοκρασία 40 °C. Ο όγκος του δείγματος ήταν 50 μL, ενώ η διάρκεια της κάθε ανάλυσης ήταν 30 min.

2.11 RSM (Response Surface Methodology)

Στον τομέα της στατιστικής, η μεθοδολογία αποκριτικών επιφανειών (RSM), διερευνά τις σχέσεις μεταξύ των διαφόρων ερμηνευτικών μεταβλητών και μία ή περισσότερες μεταβλητές απόκρισης. Η μέθοδος εισήχθη από τους Box και Wilson (1951). Η RSM βασίζεται στη χρήση μιας ακολουθίας σχεδιασμένων πειραμάτων για τη λήψη της βέλτιστης απόκρισης. Οι Box και Wilson (1951), έχουν προτείνει τη χρήση ενός πολωνύμου δευτέρου βαθμού πάνω στο οποίο βασίζεται η μοντελοποίηση. Αναγνωρίζουν ότι το μοντέλο αυτό είναι μόνο μία προσέγγιση, αλλά το χρησιμοποιούν, διότι ένα τέτοιο μοντέλο είναι εύκολο να εκτιμηθεί και να εφαρμοστεί, ακόμη και σε περιπτώσεις που διαθέτουν μικρό αριθμό δεδομένων.

2.12 Ηλεκτρονικό Μικροσκόπιο Σάρωσης (SEM: Scanning Electron Microscopy)

Εφαρμόστηκε Ηλεκτρονική Μικροσκοπία Σάρωσης (SEM) για να παρατηρηθούν οι αλλαγές στα μορφολογικά χαρακτηριστικά των αρχικών και τελικών ξηρών κλασμάτων των ινών των υπολειμμάτων αραβόσιτου, πριν και μετά την υδροθερμική προκατεργασία στις βέλτιστες συνθήκες.

Τα προκατεργασμένα καθώς και τα μη προκατεργασμένα δείγματα ξηπλύθηκαν με απιονισμένο νερό και στη συνέχεια ξηράθηκαν στους 60 °C. Ακολούθησε επικάλυψη όλων των δειγμάτων με χρυσό με τη βοήθεια του επιστρωτή επιμετάλλωσης (Emitech K550X).

2.13 Σακχαροποίηση προκατεργασμένων Στελεχών Αραβόσιτου

Η ενζυμική σακχαροποίηση των προκατεργασμένων Σ.Α διεξήχθη σε σωλήνες φυγοκέντρωσης των 2mL σε θερμομίξερ (Eppendorf, Germany). Κάθε δείγμα Σ.Α. είχε περιεκτικότητα 3% w/v σε 100 mM κιτρικού-φωσφορικού ρυθμιστικού διαλύματος σε pH=5.0 και 10 FPU/g DM η περιεκτικότητα του ενζύμου το οποίο προέρχεται από εμπορικό διάλυμα Celluclast[®] 1.5L και Novozym[®] 188 σε αναλογία όγκου 5:1. Η σακχαροποίηση πραγματοποιήθηκε για 8 h στους 50 °C σε 700 rpm. Μικροβιακές μολύνσεις αποφεύχθηκαν με την προσθήκη 0.02% (w/v) νιτραζιδίου. Λήφθηκαν δείγματα σε διαφορετικά χρονικά διαστήματα και προσδιορίστηκαν τα διαλυτά σάκχαρα με σκοπό την εκτίμηση της υδρόλυσης της κυτταρίνης και όλων των πολυσακχαριτών.

2.14 Ζύμωση

Τα πειράματα της ζύμωσης διεξήχθησαν σε φιάλες Erlenmeyer των 100 mL με στερεά περιεκτικότητας 10% w/v προκατεργασμένου Σ.Α. σε pH 5.0 και θερμοκρασία επώασης τους 35 °C σε αναδευόμενο επωαστήρα στις 80 ± 2 rpm. Το στέλεχος της ζύμης *S. cerevisiae Ethanol Red^R* (Lesaffre, France) που αντιστοιχεί σε 15 mg/g ζύμης αρχικού DM (ξηρού βάρους), χρησιμοποιήθηκε για την αναερόβια ζύμωση χωρίς την προσθήκη επιπλέον θρεπτικών συστατικών στο ζωμό της ζύμωσης. Λήφθηκαν δείγματα σε συγκεκριμένα χρονικά διαστήματα και αναλύθηκαν για παραγωγή αιθανόλης. Κάθε δοκιμή διεξήχθηκε δύο φορές.

3 ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

3.1 Σύσταση των Στελεχών Αραβόσιτου

Το υπόλειμμα στελεχών αραβόσιτου (Σ.Α.) για αυτή τη μελέτη λήφθηκε από τη Θεσσαλία (Ελλάδα) το Σεπτέμβριο 2013 και αναλύθηκε ως προς τη σύστασή του και διαπιστώθηκε να περιέχει 38.8 ± 0.86 κυτταρίνη, 23.5 ± 1.12 ημικυτταρίνη, 20.2 ± 0.72 λιγνίνη και 5.3 ± 0.19 τέφρα σε ξηρή βάση (dry basis). Τα αποτελέσματα συμφωνούν με προηγούμενες αναφορές σύστασης για τα υπολείμματα αραβόσιτου. (Öhgren *et al.* 2007, Anvi *et al.*, 2013, Zu *et al.*, 2014).

3.2 Βελτιστοποίηση υδροθερμικής προκατεργασίας

Η προκατεργασία καθιστά το ανεπεξέργαστο υλικό πιο ευάλωτο σε κυτταρινολυτικά ένζυμα αυξάνοντας την περιεκτικότητα κυτταρίνης και απομακρύνοντας ταυτόχρονα συστατικά που εμποδίζουν την ενζυμική υδρόλυση. Προκειμένου να αυξηθεί η περιεκτικότητα των πρώτων υλών σε κυτταρίνη, είναι επιτακτική ανάγκη να εφαρμοστεί μία κατάλληλη προκατεργασία όπως αυτή της υδροθερμικής προκατεργασίας η οποία εφαρμόστηκε εκτενώς σε αυτή τη μελέτη. Κύριος στόχος αυτής της προκατεργασίας είναι η διαλυτοποίηση της ημικυτταρίνης. Η απόκριση της απελευθέρωσης γλυκόζης (g/L) μετρήθηκε σε διάφορες αντιδράσεις προκατεργασίας διαφόρων συνθηκών. Οι συνθήκες αυτές ήταν οι ανεξάρτητες μεταβλητές θερμοκρασία και χρόνος.

3.3 Μεθοδολογία Αποκριτικών Επιφανειών, RSM

Αυτή η μέθοδος, λοιπόν, εφαρμόστηκε με σκοπό να βελτιώσει την υδροθερμική προκατεργασία των υπολειμμάτων αραβόσιτου με αποτέλεσμα τα υψηλά επίπεδα ενζυμικής υδρόλυσης και επιπλέον περισσότερα ζυμώσιμα σάκχαρα. Η μέθοδος RSM αποτελείται από μαθηματικές και στατιστικές τεχνικές που χρησιμοποιούνται για την

ανάπτυξη κατάλληλης λειτουργικής σχέσης μεταξύ της απόκρισης που μας ενδιαφέρει με έναν αριθμό σχετιζόμενων μεταβλητών ελέγχου.

Ένας από τους κυριότερους σκοπούς αυτής της μεθοδολογίας είναι ο προσδιορισμός των βέλτιστων συνθηκών των μεταβλητών ελέγχου που οδηγεί σε μία μέγιστη (ή ελάχιστη) απόκριση για μία συγκεκριμένη περιοχή που μας ενδιαφέρει. Ένα 3x3 σύνθετο σχέδιο χρησιμοποιήθηκε για να βελτιστοποιήσει τις συνθήκες προκατεργασίας των στελεχών αραβόσιτου (Σ.Α.) με αραιο οξικό οξύ (CH_3COOH).

Οι δύο ανεξάρτητες μεταβλητές ήταν η θερμοκρασία (T , °C) και ο χρόνος (t , min). Τα ευρήματα και τα επίπεδα των ανεξάρτητων μεταβλητών αναγράφονται στον παρακάτω **Πίνακα 3.1** ως αποκρίσεις ανάλυσης.

Πίνακας 3.1: Εύρος τιμών για κάθε ανεξάρτητη μεταβλητή (T , t) στο κεντρικό σύνθετο σχεδιασμό (central composite design)

Μεταβλητές		
Κωδικοποιημένα επίπεδα παραγόντων	Χρόνος (min)	Θερμοκρασία (°C)
Axial point (-1.414)	9	170
Low level (-1)	15	180
Central level (0)	30	200
High level (+1)	45	220
Axial point (+1.414)	51	230

Ένα σύνολο από 13 πειράματα με κεντρικά σημεία (central points) διεξήχθησαν σε τυχαία σειρά για την ελαχιστοποίηση της επίδρασης οποιασδήποτε ανεξήγητης μεταβλητότητας στις παρατηρούμενες αποκρίσεις που οφείλονται σε εξωτερικούς παράγοντες και το κεντρικό σημείο επαναλήφθηκε 5 φορές. Το συνολικό πείραμα

αντιπροσωπεύεται από ένα πολυωνυμικό μοντέλο παλινδρόμησης δεύτερης τάξης με στόχο να σχεδιαστούν γραφήματα επιφάνειας και ισοϋψών καμπυλών (surface and contour plots):

$$G = a_0 + a_1 \cdot x_1 + a_2 \cdot x_2 + a_3 \cdot x_1^2 + a_4 \cdot x_2^2 + a_5 \cdot x_1 \cdot x_2$$

Όπου,

G: προβλεπόμενη απελευθέρωση γλυκόζης (g/L)

x_1, x_2 : κωδικοποιημένες μεταβλητές εισόδου (Τ_{προεπεξεργασίας} και διάρκεια αυτής)

a_0 : σταθερά

a_1, a_2 : συντελεστές των γραμμικών μεταβλητών εισόδου

a_3, a_4 : συντελεστών των τετραγώνων των ίδιων μεταβλητών

a_5 : συντελεστής αλληλεπίδρασης των δύο μεταβλητών

Η Ανάλυση Παλινδρόμησης πραγματοποιήθηκε για κάθε πείραμα, προκειμένου να εκτιμηθεί η επίδραση των συνδυασμένων ανεξάρτητων μεταβλητών στις αποκρίσεις χρησιμοποιώντας το στατιστικό πακέτο λογισμικού Design Expert 8.0.5 (Stat Ease, Inc. Minneapolis, USA). Για να διαπιστωθεί το μοντέλο ως το πιο κατάλληλο, ελέγχθηκε κάθε αποτέλεσμα για πιθανά γραμμικά, τετραγωνικά ή κυβικά μοντέλα.

Εφαρμόστηκε η Ανάλυση Διακύμανσης (ANOVA) για την εκτίμηση των στατιστικών παραμέτρων. Η διακύμανση εξηγείται από το μοντέλο και δίνεται από τον συντελεστή μεταβλητότητας, R^2 .

Εφαρμόστηκε για ακόμα μία φορά η Μεθοδολογία Απόκρισης Επιφανειών (RSM) για να περιγράψει την αλληλεπίδραση μεταξύ δύο παραγόντων ώστε να εκτιμηθούν οι συνθήκες προκατεργασίας οι οποίες θα μεγιστοποιήσουν την επιθυμητή απόκριση. Το εύρος τη θερμοκρασίας και της διάρκειας προκατεργασίας κυμάνθηκε από 170-230 °C και 9-51 min αντίστοιχα.

Σε αντίθεση με τους παραδοσιακούς αντιδραστήρες όπου απαιτείται σημαντικός χρόνος θέρμανσης του υλικού, με τη χρήση φούρνου μικροκυμάτων, αντίθετα,

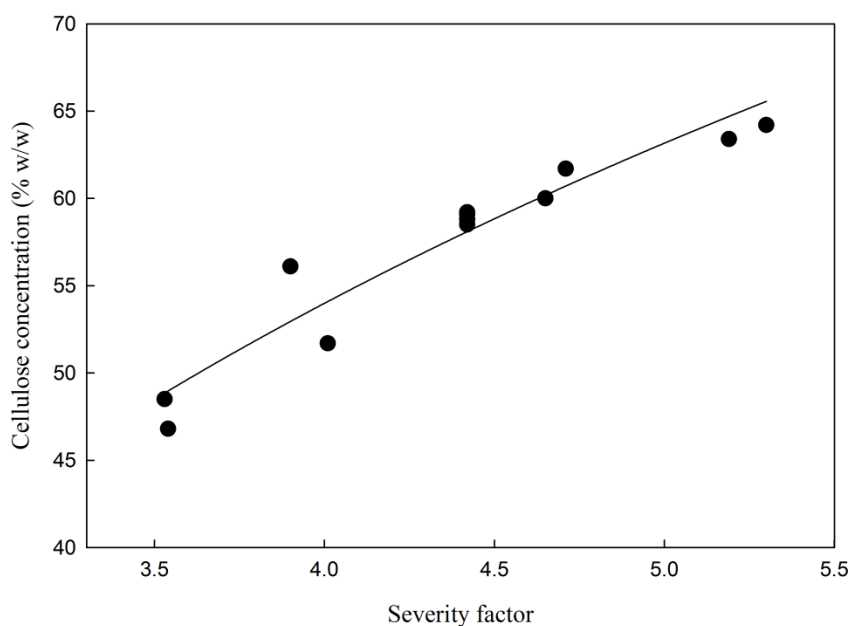
χρειάστηκαν μόνο 8 min προθέρμανσης του υλικού για να φτάσει την επιθυμητή θερμοκρασία που επιτρέπει την καλύτερη κατεργασία.

Η σύνθεση των υπολειμμάτων αραβόσιτου φαίνεται στον παρακάτω **Πίνακα 3.2** (σελ. 56) για διαφορετικές συνθήκες προκατεργασίας. Όπως φαίνεται στο ακόλουθο **Διάγραμμα 3.1**, υπάρχει συσχετισμός μεταξύ του παράγοντα έντασης (SF: Severity Factor) και της υπολειπόμενης συγκέντρωσης κυτταρίνης, ο οποίος μπορεί να περιγραφεί από την ακόλουθη λογαριθμική εξίσωση

$$C_{\text{cellulose}} = 40,209 \cdot \log(\text{SF}) - 1,6693$$

Όπου, $C_{\text{cellulose}}$: σύσταση κυτταρίνης (% w/w σε ξηρό βάρος)

SF : παράγοντας έντασης



Διάγραμμα 3.1: Σχέση συγκέντρωσης κυτταρίνης και παράγοντα έντασης (SF)

Ο πιθανολογικός παράγοντας είναι πολύ χαμηλός ($p < 0,0001$) υποδεικνύοντας τη σημαντικότητα της εξίσωσης και ο συντελεστής μεταβλητότητας ($R^2 = 0,92$) αποδεικνύει πολύ καλό συσχετισμό των πειραματικών τιμών από τις αντίστοιχες θεωρητικές τιμές.

Υψηλή συγκέντρωση κυτταρίνης θα μπορούσε να επιτευχθεί σε πιο ακραίες συνθήκες προκατεργασίας και να φτάσει στο 37,5% w/w. Δηλαδή μπορεί να φθάσει η γλυκόζη σε υψηλές αποδόσεις .

Προκειμένου να βελτιστοποιηθεί η ενζυμική υδρόλυση των υπολειμμάτων καλαμποκιού, η απελευθερωμένη γλυκόζη λήφθηκε υπόψη μετά τις 8 h ενζυμικής υδρόλυσης ώστε να είναι κατάλληλες για εφαρμογές βιομηχανικής κλίμακας.

Το πειραματικό μοντέλο ενισχύθηκε πραγματοποιώντας ένα επιπλέον πείραμα (240 °C, 9 min) με υψηλότερο παράγοντα έντασης, παρουσιάζοντας μικρότερη συγκέντρωση απελευθερωμένης γλυκόζης εξαιτίας της υποβάθμισης της γλυκόζης κάτω από τέτοιες ακραίες συνθήκες. Ένα δεύτερο μοντέλο πολυωνυμικής παλινδρόμησης εφαρμόστηκε στη μελέτη μας και περιγράφεται από την ακόλουθη εξίσωση:

$$G = -58,63 + 0,521 \cdot x_1 + 0,318 \cdot x_2 - 0,001158 \cdot x_1^2 - 0,002432 \cdot x_2^2 - 0,001044 \cdot x_1 \cdot x_2$$

Το μοντέλο ήταν σημαντικό με χαμηλό πιθανολογικό παράγοντα ($p < 0,0001$) παρουσιάζοντας πολύ καλή συσχέτιση μεταξύ προβλεπόμενων και πειραματικών δεδομένων που λήφθηκαν, τα οποία προσαρμόστηκαν σε συντελεστή μεταβλητότητας ($R^2 = 0,92$).

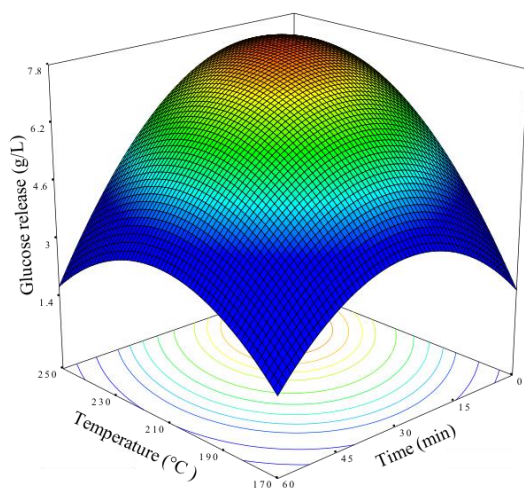
Πίνακας 3.2: Συνδυασμοί προκατεργασίας, σύσταση Σ.Α. και η μέση πειραματική απελευθερούμενη γλυκόζη μετά από 8 h ενζυμικής υδρόλυσης με 3% w/v ξ.β. καθώς και οι προβλεπόμενες τιμές που λήφθηκαν από το μοντέλο.

Δοκιμή	Παράγοντες		SF	Συγκ. κυτταρίνης (%, w/w)	Απελευθερούμενη γλυκόζη (g/L)	
	Θερμ. (°C)	Χρόνος (min)			Παρατ/μενη	Προβλ/μενη
1	200	30	4.42	58.8	6.59	6.54
2	220	15	4.71	61.7	7.55	7.54
3	200	51	4.65	60.0	4.82	4.69
4	200	9	3.90	56.1	6.42	6.24
5	200	30	4.42	58.5	6.54	6.54
6	170	30	3.54	46.8	4.21	3.77
7	180	45	4.01	51.7	4.08	4.14
8	220	45	5.19	63.4	5.73	5.81
9	200	30	4.42	59.2	6.46	6.54
10	200	30	4.42	58.5	6.58	6.54
11	180	15	3.53	48.5	4.42	4.61
12	200	30	4.42	59.1	6.33	6.54
13	230	30	5.30	64.2	7.32	7.22

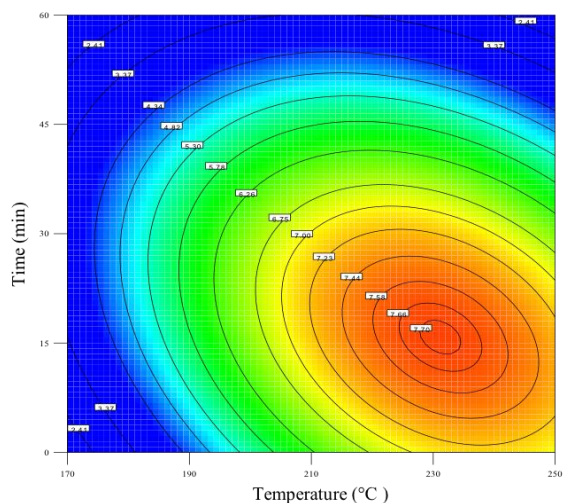
Η επίδραση των συνθηκών προκατεργασίας της απελευθερωμένης γλυκόζης μετά την ενζυμική κατεργασία απεικονίστηκε γραφικά σε γράφημα επιφανειών και ισοϋψών καμπυλών. Τα γραφήματα δημιουργήθηκαν από την τετραγωνική εξίσωση που παρουσιάζεται στο **Διάγραμμα 3.2 (α, β)**. Οι βέλτιστες συνθήκες θερμοκρασίας

και χρόνου προκατεργασίας για μέγιστη απελευθέρωση γλυκόζης βρέθηκε στους 230 °C και σε 15 min με μέγιστη προβλεπόμενη συγκέντρωση απελευθερωμένης γλυκόζης στα 7,71 g/L, τιμή πολύ κοντά στην πειραματική των 7,96 g/L.

α)



β)



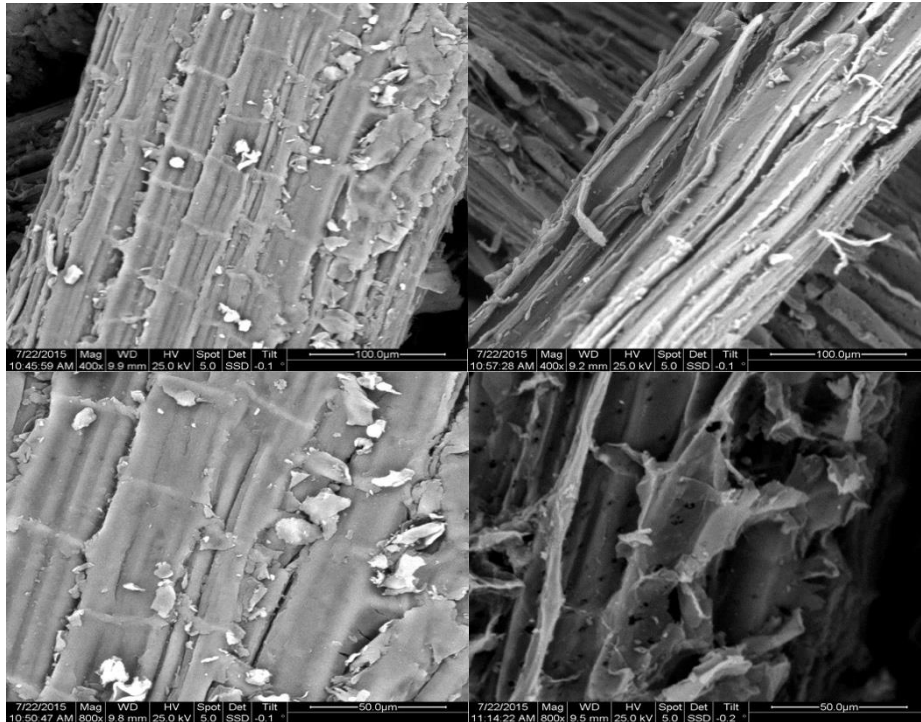
Διάγραμμα 3.2: Σχέση της εξαρτημένης μεταβλητής (αποτελεσματικότητα της ενζυμικής υδρόλυσης) και των ανεξάρτητων μεταβλητών (θερμοκρασία και χρόνος προκατεργασίας) με α) Τρισδιάστατη απεικόνιση και β) ισοϋψείς καμπύλες.

3.4 Μορφολογική Ανάλυση Στελέχους Αραβόσιτου ύστερα από επεξεργασία Σάρωσης Ηλεκτρονικού Μικροσκοπίου (SEM)

Οι εικόνες της Ηλεκτρονικής Μικροσκοπίας Σάρωσης λήφθηκαν χρησιμοποιώντας τη συσκευή FEI QUANTA 200 (FEI, Company Eindhoven, The Netherlands), εφαρμόζοντας ταυτόχρονα τάση επιτάχυνσης της τάξης των 25-30 kV.

Αλλαγές στα μορφολογικά χαρακτηριστικά του Σ.Α. πριν και μετά την υδροθερμική προκατεργασία στις βέλτιστες συνθήκες (230 °C, 15 min) παρατηρήθηκαν με την επεξεργασία Σάρωσης Ηλεκτρονικής Μικροσκοπίας. Το μικρογράφημα των μη-προκατεργασμένων και των προκατεργασμένων δειγμάτων απεικονίζεται παρακάτω στο Σχήμα 3.1.

Το Σ.Α. παρουσιάζει αρχικά μία στιλπνή, λεία και επίπεδη επιφάνεια με άκαμπτα ινίδια (3.1.α), ενώ οι ίνες των προκατεργασμένων δειγμάτων εμφανίζουν μία διογκωμένη επιφάνεια με πολλές ρωγμές (3.1.β). Επιπλέον σε μεγέθυνση 800x μπορεί να παρατηρηθεί μία διάτρητη επιφάνεια που καθιστά το υλικό πιο επιρρεπές σε ενζυμική υδρόλυση (3.1.δ).



Σχήμα 3.1: Κατεργασμένο και μη κατεργασμένο στέλεχος αραβόσιτου ύστερα από Σάρωση Ηλεκτρονικής Μικροσκοπίας (α: πάνω αριστερά, β: πάνω δεξιά, γ: κάτω αριστερά και δ: κάτω δεξιά)

3.5 Ενζυμική Υδρόλυση

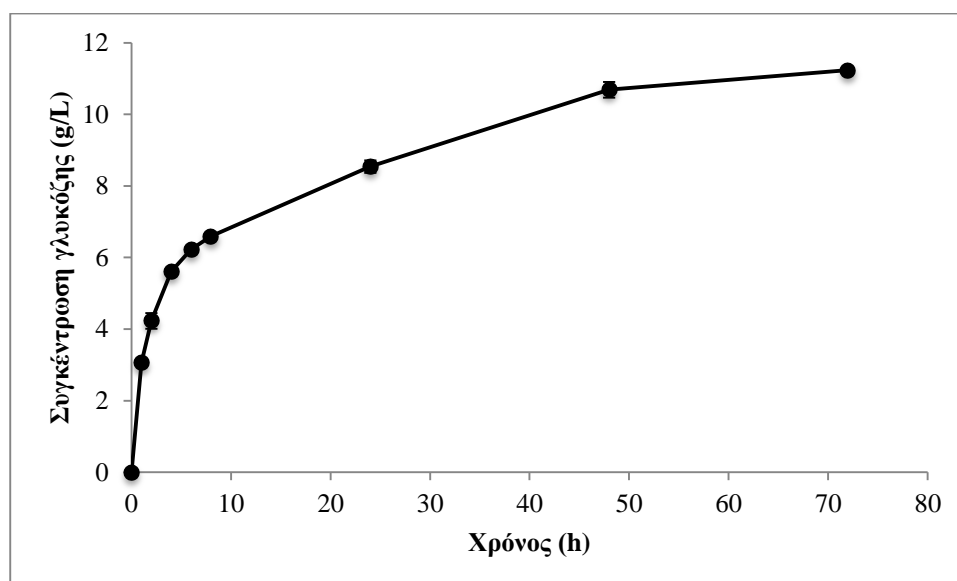
Σε κάθε συνθήκη πραγματοποιήθηκε ενζυμική υδρόλυση με 3% w/v στερεά και λαμβάναμε δείγμα ανά τακτά χρονικά διαστήματα έως το πέρας 72 ωρών. Στη συνέχεια προσδιορίστηκαν τα ολικά αναγωγικά σάκχαρα με τη μέθοδο του DNS, και η συγκέντρωση γλυκόζης. Παρακάτω παρουσιάζονται τα διαγράμματα για κάθε συνθήκη.

Πίνακας 3.3: Συγκεντρωτικός πίνακας ανεξάρτητων μεταβλητών και παράγοντα έντασης για κάθε συνθήκη προκατεργασίας.

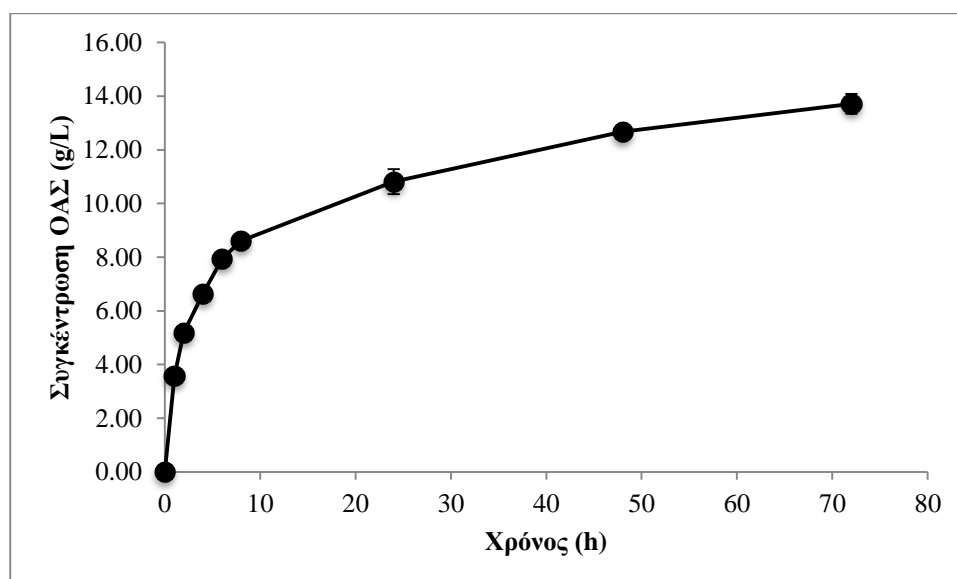
Συνθήκη	T (°C)	t (min)	SF
1	200	30,00	4.42
2	220	15,00	4.71
3	200	51,00	4.65
4	200	9,00	3.90
5	200	30,00	4.42
6	170	30,00	3.54
7	180	45,00	4.01
8	220	45,00	5.19
9	200	30,00	4.42
10	200	30,00	4.42
11	180	15,00	3.53
12	200	30,00	4.42
13	230	30,00	5.30

Συνθήκη 1

200 °C, 30 min



Διάγραμμα 3.3 α : Μεταβολή της συγκέντρωσης γλυκόζης (g/L) ως προς το χρόνο κατά τη διάρκεια ενζυμικής υδρόλυσης υδροθερμικά προκατεργασμένου Σ.Α. (200 °C, 30 min)

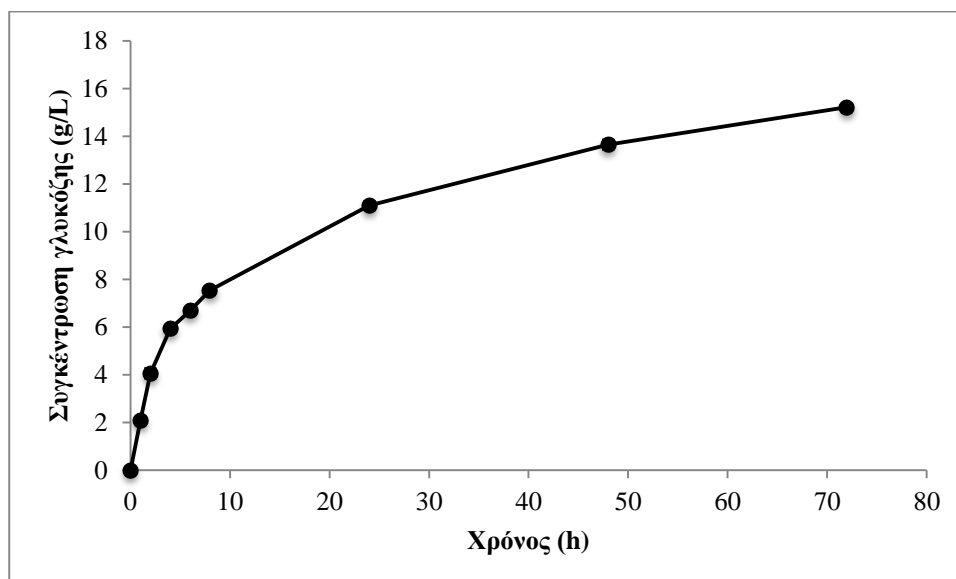


Διάγραμμα 3.3 β: Μεταβολή της συγκέντρωσης ολικών αναγωγικών σακχάρων ως προς το χρόνο κατά τη διάρκεια ενζυμικής υδρόλυσης υδροθερμικά προκατεργασμένου Σ.Α. (200 °C, 30 min)

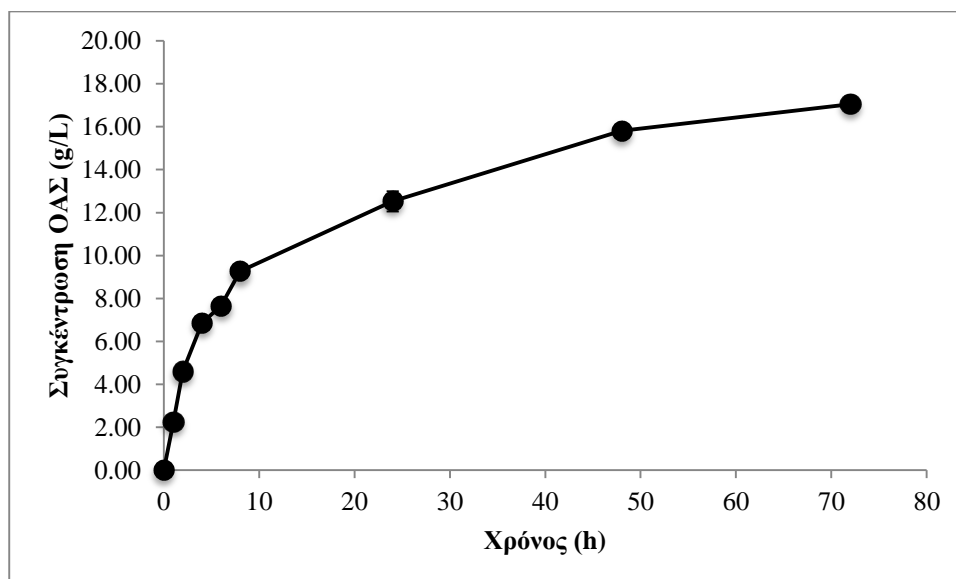
Στη συνθήκη υδροθερμικής προκατεργασίας 200 °C, 30 min παρατηρείται απελευθέρωση 6,59 g/L γλυκόζης και 8,61 g/L ολικών αναγωγικών σακχάρων μετά από 8 h ενζυμικής υδρόλυσης. Επιπλέον, επιτυγχάνεται ποσοστό 33,5% μετατροπής της κυτταρίνης σε γλυκόζη μετά από 8 h ενώ προσδιορίζεται σε 57% μετά από 72 h.

Συνθήκη 2

220 °C, 15 min



Διάγραμμα 3.4 α: Μεταβολή της συγκέντρωσης γλυκόζης (g/L) ως προς το χρόνο κατά τη διάρκεια ενζυμικής υδρόλυσης υδροθερμικά προκατεργασμένου Σ.Α. (220 °C, 15 min)

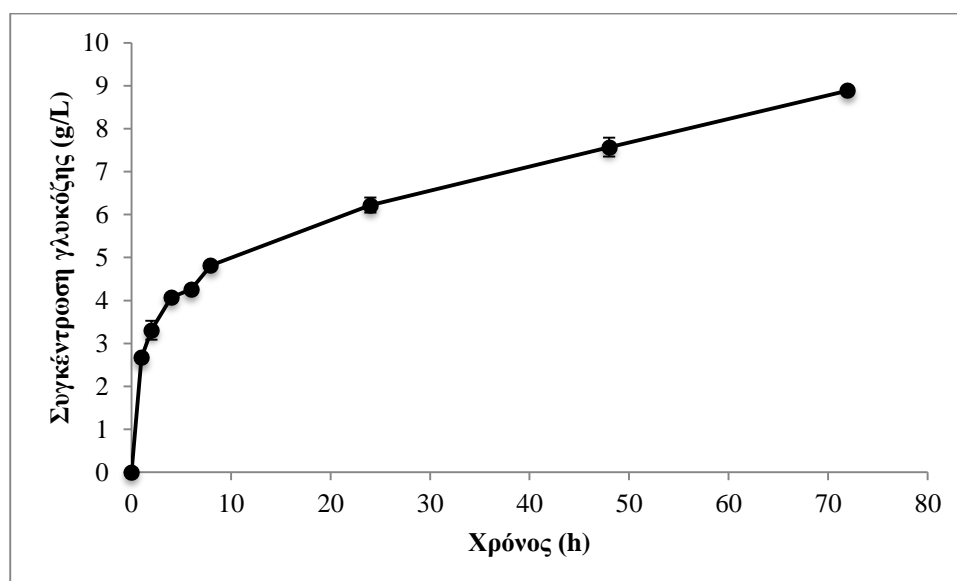


Διάγραμμα 3.4 β: Μεταβολή της συγκέντρωσης ολικών αναγωγικών σακχάρων ως προς το χρόνο κατά τη διάρκεια ενζυμικής υδρόλυσης υδροθερμικά προκατεργασμένου Σ.Α. (220 °C, 15 min)

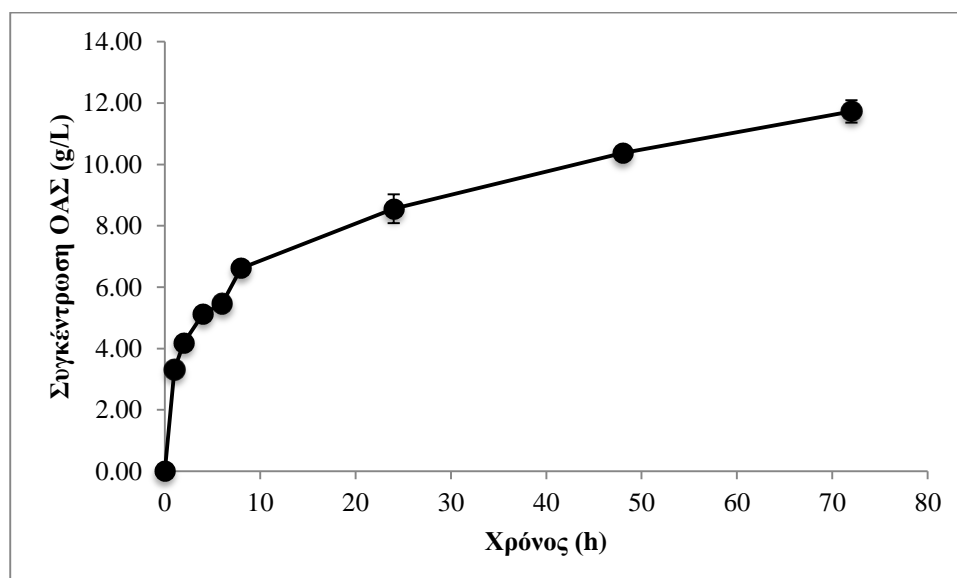
Στη συνθήκη υδροθερμικής προκατεργασίας 220 °C, 15 min παρατηρείται απελευθέρωση 7,55 g/L γλυκόζης και 9,27 g/L ολικών αναγωγικών σακχάρων μετά από 8 h ενζυμικής υδρόλυσης. Επιπλέον, επιτυγχάνεται ποσοστό 37% μετατροπής της κυτταρίνης σε γλυκόζη μετά από 8 h ενώ προσδιορίζεται σε 74% μετά από 72 h.

Συνθήκη 3

200 °C, 51 min



Διάγραμμα 3.5 α: Μεταβολή της συγκέντρωσης γλυκόζης (g/L) ως προς το χρόνο κατά τη διάρκεια ενζυμικής υδρόλυσης υδροθερμικά προκατεργασμένου Σ.Α. (200 °C, 51 min)

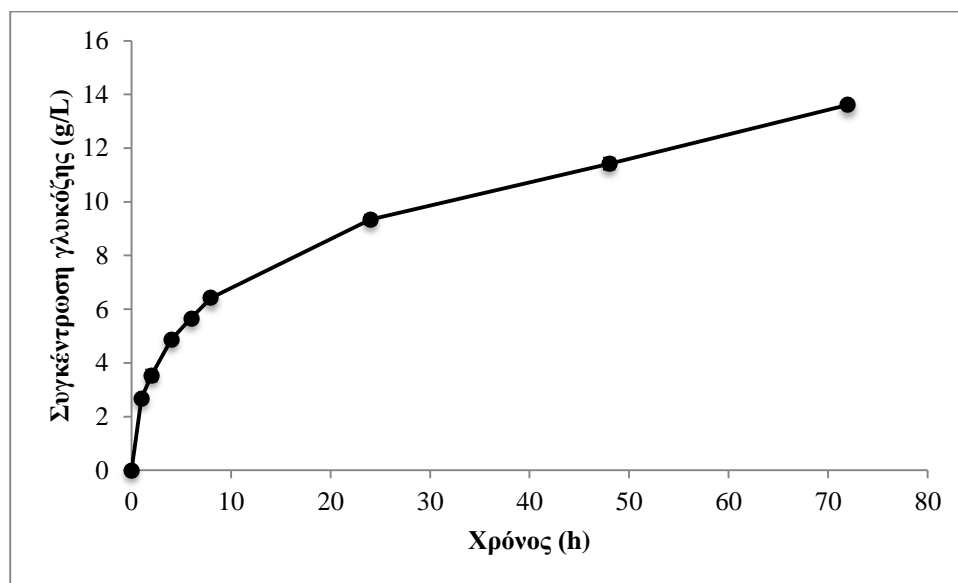


Διάγραμμα 3.5 β: Μεταβολή της συγκέντρωσης ολικών αναγωγικών σακχάρων ως προς το χρόνο κατά τη διάρκεια ενζυμικής υδρόλυσης υδροθερμικά προκατεργασμένου Σ.Α. (200 °C, 51 min)

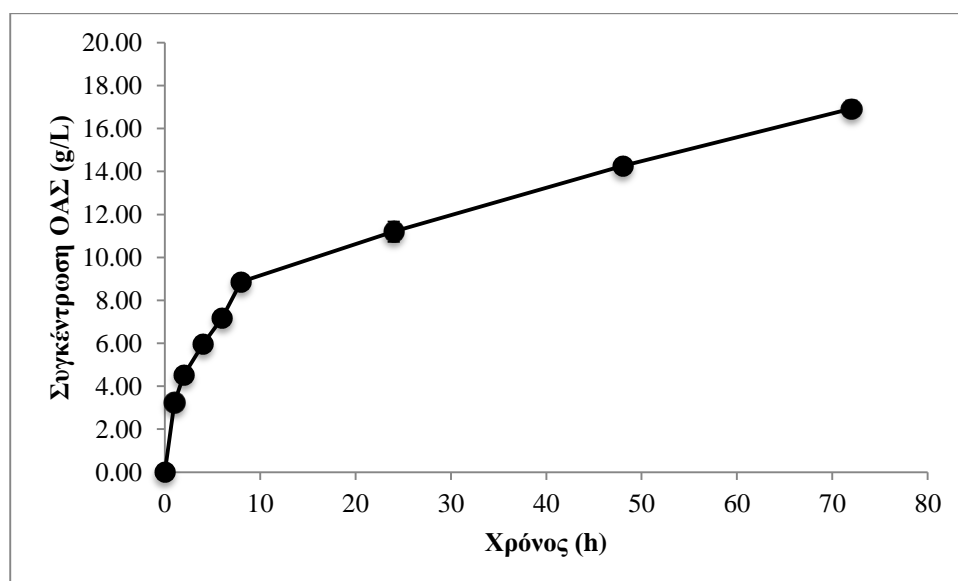
Στη συνθήκη υδροθερμικής προκατεργασίας 200 °C, 51 min παρατηρείται απελευθέρωση 4,82 g/L γλυκόζης και 6,61 g/L ολικών αναγωγικών σακχάρων μετά από 8 h ενζυμικής υδρόλυσης. Επιπλέον, επιτυγχάνεται ποσοστό 24% μετατροπής της κυτταρίνης σε γλυκόζη μετά από 8 h ενώ προσδιορίζεται σε 44,5% μετά από 72 h.

Συνθήκη 4

200 °C, 9 min



Διάγραμμα 3.6 α: Μεταβολή της συγκέντρωσης γλυκόζης (g/L) ως προς το χρόνο κατά τη διάρκεια ενζυμικής υδρόλυσης υδροθερμικά προκατεργασμένου Σ.Α. (200 °C, 9 min)

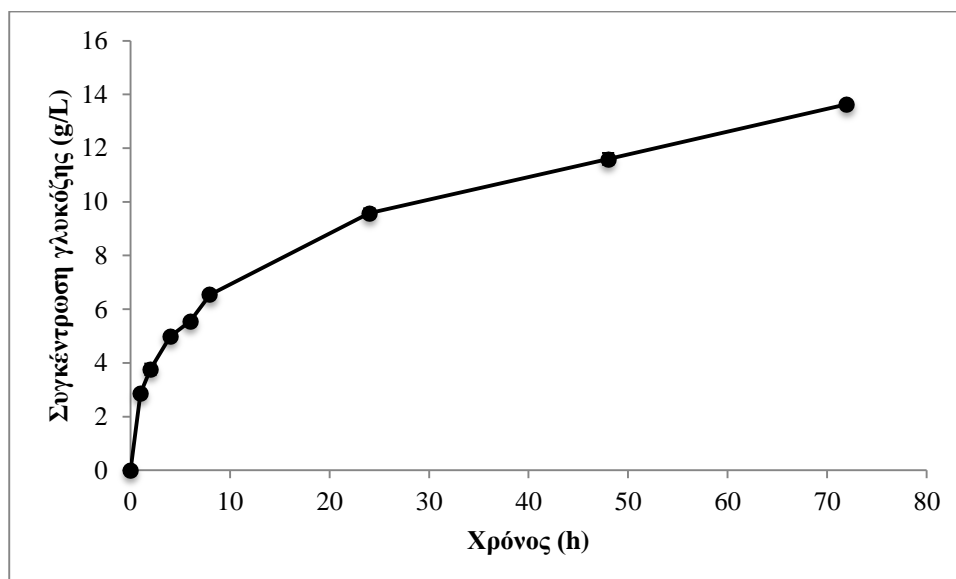


Διάγραμμα 3.6 β: Μεταβολή της συγκέντρωσης ολικών αναγωγικών σακχάρων ως προς το χρόνο κατά τη διάρκεια ενζυμικής υδρόλυσης υδροθερμικά προκατεργασμένου Σ.Α. (200 °C, 9 min)

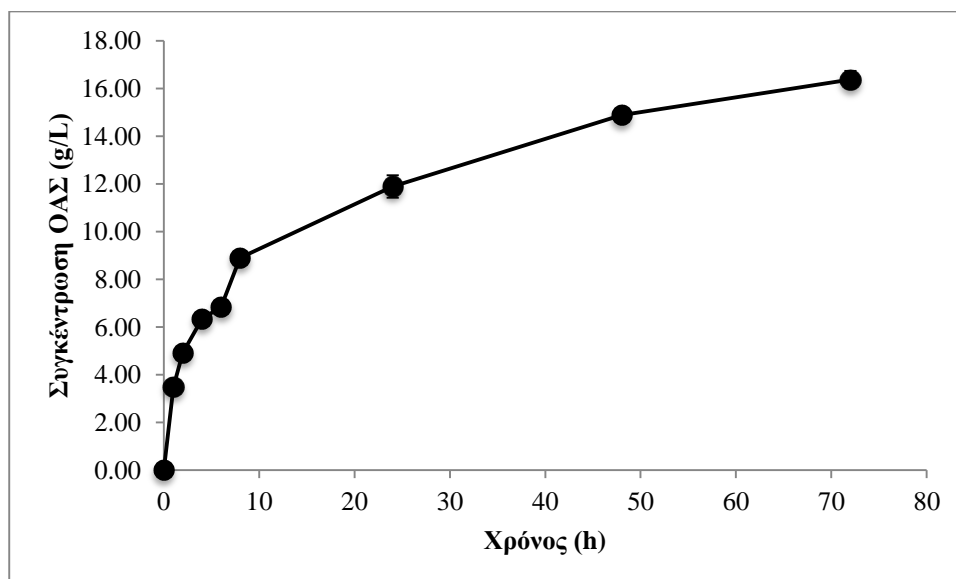
Στη συνθήκη υδροθερμικής προκατεργασίας 200 °C, 9 min παρατηρείται απελευθέρωση 6,42 g/L γλυκόζης και 8,86 g/L ολικών αναγωγικών σακχάρων μετά από 8 h ενζυμικής υδρόλυσης. Επιπλέον, επιτυγχάνεται ποσοστό 34% μετατροπής της κυτταρίνης σε γλυκόζη μετά από 8 h ενώ προσδιορίζεται σε 73% μετά από 72 h.

Συνθήκη 5

200 °C, 30 min



Διάγραμμα 3.7 α: Μεταβολή της συγκέντρωσης γλυκόζης (g/L) ως προς το χρόνο κατά τη διάρκεια ενζυμικής υδρόλυσης υδροθερμικά προκατεργασμένου Σ.Α. (200 °C, 30 min)

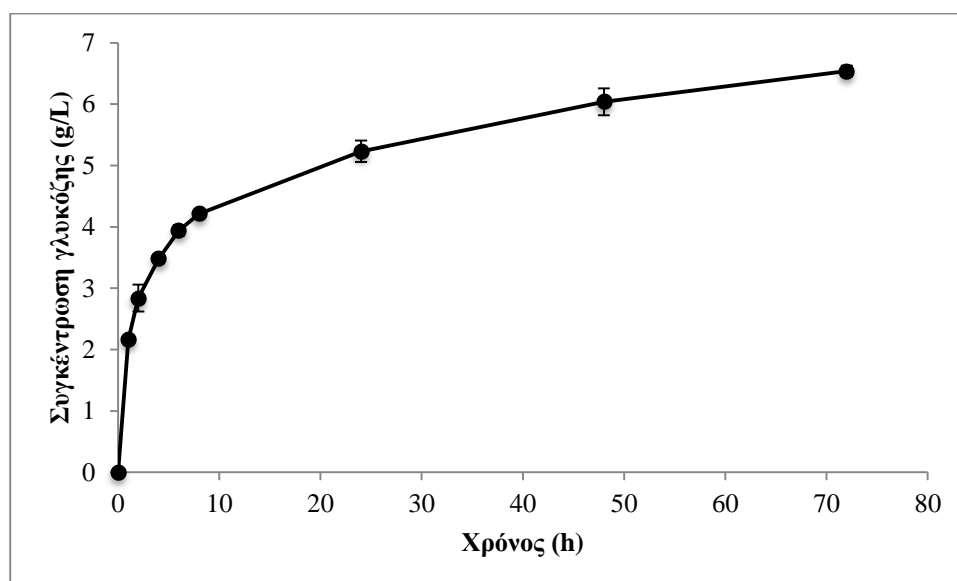


Διάγραμμα 3.7 β: Μεταβολή της συγκέντρωσης ολικών αναγωγικών σακχάρων ως προς το χρόνο κατά τη διάρκεια ενζυμικής υδρόλυσης υδροθερμικά προκατεργασμένου Σ.Α. (200 °C, 30min)

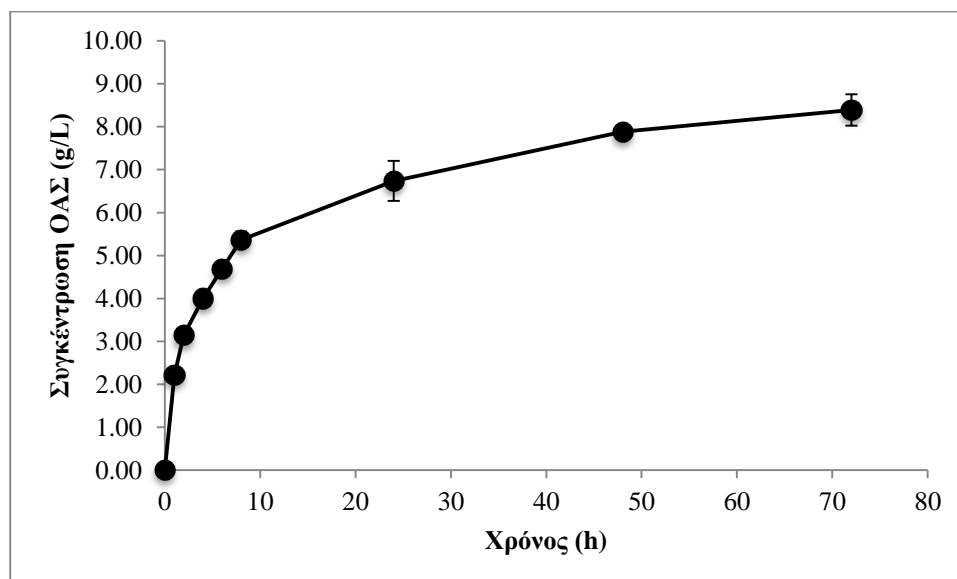
Στη συνθήκη υδροθερμικής προκατεργασίας 200 °C, 30 min παρατηρείται απελευθέρωση 6,54 g/L γλυκόζης και 8,91 g/L ολικών αναγωγικών σακχάρων μετά από 8 h ενζυμικής υδρόλυσης. Επιπλέον, επιτυγχάνεται ποσοστό 33,5% μετατροπής της κυτταρίνης σε γλυκόζη μετά από 8 h ενώ προσδιορίζεται σε 70% μετά από 72 h.

Συνθήκη 6

170 °C, 30 min



Διάγραμμα 3.8 α: Μεταβολή της συγκέντρωσης γλυκόζης (g/L) ως προς το χρόνο κατά τη διάρκεια ενζυμικής υδρόλυσης υδροθερμικά προκατεργασμένου Σ.Α. (170 °C, 30 min)

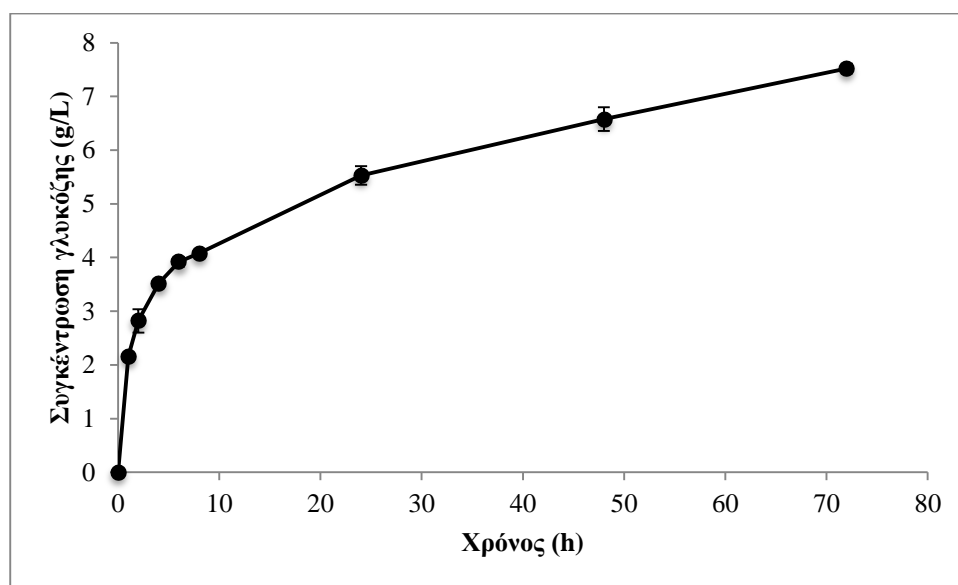


Διάγραμμα 3.8 β: Μεταβολή της συγκέντρωσης ολικών αναγωγικών σακχάρων ως προς το χρόνο κατά τη διάρκεια ενζυμικής υδρόλυσης υδροθερμικά προκατεργασμένου Σ.Α. (170 °C, 30min)

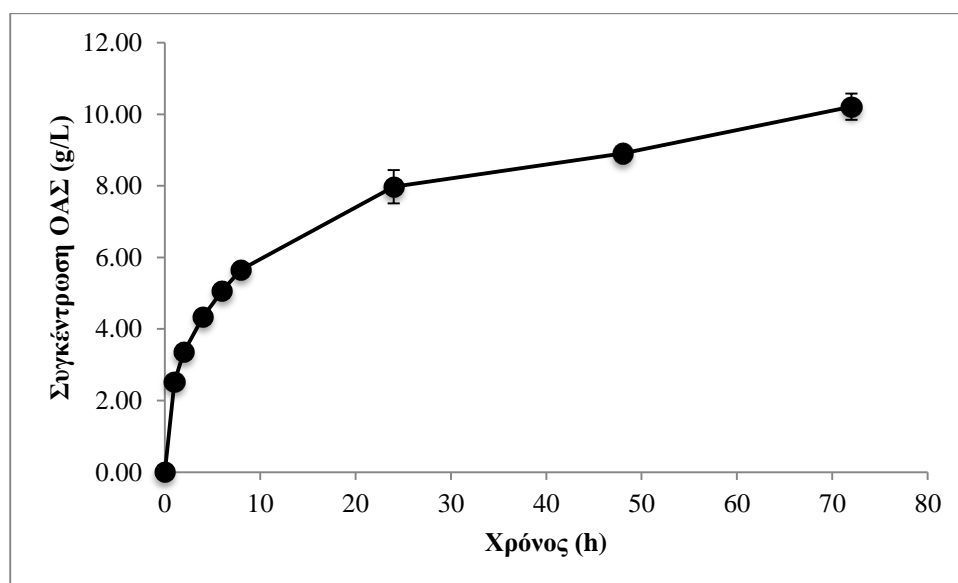
Στη συνθήκη υδροθερμικής προκατεργασίας 170 °C, 30 min παρατηρείται απελευθέρωση 4,21 g/L γλυκόζης και 5,37 g/L ολικών αναγωγικών σακχάρων μετά από 8 h ενζυμικής υδρόλυσης. Επιπλέον, επιτυγχάνεται ποσοστό 27% μετατροπής της κυτταρίνης σε γλυκόζη μετά από 8 h ενώ προσδιορίζεται σε 42% μετά από 72 h.

Συνθήκη 7

180 °C, 45 min



Διάγραμμα 3.9 α: Μεταβολή της συγκέντρωσης γλυκόζης (g/L) ως προς το χρόνο κατά τη διάρκεια ενζυμικής υδρόλυσης υδροθερμικά προκατεργασμένου Σ.Α. (180 °C, 45 min)

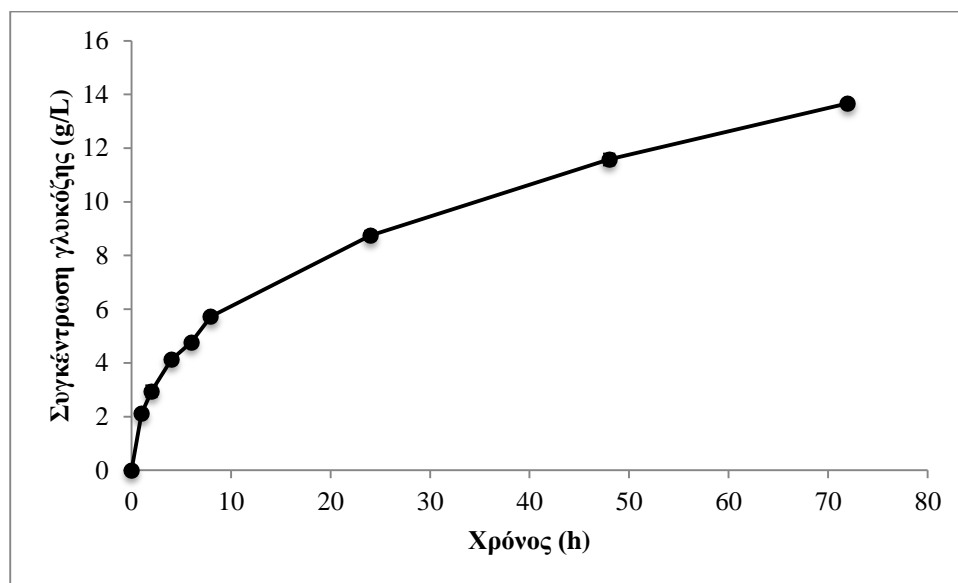


Διάγραμμα 3.9 β: Μεταβολή της συγκέντρωσης ολικών αναγωγικών σακχάρων ως προς το χρόνο κατά τη διάρκεια ενζυμικής υδρόλυσης υδροθερμικά προκατεργασμένου Σ.Α. (180 °C, 45min)

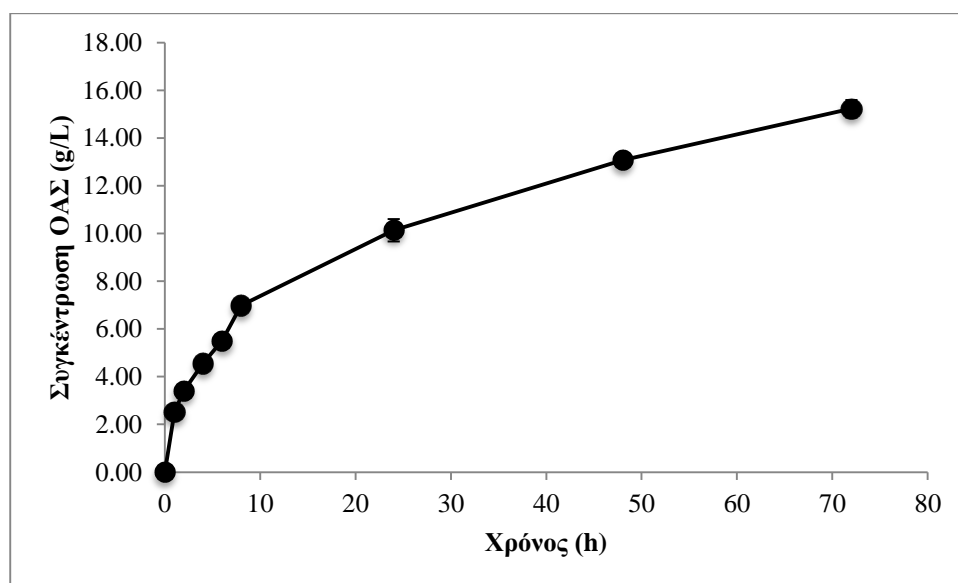
Στη συνθήκη υδροθερμικής προκατεργασίας 180 °C, 45 min παρατηρείται απελευθέρωση 4,08 g/L γλυκόζης και 5,66 g/L ολικών αναγωγικών σακχάρων μετά από 8 h ενζυμικής υδρόλυσης. Επιπλέον, επιτυγχάνεται ποσοστό 24% μετατροπής της κυτταρίνης σε γλυκόζη μετά από 8 h ενώ προσδιορίζεται σε 44% μετά από 72 h.

Συνθήκη 8

220 °C, 45 min



Διάγραμμα 3.10 α: Μεταβολή της συγκέντρωσης γλυκόζης (g/L) ως προς το χρόνο κατά τη διάρκεια ενζυμικής υδρόλυσης υδροθερμικά προκατεργασμένου Σ.Α. (220 °C, 45 min)

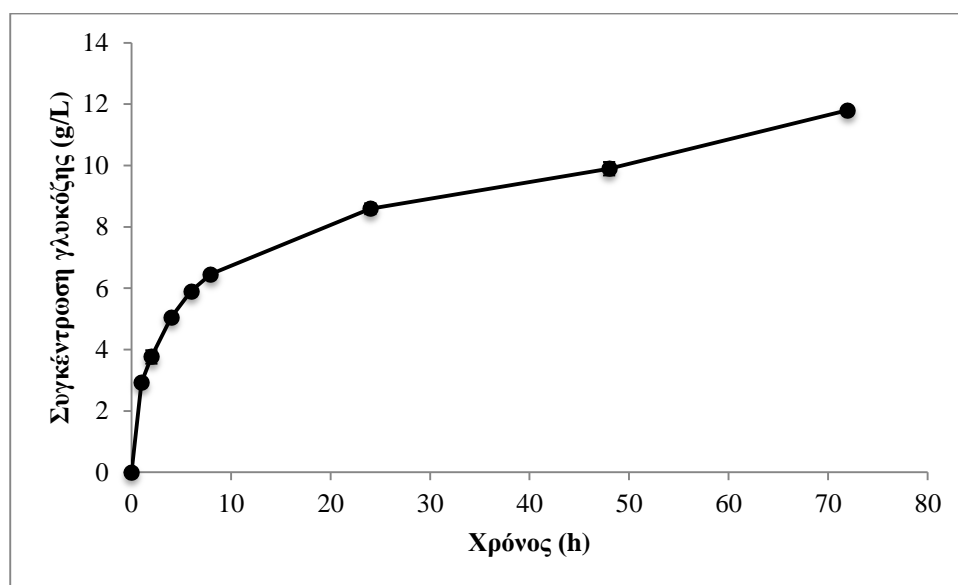


Διάγραμμα 3.10 β: Μεταβολή της συγκέντρωσης ολικών αναγωγικών σακχάρων ως προς το χρόνο κατά τη διάρκεια ενζυμικής υδρόλυσης υδροθερμικά προκατεργασμένου Σ.Α. (220 °C, 45 min)

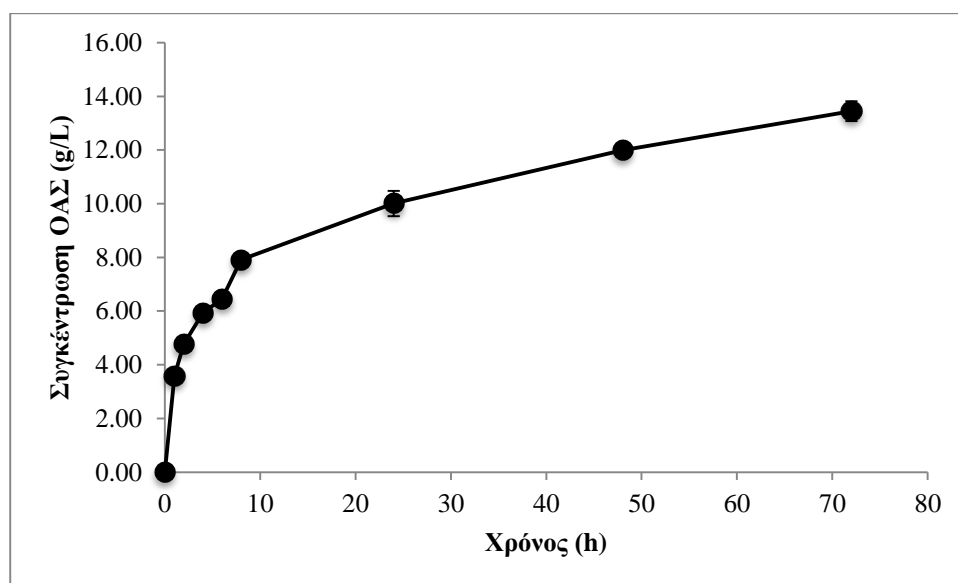
Στη συνθήκη υδροθερμικής προκατεργασίας 220 °C, 45 min παρατηρείται απελευθέρωση 5,73g/L γλυκόζης και 6,99 g/L ολικών αναγωγικών σακχάρων μετά από 8 h ενζυμικής υδρόλυσης. Επιπλέον, επιτυγχάνεται ποσοστό 27% μετατροπής της κυτταρίνης σε γλυκόζη μετά από 8 h ενώ προσδιορίζεται σε 65% μετά από 72 h.

Συνθήκη 9

200 °C, 30 min



Διάγραμμα 3.11 α: Μεταβολή της συγκέντρωσης γλυκόζης (g/L) ως προς το χρόνο κατά τη διάρκεια ενζυμικής υδρόλυσης υδροθερμικά προκατεργασμένου Σ.Α. (200 °C, 30 min)

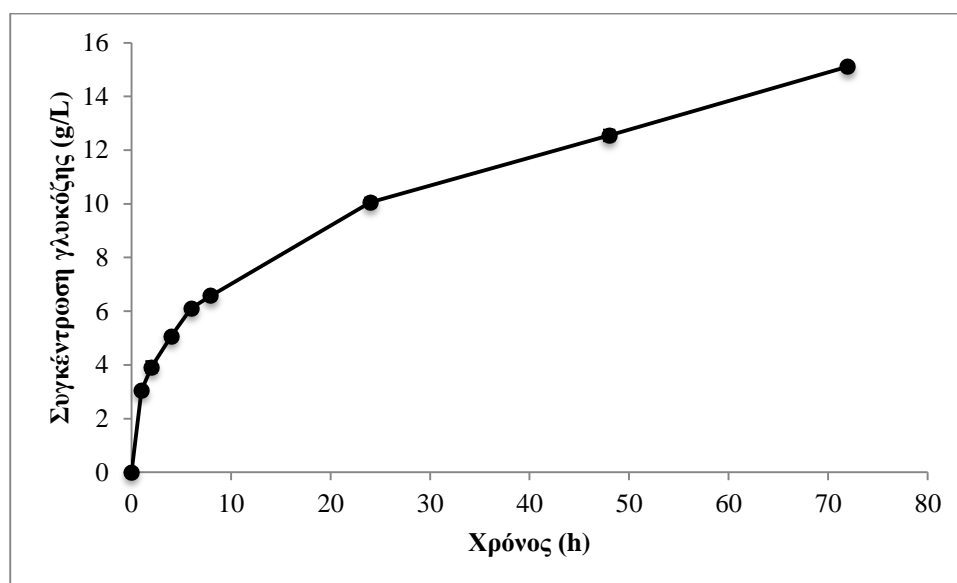


Διάγραμμα 3.11 β: Μεταβολή της συγκέντρωσης ολικών αναγωγικών σακχάρων ως προς το χρόνο κατά τη διάρκεια ενζυμικής υδρόλυσης υδροθερμικά προκατεργασμένου Σ.Α. (200 °C, 30min)

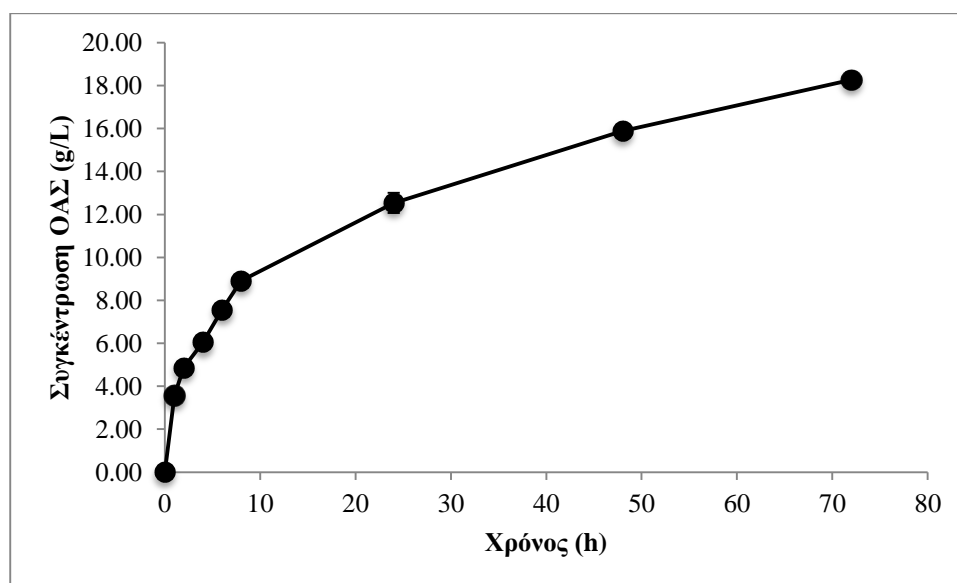
Στη συνθήκη υδροθερμικής προκατεργασίας #9 (200 °C, 30 min) παρατηρείται απελευθέρωση 6,46g/L γλυκόζης και 7,91 g/L ολικών αναγωγικών σακχάρων μετά από 8 h ενζυμικής υδρόλυσης. Επιπλέον, επιτυγχάνεται ποσοστό 33% μετατροπής της κυτταρίνης σε γλυκόζη μετά από 8 h ενώ προσδιορίζεται σε 60% μετά από 72 h.

Συνθήκη 10

200 °C, 30 min



Διάγραμμα 3.12 α: Μεταβολή της συγκέντρωσης γλυκόζης (g/L) ως προς το χρόνο κατά τη διάρκεια ενζυμικής υδρόλυσης υδροθερμικά προκατεργασμένου Σ.Α. (200 °C, 30 min)

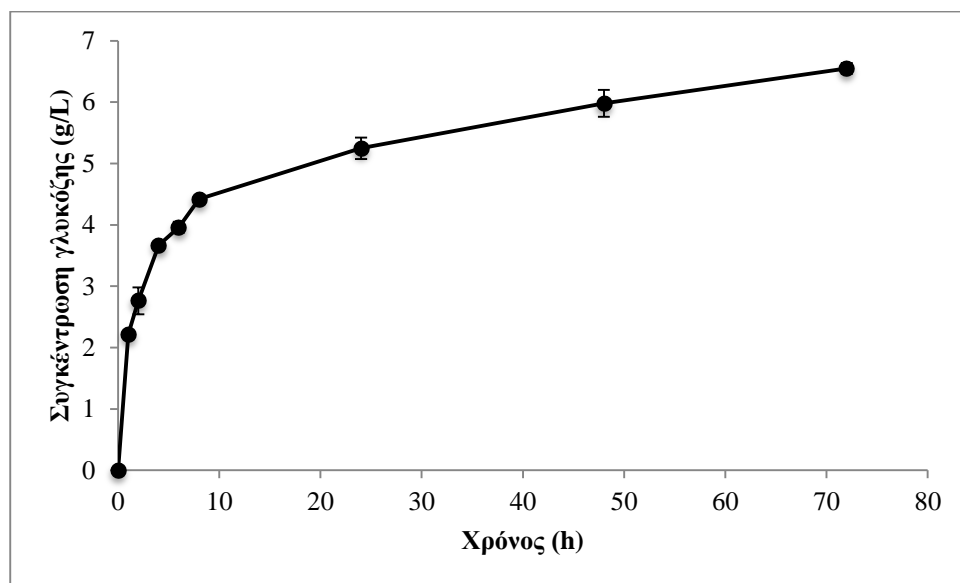


Διάγραμμα 3.12 β: Μεταβολή της συγκέντρωσης ολικών αναγωγικών σακχάρων ως προς το χρόνο κατά τη διάρκεια ενζυμικής υδρόλυσης υδροθερμικά προκατεργασμένου Σ.Α. (200 °C, 30 min)

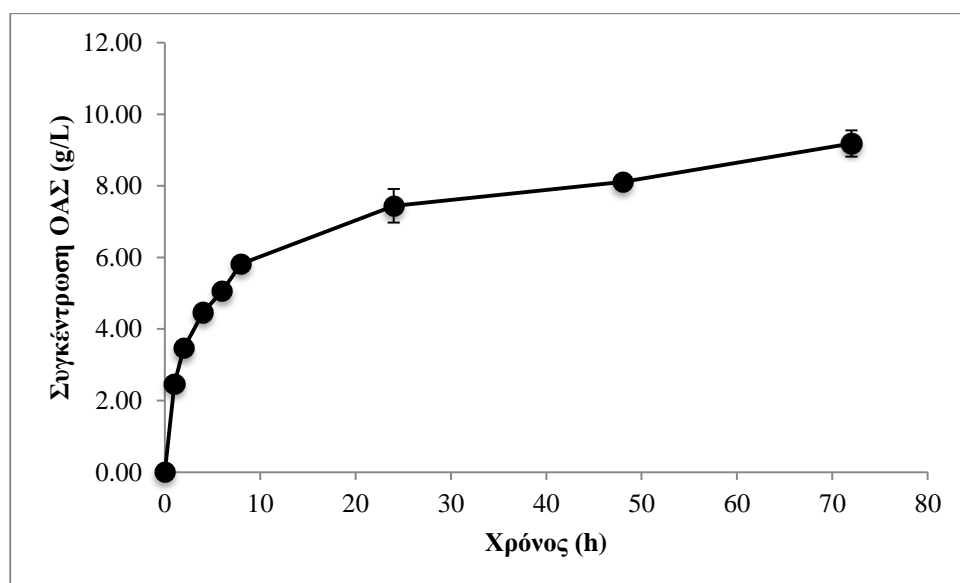
Στη συνθήκη υδροθερμικής προκατεργασίας #10 (200 °C, 30 min) παρατηρείται απελευθέρωση 6,58g/L γλυκόζης και 8,91 g/L ολικών αναγωγικών σακχάρων μετά από 8 h ενζυμικής υδρόλυσης. Επιπλέον, επιτυγχάνεται ποσοστό 34% μετατροπής της κυτταρίνης σε γλυκόζη μετά από 8 h ενώ προσδιορίζεται σε 77.5% μετά από 72 h.

Συνθήκη 11

180 °C, 15 min



Διάγραμμα 3.13α: Μεταβολή της συγκέντρωσης γλυκόζης (g/L) ως προς το χρόνο κατά τη διάρκεια ενζυμικής υδρόλυσης υδροθερμικά προκατεργασμένου Σ.Α. (180 °C, 15 min)

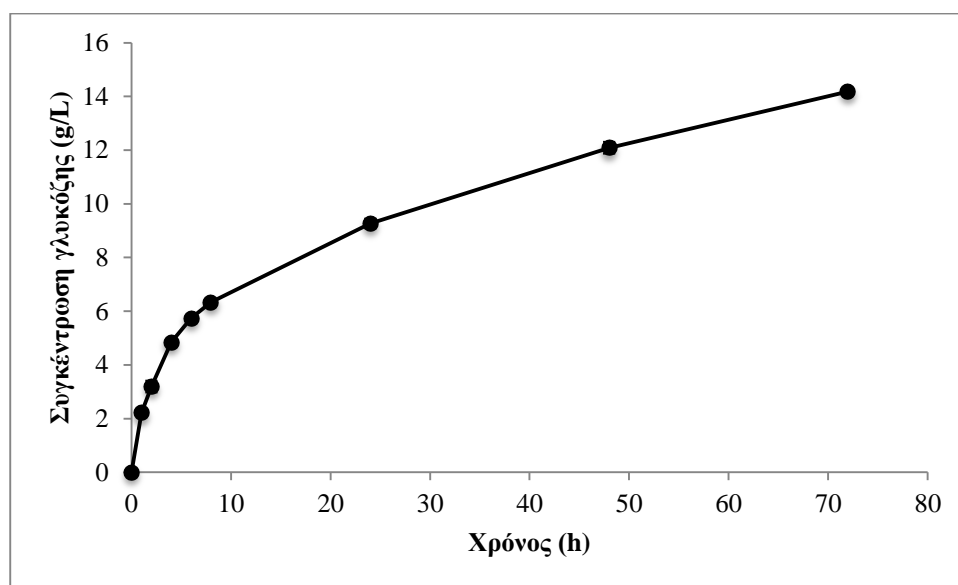


Διάγραμμα 3.13 β: Μεταβολή της συγκέντρωσης ολικών αναγωγικών σακχάρων ως προς το χρόνο κατά τη διάρκεια ενζυμικής υδρόλυσης υδροθερμικά προκατεργασμένου Σ.Α. (180 °C, 15 min)

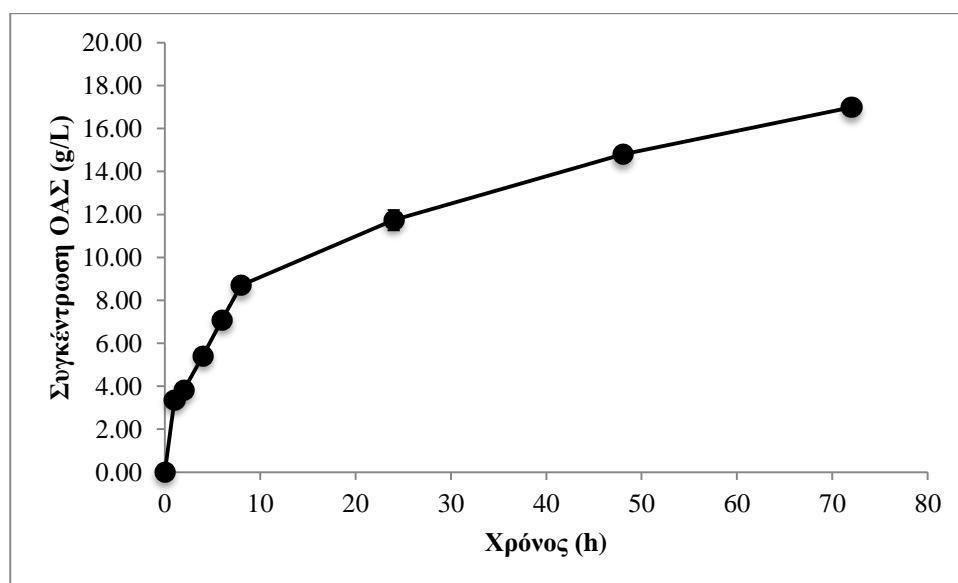
Στη συνθήκη υδροθερμικής προκατεργασίας #11 (180 °C, 15 min) παρατηρείται απελευθέρωση 4,42g/L γλυκόζης και 5,82 g/L ολικών αναγωγικών σακχάρων μετά από 8 h ενζυμικής υδρόλυσης. Επιπλέον, επιτυγχάνεται ποσοστό 27% μετατροπής της κυτταρίνης σε γλυκόζη μετά από 8 h ενώ προσδιορίζεται σε 40,5% μετά από 72 h.

Συνθήκη 12

200 °C, 30 min



Διάγραμμα 3.14 α: Μεταβολή της συγκέντρωσης γλυκόζης (g/L) ως προς το χρόνο κατά τη διάρκεια ενζυμικής υδρόλυσης υδροθερμικά προκατεργασμένου Σ.Α. (200 °C, 30 min)

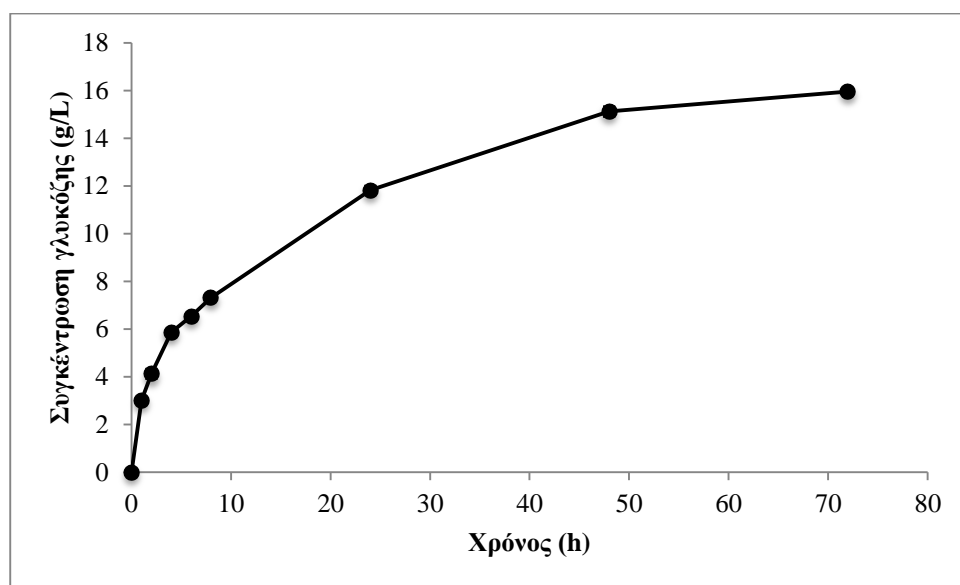


Διάγραμμα 3.14 β: Μεταβολή της συγκέντρωσης ολικών αναγωγικών σακχάρων ως προς το χρόνο κατά τη διάρκεια ενζυμικής υδρόλυσης υδροθερμικά προκατεργασμένου Σ.Α. (200 °C, 30 min)

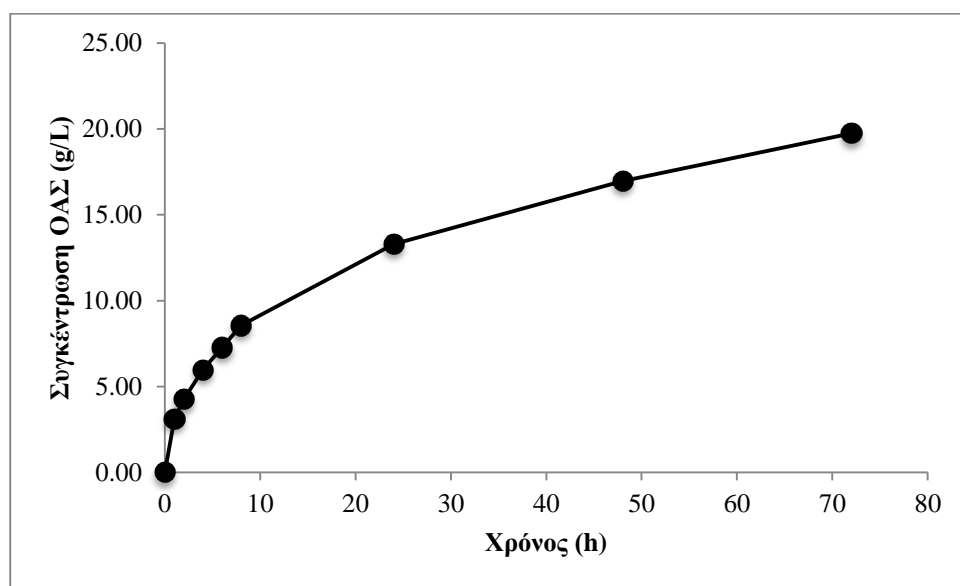
Στη συνθήκη υδροθερμικής προκατεργασίας #12 (200 °C, 30 min) παρατηρείται απελευθέρωση 6,33g/L γλυκόζης και 8,70 g/L ολικών αναγωγικών σακχάρων μετά από 8 h ενζυμικής υδρόλυσης. Επιπλέον, επιτυγχάνεται ποσοστό 32% μετατροπής της κυτταρίνης σε γλυκόζη μετά από 8 h ενώ προσδιορίζεται σε 72% μετά από 72 h.

Συνθήκη 13

230 °C, 30 min



Διάγραμμα 3.15 α: Μεταβολή της συγκέντρωσης γλυκόζης (g/L) ως προς το χρόνο κατά τη διάρκεια ενζυμικής υδρόλυσης υδροθερμικά προκατεργασμένου Σ.Α (230 °C, 30 min)



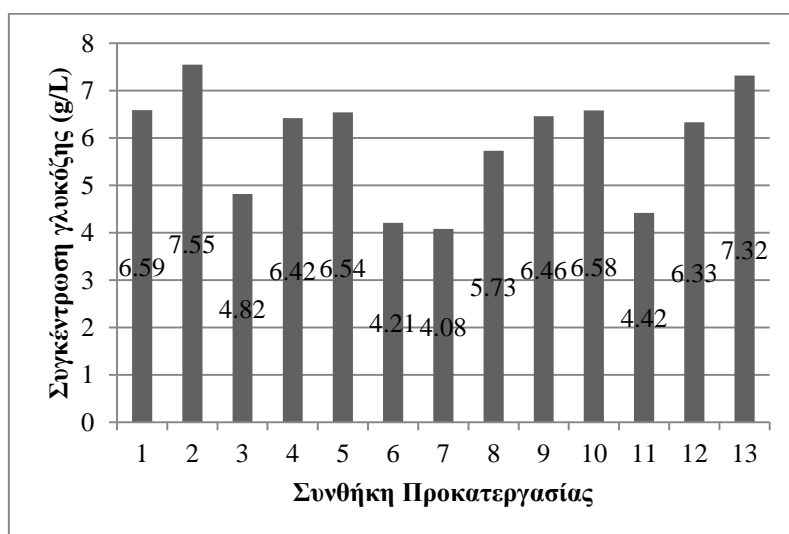
Διάγραμμα 3.15 β: Μεταβολή της συγκέντρωσης ολικών αναγωγικών σακχάρων ως προς το χρόνο κατά τη διάρκεια ενζυμικής υδρόλυσης υδροθερμικά προκατεργασμένου Σ.Α. (230 °C, 30 min)

Στη συνθήκη υδροθερμικής προκατεργασίας #13 (230°C, 30min) παρατηρείται απελευθέρωση 7,32g/L γλυκόζης και 8,56 g/L ολικών αναγωγικών σακχάρων μετά από 8 h ενζυμικής υδρόλυσης. Επιπλέον, επιτυγχάνεται ποσοστό 34% μετατροπής της κυτταρίνης σε γλυκόζη μετά από 8 h ενώ προσδιορίζεται σε 74,5% μετά από 72 h.

Πίνακας 3.4: Συγκεντρωτικός πίνακας με τα αποτελέσματα για 8h σακχαροποίησης για κάθε συνθήκη.

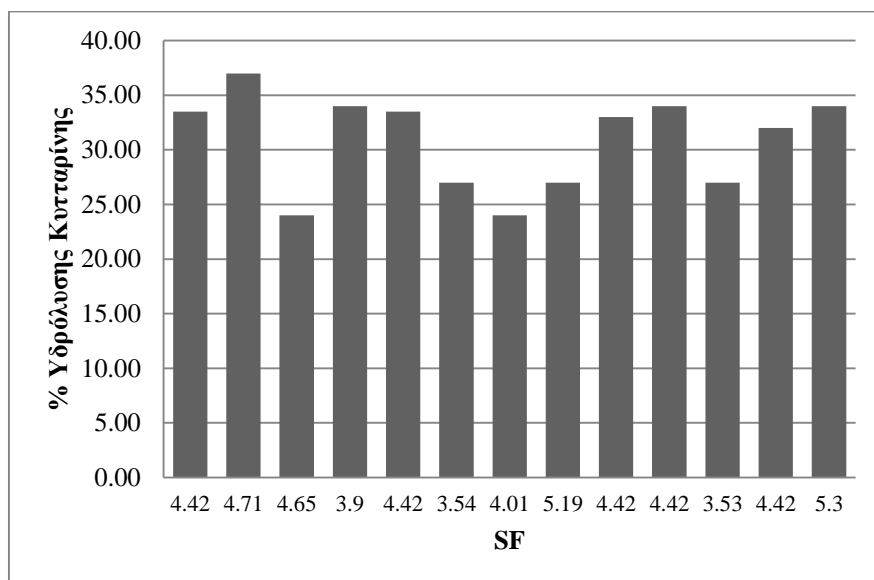
Συνθήκη	Δοκιμή	[γλυκόζης] (8h)	[ΟΑΣ] (8h)	%μετατρ. Κυτταρ.(8h)	SF
(200°C,30min)	1	6,59	8,61	33,5	4,42
(220°C,15min)	2	7,55	9,27	37	4,71
(200°C,51min)	3	4,82	6,61	24	4,65
(200°C, 9min)	4	6,42	8,86	34	3,90
(200°C,30min)	5	6,54	8,91	33,5	4,42
(170°C,30min)	6	4,21	5,37	27	3,54
(180°C,45min)	7	4,08	5,66	24	4,01
(220°C,45min)	8	5,73	6,99	27	5,19
(200°C,30min)	9	6,46	7,91	33	4,42
(200°C,30min)	10	6,58	8,91	34	4,42
(180°C,15min)	11	4,42	5,82	27	3,53
(200°C,30min)	12	6,33	8,70	32	4,42
(230°C,30min)	13	7,32	8,56	34	5,30

Ταυτόχρονα εξάγονται γραφήματα για την περαιτέρω μελέτη και για να διαπιστωθεί η πιο κατάλληλη συνθήκη συναρτήσει των παραπάνω μεταβλητών.



Διάγραμμα 3.16: Συγκέντρωση παραγόμενης γλυκόζης (g/L) για κάθε συνθήκη.

Ομοίως, παρατηρείται η υψηλότερη παραγωγή στις συνθήκες #2 και #13. Αποδεικνύεται λοιπόν ότι μεταξύ στις συνθήκες αυτές (220 °C, 15 min και 230 °C, 30 min) έχουμε την μεγαλύτερη παραγωγή γλυκόζης.



Διάγραμμα 3.17: % υδρόλυσης κυτταρίνης στις 8 h με τον αντίστοιχο παράγοντα αποτελεσματικότητας (SF) για κάθε συνθήκη

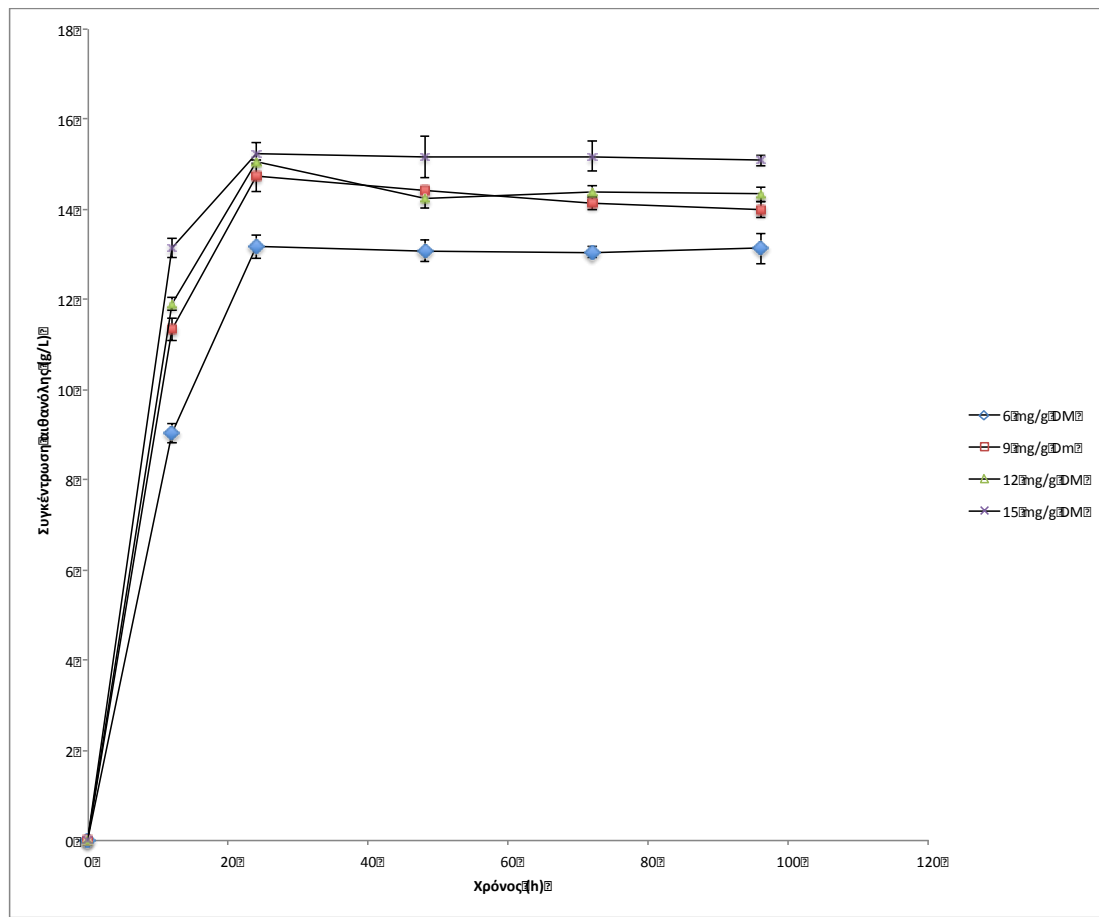
3.6 Παραγωγή Βιοαιθανόλης

Κατά τη διεργασία της ζύμωσης χρησιμοποιείται στέλεχος της ζύμης *S. cerevisiae* *Ethanol Red^R* και σε συνθήκες των 35 °C. Για την παραγωγή της αιθανόλης εφαρμόστηκε η διεργασία ταυτόχρονης σακχαροποίησης και ζύμωσης (*SSF*, Simultaneous Saccharification and Fermentation) με προϋδρόλυση. Παρακάτω παρατίθεται συγκεντρωτικός πίνακας προστιθέμενης ποσότητας ενζύμου με την αντίστοιχη παραγόμενη ποσότητα βιοαιθανόλης σε διάφορες χρονικές στιγμές.

Σε αυτό το στάδιο πραγματοποιήθηκε μελέτη συγκέντρωσης ενζυμικού φορτίου με αντίστοιχη απόκριση την παραγωγή βιο-αιθανόλης, προκειμένου να προσδιοριστεί η βέλτιστη χρησιμοποιούμενη ποσότητα ενζύμου.

Πίνακας 3.5: Συγκέντρωση αιθανόλης (g/L) σε σχέση με τον χρόνο ύστερα από ζύμωση προκατεργασμένου Σ.Α. σε διαφορετικά ενζυμικά φορτία.

Ενζυμικό Φορτίο (mg/g ξ.β)	Χρόνος (h)	[αιθανόλη] (g/L)
6	0	0,00
	12	9,04
	24	13,17
	48	13,09
	72	13,05
	96	13,13
9	0	0,00
	12	11,34
	24	14,74
	48	14,44
	72	14,14
	96	13,99
12	0	0,00
	12	11,91
	24	15,07
	48	14,26
	72	14,40
	96	14,34
15	0	0,00
	12	13,14
	24	15,24
	48	15,16
	72	15,18
	96	15,08



Διάγραμμα 3.18: Παραγωγή αιθανόλης με τον χρόνο συναρτήσει της προστιθέμενης ποσότητας ενζυμικού φορτίου.

Από το άνωθεν διάγραμμα παρατηρείται η μεγαλύτερη ποσότητα βιοαιθανόλης η οποία λαμβάνεται στις 24 h αλκοολικής ζύμωσης με ποσότητα ενζύμου ίση με 15 mg/g ξ.β ενζυμικού φορτίου (Ε.Φ). Την μικρότερη ποσότητα βιοαιθανόλης λαμβάνουμε στη μικρότερη προσθήκη του ενζύμου. Δηλαδή, όσο προστίθεται περισσότερη ποσότητα του ενζύμου τόσο μεγαλύτερη είναι η παραγωγή βιοαιθανόλης. Αυτό έχει ως αποτέλεσμα την επακόλουθη αύξηση του κόστους της ολικής διεργασίας διότι εφαρμόζεται μεγαλύτερη ποσότητα ενζύμου για αύξηση της παραγόμενης ποσότητας αιθανόλης. Δηλαδή τα 15 mg/g ξ.β (Ε.Φ) είναι αρκετά μεγάλη ποσότητα και δεν δικαιολογεί την μικρή αύξηση στη συγκέντρωση της αιθανόλης οπότε δεν προτείνεται. Τα 12 mg/g ξ.β (Ε.Φ) είναι τόσα ώστε να προκαλούν μικρή αύξηση της αιθανόλης άρα δεν δικαιολογείται το κόστος γι' αυτήν την ποσότητα. Συγκρίνοντας τις δύο ποσότητες [9 mg/g ξ.β (Ε.Φ) και 12 mg/g ξ.β (Ε.Φ)], η διαφορά αυτών δεν δικαιολογεί την μικρή αύξηση της συγκέντρωσης της

παραγόμενης αιθανόλης οπότε το κόστος που εμφανίζεται, δεν αποσβένει κατά την παραγωγή του προϊόντος. Βλέπουμε λοιπόν τη διαφορά αυτών και ποσοτικά με 2,2% μεγαλύτερη ποσότητα αιθανόλης στις 24h με προσθήκη 3 mg/g ξ.β περισσότερου ενζυμικού φορτίου. Συμπερασματικά τα 9 mg/g ξ.β (Ε.Φ) είναι η βέλτιστη λύση διότι επιτυγχάνει την ισορροπία μεταξύ ικανοποιητικής ποσότητας παραγόμενης αιθανόλης με τη μικρότερη προσθήκη ενζύμου, δηλαδή επιτυγχάνεται μέγιστη ποσότητα αιθανόλης με το ελάχιστο κόστος.

4 ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ

Για τη βελτιστοποίηση της υδροθερμικής προκατεργασίας του Σ.Α. χρησιμοποιήθηκε η Μεθοδολογία Αποκριτικών Επιφανειών (RSM). Η ανάλυση της σύστασης του στερεού υπολείμματος μετά την υδροθερμική προκατεργασία έδειξε ότι το ποσοστό αποπολυμερισμού της κυτταρίνης ήταν σχετικά χαμηλό, ενώ παρατηρήθηκε εκτενής υδρόλυση της ημικυτταρίνης. Από τα αποτελέσματα συμπεραίνουμε πως:

Από την εφαρμογή του δευτεροβάθμιου μοντέλου, προέκυψε η ακόλουθη εξίσωση:

$$G = -58,63 + 0,521 \cdot x_1 + 0,318 \cdot x_2 - 0,001158 \cdot x_1^2 - 0,002432 \cdot x_2^2 - 0,001044 \cdot x_1 \cdot x_2$$

Προσδιορίστηκαν οι τιμές $p < 0,0001$ και $R^2 = 0,92$ επιβεβαιώνοντας έτσι την ικανοποιητική προσομοίωση που επιτεύχθηκε με το συγκεκριμένο μοντέλο.

Από την επίλυση της παραπάνω εξίσωσης προκύπτει το ζεύγος τιμών θερμοκρασίας και χρόνου κατεργασίας όπου παρατηρείται η μέγιστη απελευθέρωση γλυκόζης (g/L). Οι βέλτιστες συνθήκες προκατεργασίας προκειμένου να επιτευχθεί η μέγιστη απελευθέρωση γλυκόζης ήταν 230 °C και 15 min με μέγιστη προβλεπόμενη απελευθερούμενη γλυκόζη ίση με 7.71 g/L η οποία είναι πολύ κοντά με την πειραματική τιμή των 7.96 g/L. Αυτό το ζεύγος τιμών πλησιάζει τις τιμές της δοκιμής #2 (220 °C και 15 min) όπου το ποσοστό της απελευθερούμενης γλυκόζης βρέθηκε να είναι 7.55 g/L.

Επιπλέον, προσδιορίστηκε ότι υπάρχει συσχετισμός μεταξύ του παράγοντα έντασης (SF: Severity Factor) και της υπολειπόμενης συγκέντρωσης κυτταρίνης, ο οποίος μπορεί να περιγραφεί από την ακόλουθη λογαριθμική εξίσωση

$$C_{\text{cellulose}} = 40,209 \cdot \log(\text{SF}) - 1,6693$$

Ο πιθανολογικός παράγοντας είναι πολύ χαμηλός ($p < 0,0001$) υποδεικνύοντας τη σημαντικότητα της εξίσωσης και ο συντελεστής μεταβλητότητας ($R^2 = 0,92$) αποδεικνύει πολύ καλό συσχετισμό των πειραματικών τιμών από τις αντίστοιχες

θεωρητικές τιμές. Υψηλή συγκέντρωση κυτταρίνης επιτεύχθηκε στις βέλτιστες συνθήκες υδροθερμικής προκατεργασίας και έφτασε σε ποσοστό 61.3 %.

Αλλαγές στα μορφολογικά χαρακτηριστικά των Σ.Α. πριν και μετά την υδροθερμική προκατεργασία στις βέλτιστες συνθήκες (230 °C, 15 min) παρατηρήθηκαν με την επεξεργασία Σάρωσης Ηλεκτρονικής Μικροσκοπίας (SEM). Το Σ.Α. παρουσιάζει αρχικά μία στιλπνή, λεία και επίπεδη επιφάνεια με άκαμπτα ινίδια, ενώ οι ίνες των προκατεργασμένων δειγμάτων εμφανίζουν μία διογκωμένη, τραχειά επιφάνεια με πολλές ρωγμές. Επιπλέον σε μεγέθυνση 800x μπορεί να παρατηρηθεί μία διάτρητη επιφάνεια που καθιστά το υλικό πιο ευάλωτο σε ενζυμική υδρόλυση.

Τέλος, πραγματοποιήθηκε μελέτη με σκοπό τον προσδιορισμό της βέλτιστης ποσότητας ενζυμικού φορτίου για την παραγωγή αιθανόλης με τη διεργασία της ταυτόχρονης σακχαροποίησης και ζύμωσης (SSF) με προϋδρόλυση, καθώς το κόστος του ενζύμου έχει αναγνωριστεί ως ένας σημαντικός συντελεστής στο τελικό κόστος παραγωγής της βιοαιθανόλης.

Η διεργασία της ζύμωσης πραγματοποιήθηκε στους 35 °C. Προσδιορίστηκε η ιδανική ποσότητα ενζυμικού φορτίου (Ε.Φ) για τη βέλτιστη παραγωγή ποσότητας βιοαιθανόλης με ταυτόχρονο μειωμένο κόστος. Βρέθηκε ότι τα 9 mg/g ξ.β Ε.Φ είναι η κατάλληλη ποσότητα που απαιτείται για να επιτευχθεί η ισορροπία μεταξύ ικανοποιητικής ποσότητας προϊόντος και του κόστους παραγωγής του. Προσδιορίστηκε ότι η προσθήκη επιπλέον ποσότητας ενζύμων παρόλο που συντέλεσε στην αύξηση της συγκέντρωσης αιθανόλης, δεν ενδείκνυται για χρήση, καθώς η παραγόμενη αιθανόλη αυξήθηκε από 14,74 g/L (9 mg/g ξ.β Ε.Φ) σε 15,07 g/L (12 mg/g ξ.β Ε.Φ) με ποσοστό δηλαδή ίσο με μόνο 2,2%. Θεωρητικά, η αύξηση του ενζυμικού φορτίου οδηγεί σε αύξηση της παραγωγής αιθανόλης. Ωστόσο, η σύνθετη δομή του λιγνινοκυτταρινούχου υλικού παρεμποδίζει την ενζυμική ενεργότητα. Επομένως από οικονομικής σκοπιότητας, υψηλότερα ενζυμικά φορτία μπορεί να είναι απλά σπατάλη μιας μεγάλης ποσότητας ενζύμων. Η αριστοποίηση, λοιπόν, του ενζυμικού φορτίου είναι μεγίστης σημασίας για μια παραγωγή βιοαιθανόλης υψηλής κλίμακας. Για το λόγο του ότι αυτή η μικρή αύξηση στην παραγωγή αιθανόλης δεν δικαιολογεί το υψηλότερο ενζυμικό φορτίο, επιλέγεται η χρήση 9 mg/g ξ.β Ε.Φ για την παραγωγή του τελικού προϊόντος.

ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

Αθανασάκης Α. και Κουσούρης Θ. (1999) Περιβάλλον και οικολογία στην εκπαίδευση. Εκδόσεις Δαρδάνος, Αθήνα.

Αϊβαλάκης, Καραμπουρνιώτης, Φασσέας (2003). Γενική βοτανική. Αθήνα, Γεωπονικό πανεπιστήμιο Αθηνών.

Ευρωπαϊκή Επιτροπή (2003), Επίσημη εφημερίδα της Ευρωπαϊκής Ένωσης. Οδηγία 2003/30/ΕΚ, L123/42.

Φλογαΐτη Ε. (1993), Περιβαλλοντική Εκπαίδευση. Ελληνικές Πανεπιστημιακές Εκδόσεις, Αθήνα.

Χριστακόπουλος & Τόπακας (2013) Εκδόσεις ΕΜΠ.

Agbogbo F.K. and Coward-Kelly G. (2008) Cellulosic ethanol production using the naturally occurring xylose-fermenting yeast, *Pichia stipitis*. Biotechnol. Lett. 30 (9) pp: 1515–1524.

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 pp: 340–349.

Ayse Avcı, Badal C. Saha, Bruce S. Dien, Gregory J. Kennedy, Michael A. Cotta (2013) Response surface optimization of corn stover pretreatment using dilute phosphoric acid for enzymatic hydrolysis and ethanol production.

Azhar A.F., Bery M.K., Colcord AR, Roberts R.S., Corbitt G.V. (1981) Factors affecting alcohol fermentation of wood acid hydrolyzate. Biotechnol. Bioeng. Symp. 11 pp: 293-300.

Balat M. (2007) Global bio-fuel processing and production trends, Energy Explor. Exploit. 25 pp: 195–218.

Balat M., Balat H., Oz C. (2008) Progress in bioethanol processing. Progress in Energy and Combustion Science, 34 pp: 551-573.

Banerjee N., Bhatnagar R., Viswanathan L. (1981) Inhibition of glycolysis by furfural in *Saccharomyces cerevisiae*. Appl. Microbiol. Biotechnol. 11 pp: 226–228.

Banerjee N., Bhatnagar R., Viswanathan L. (1981b) Inhibition of glycolysis by furfural in *Saccharomyces cerevisiae*. Eur. J. Appl. Microbiol. Biotechnology. 11, pp: 226-228.

Bothast R.J. & Schlicher M.A. (2005) Biotechnological processes for conversion of corn into ethanol. Appl. Microbiol. Biotechnol. 67(1) pp :19-25.

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 pp: 122–125.

Brovenko G.N., Gusel'nikova T.V. (1993) Chemical composition of wood hydrolyzates as a substrate for microbial protein synthesis. 1. Furfural and hydroxymethylfurfural. *Gidroliz. Lesokhim. Prom-st.* 1 pp: 6-10.

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.

Chandel A., Chan E.S., Rudravaram R., Narasu M., Rao L., Ravindra P. (2007) Economics and environmental impact of bioethanol production technologies: an appraisal. *Biotechnology and Molecular Biology Reviews*, 2 pp: 014-032.m

Christakopoulos P., Makris B.J., Kekos D. (1989) Direct fermentation of cellulose to ethanol by *Fusarium oxysporum* . Enzyme and Microbial Technology 11(4) pp: 236-239.

Christakopoulos P., Mamma D., Nerinckx W., Kekos D., Macris B., Claeysens M. (1996a) Production and partial characterization of xylanase from *Fusarium oxysporum* . Bioresource Technology, 58(2) pp: 115-119.

de Carvahlo Lima K.G., Takahashi C.M., Alterthum F. (2002) Ethanol production of corn cob hydrolysates by *Escherichia coli* KO11. J. Ind. Microbiol. Biotechnol. 6, pp: 124-128.

Demain A., (2009) Biosolutions to the energy problem. Journal of Industrial Microbiology Biotechnology, 36(3), pp: 319-332.

Demirbas A. (2008) The Importance of Bioethanol and Biodiesel from Biomass: Energy Sources. Part B: Economics, Planning, and Policy, 3:2 pp: 177-185.

Demirbas A. (2009) Biofuels securing the planet's future energy needs. Energy Conversion and Management, Volume 50, Issue 9 pp: 2239-2249.

Deshpande V., Lachke A., Mishra C., Keshar S., Rao M. (1986a) Mode of action and properties of xylanase and β -xylosidase from *Neurospora crassa*. Biotechnol. Bioeng. 28 pp: 1832-1837.

Deshpande V., Keshar S., Mishra C., Tao M. (1986b) Direct conversion of cellulose/hemicelluloses to ethanol by *Neurospora crassa*. Enzyme and Microbiol. Technology 8(3) pp: 149-152.

Dien B.S., Nichol N.N., O' Bryan P.J., Bothast R.J. (2000) Development of new ethanologenic *Escherichia coli* strains for fermentation of lignocellulosic biomass. Appl. Biochem. Biotechnol. 66 pp: 181-196.

Dien B.S., Cotta M.A., Jeffries T.W. (2003) Bacteria engineered for fuel ethanol production: current status. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 63 pp: 258–266.

Dogaris I., Vakontios G., Kalogeris E., Mamma D., Kekos D. (2009) Induction of cellulases and hemicellulases from *Neurospora crassa* under solid-state cultivation for bioconversion of sorghum corn stover into ethanol. *Industrial Crops and Products*, 29(2-3) pp: 404-411.

Drew M.C., He C. J. and Morgan P.W. (1989) Decreased ethylene biosynthesis, and induction of aerenchyma, by nitrogen- or phosphate- starvation in adventitious roots of *Zea mays*.

Dumsday G. J., Zhou B., Yakin W., Stanley G.A., Pamment N.B. (1999) Comparative stability of ethanol production by *Escherichia coli* KO11 in batch and chemostat culture. *J. Ind. Microbiol. Biotechnol.* 49(3) pp: 701-708.

Eliasson A., Hofmeyr J-H.S., Pedler S., Hahn-Hägerdal B. (2001) The xylose reductase/xylylitol dehydrogenase/xylylulokinase ratio affects product formation in recombinant xylose-utilizing *Saccharomyces cerevisiae*. *Enzyme Microb. Technol.* 29 pp: 288-297.

Galbe M. and Zacchi G. (2002) A review of the production of ethanol from softwood. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 59 pp: 618–628.

Galbe M. and Zacchi G. (2007) Pretreatment of lignocellulosic materials for efficient bioethanol production. *Advances in Biochemical Engineering/Biotechnology* 108 pp: 41-65.

Geddes, C.C., Peterson, J.J., Roslander C., Zacchi G., Mullinnix M.T., Shanmugam K.T., Ingram L.O. (2010) Optimizing the saccharification of sugar corn stover using dilute phosphoric acid followed by fungal cellulases. *Bioresour. Technol.* 101 pp: 1851–1857.

Ghose T.K. (1987) Measurement of cellulase activities. *Pure Appl. Chem.* 59 pp: 257-268.

Goldemberg J. (2007) Ethanol for Sustainable Energy Future, *Science* 9, 315 pp: 808-810.

Gray K.A., Zhao L., Emptage M., (2006) *Bioethanol: Current Opinion in Chemical Biology.* 10(2) pp: 141-146.

Gusakov A.V., Salanovich T.N., Antonov A.I., Ustinov B.B., Okunev O.N., Burlingame R. (2007) Design of highly efficient cellulose mixtures for enzymatic hydrolysis of cellulose. *Bioeng.* 97 pp: 1028-1038.

Hector R.E., Qureshi N., Hughes S.R. & Cotta M.A. (2008) Expression of heterologous xylose transporter in a *Saccharomyces cerevisiae* strain engineered to utilize xylose improves aerobic xylose consumption. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 80(4) pp: 675-684.

Hahn-Hägerdal B., Karhumaa K., Fonseca C., Spencer-Martins I., Gorwa-Grauslund M.F. (2007) Towards industrial pentose-fermenting yeast strains. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 74(5) 937-953.

Hahn-Hägerdal B., Karhumaa K., Jeppsson M. & Gorwa-Grauslund M.F. (2007b) Metabolic engineering for pentose utilization in *Saccharomyces cerevisiae*. *Adv. Biochem. Eng. Biotechnol.* 108 pp: 147-177.

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) pp: 138-151.

Holtzapfe M., Cognata M., Shu Y. and Hendrickson C. (1990) Inhibition of *Trichoderma reesei* cellulase by sugars and solvents. *Biotechnol. Bioeng.* 36 (3) pp: 275-287.

Ingram L.O., Conway T., Clark D.P., Sewell G.W., Preston J.F. (1987) Genetic engineering of ethanol production in *Escherichia coli*. *Appl. Environ. Microbiol.* 169 pp: 2420-2425.

Jeffries T.W. & Jin Y.S. (2004) Metabolic engineering for improved fermentation of pentoses by yeasts. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 63(5) pp: 495-509.

Jeffries T.W. (2006) Engineering yeasts for xylose metabolism. *Curr. Opin. Biotechnol.* 17(3) pp: 320-326.

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.

Joa o R.M. Almeida, Tobias Modig, Anneli Petersson, Barbel Hahn-Hagerdal, Gunnar Liden and Marie F. Gorwa Grauslund (2007) Increased tolerance and conversion of inhibitors in lignocellulosic hydrolysates by *Saccharomyces cerevisiae*. *Chem. Technol. Biotechnol.* 82 pp: 340–34

J R Mielenz, (2001) Ethanol production from biomass: technology and commercialization status. *Curr. Opin. Microbiol.* 4 (3) pp: 324-329

Kim S. & Dale B.E. (2005) Environmental aspects of ethanol derived from v0-tilled corn grain: non-renewable energy consumption and greenhouse gas. *Biomass Bioenergy* 28 pp: 475-489.

Klinke H.B., Thomsen A.B. and Ahring B.K. (2004) Inhibition of ethanol producing yeast and bacteria by degradation products produced during pretreatment of biomass. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 66 pp: 10–26.

Kristensen J.B., Börjesson J., Bruun M.H., Tjerneld F., Jørgensen H. (2007) Use of surface active additives in enzymatic hydrolysis of wheat straw lignocelluloses. *Enzyme and Microbial Technology*, 40(4) pp: 888-895.

Lachke A. (2002) Biofuel from D -xylose — The second most abundant sugar. *Resonance* 5 pp: 50-58.

Larsson S., Palmqvist E., Hahn-Hägerdal B., Tengborg C., Stenberg K., Zacchi G., Nilvebrant N.-O. (1999a) The generation of fermentation inhibitors during dilute acid hydrolysis of softwood. *Enzyme Microbial Technol.* 24 pp: 151–159.

Larsson S., Reimann A., Nilvebrant N.-O., Jönsson L.J. (1999b) Comparison of different methods for detoxification of lignocellulose hydrolyzates of spruce. *Appl. Biochem. Biotechnol.*, pp: 77–79, 91–103.

Lee J. (1997) Biological conversion of lignocellulosic biomass to ethanol. *Journal of Biotechnology* 56 pp: 1-24.

Lee J.W., Jeffries T.W. (2011) Efficiencies of acid catalysts in the hydrolysis of lignocellulosic biomass over a range of combined severity factors. *Bioresour. Technol.* 102 pp: 5884–5890.

Lee S.K., Chu 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.

Lisbeth Olsson and B &-be1 Hahn-Hägerdal (1996) Fermentation of lignocellulosic hydrolysates for ethanol production. *Enzyme and Microbial Technology* 18 pp: 312-331.

Liu S.-Y. and Lin C.-Y. (2009) Development and perspective of promising energy plants for bioethanol production, *Taiwan Renewable Energy*, 34 (8) pp: 1902-1907.

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.

Martin M., Delgenes J. P., Moletta R., Navarro J. M. (1992) Biomass degradation products affecting xylose fermentation by *Pichia stipitis* and *Candida shehatae*. In. *Biomass Energy, Ind. Environ. E. C. Conf.* pp: 1332-1336.

Matsushika A., Watanabe S., Kodaki T., Makino K., Sawayama S. (2008) Bioethanol production from xylose by recombinant *Saccharomyces cerevisiae* expressing xylose reductase, NADP⁺-dependent xylitol dehydrogenase and xylulokinase. *J. Biosci. Bioeng.* 105(3) pp: 296-299.

Murray D. (2005) Ethanol's potential: Looking beyond corn: Eco- Economy Updates, Earth Policy Institute.

Mishra C., Keskar S., Rao M. (1986) Production and properties of extracellular endoxylanase from *Neurospora crassa*. *Appl. Environ. Microb.* 48 pp: 224-228.

M. J. Taherzadeh (1999) Ethanol from Lignocellulose: Physiological Effects of Inhibitors and Fermentation Strategies. Thesis for the Degree of Doctor of Philosophy, Department of Chemical Reaction Engineering, Chalmers University of Technology, Göteborg, Sweden.

Modig T., Lidén G., Taherzadeh M.J. (2002) Inhibition effects of furfural on alcohol dehydrogenase, aldehyde dehydrogenase and pyruvate dehydrogenase. *J. Biochem.* 363 pp: 769–776.

Palmqvist E. and Hahn-Hagerdal B. (2000) Fermentation of lignocellulosic hydrolysates. II: Inhibitors and mechanisms of inhibition. *Bioresource Technol.* 74 pp: 25–33.

Pan X., Arato C., Gilkes N., Gregg D., Mabee W., Pye K., Xiao Z., Zhang X., Saddler J. (2005) Biorefining of softwoods using ethanol organosolv pulping: Preliminary evaluation of process streams for manufacture of fuel-grade ethanol and co-products. *Biotechnology and Bioengineering*, 90(4) pp: 473-481.

Panagiotou G., Kekos D., Macris B.J., Christakopoulos P. (2003) Production of cellulolytic and xylanolytic enzymes by *Fusarium oxysporum* grown on corn stover in solid state fermentation. *Industrial Crops and Products* 18(1) pp: 37-45.

Panagiotou G., Christakopoulos P., Olsson L. (2005a) Simultaneous saccharification and fermentation of cellulose by *Fusarium oxysporum* F3 - Growth characteristics and metabolite profiling, *Enzyme and Microbial Technology* 36(5-6) pp: 693-699.

Panagiotou G., Villas-Bôas S.G., Christakopoulos P., Nielsen J., Olsson L. (2005b) Intracellular metabolite profiling of *Fusarium oxysporum* converting glucose to ethanol, *Journal of biotechnology* 115(4) pp: 425-434.

Panagiotou G., Christakopoulos P., Villas-Boas S.G., Olsson L. (2005c) Fermentation performance and intracellular metabolite profiling of *Fusarium oxysporum* cultivated on a glucose-xylose mixture. *Enzyme and Microbial Technology* 36(1) pp: 100-106.

Phadtare S.U., Rawat U.B., Rao M.B. (1997) Purification and characterization of xylitol dehydrogenase from *Neurospora crassa*. *FEMS Microbiology Letters* 146(1) pp: 79-83.

Pu Y., Zhang D., Singh P.M., Ragauskas A.J. (2008) The new forestry biofuels sector. *Biofuels, Bioproducts, Biorefining* 2(1) pp: 58-73.

Qian Y., Yomano L.P., Preston J.F., Aldrich H.C., Ingram L.O. (2003) Cloning, characterization and functional expression of the *Klebsiella oxytoca* xylodextrin utilization operon (xyn TB) in *Escherichia coli*. *Appl. Environ. Microbiol.* 25 pp: 5957-5967.

Rao M., Mishra C., Keskar S., Srinivasan M.C. (1985) Production of ethanol from wood and agricultural residues by *Neurospora crassa*. *Enzyme and Microbial Technology* 7(12) pp:625-628.

Rawat U., Bodhe A., Deshpande V., Rao M. (1993) D-xylose catabolizing enzymes in *Neurospora crassa* and their relationship to D-xylose fermentation. *Biotechnology Letters* 15(11) pp: 1173-1178.

Ress W. (1998) *Sustainable Development: Economic Myths and Ecological Realities*, Trumpeter (5)

Rivard C., Engel R., Hayward T., Nagle N, Hatzis C., Philippidis G. (1996) Measurement of the inhibitory potential and detoxification of biomass pretreatment hydrolyzate for ethanol production. *Appl Biochem Biotechnol* 57–58 pp: 183–191.

Romero I., Moya M., Sanchez S., Ruiz E., Castro E., Bravo V. (2007) Ethanolic fermentation of phosphoric acid hydrolysates from olive tree pruning. *Ind. Crops Prod.* 25 pp: 160–168.

Romero M.D., Aguado J., Donzález L., Ladero M. (1999) Cellulase production by *Neurospora crassa* on wheat straw. *Enzyme and Microbial Technology* 25(3-5) pp: 244-250.

Saha B.C. (2004) Lignocellulose biodegradation and applications in biotechnology. In: Saha, B.C., Hayashi, K. (Eds.) *Lignocellulose Biodegradation*. Amer. Chem. Soc, Washington, DC, pp: 1–34.

Sakellariou-Makrantonaki M., Papalexis D., Nakos N., Kalavrouziotis I.K. (2007) Effect of modern irrigation methods on growth and energy production of sweet sorghum (var. Keller) on a dry year in Central Greece, *Agricultural Water Management* 90 (3) pp: 181-189.

Saloheimo A., Rauta J., Stasyk O.V., Sibirny A.A., Penttila M. & Ruohonen L. (2007) Xylose transport studies with xylose-utilizing *Saccharomyces cerevisiae* strains expressing heterologous and homologous permeases. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 74(5) pp: 1041-1052.

Sánchez B., Bautista J. (1988) Effects of furfural and 5-hydroxymethylfurfural on the fermentation of *Saccharomyces cerevisiae* and biomass production from *Candida guilliermondii*. *Enzyme Microb. Technol.* 10 pp: 315-318.

Sánchez O.J., Cardona C.A. (2008) Trends in biotechnological production of fuel ethanol from different feedstocks. *Bioresource Technology* 99 (13) p: 5270-5295.

Saxena R.C., Adhikari D.K., Goyal H.B. (2009) Biomass-based energy fuel through biochemical routes: A review. *Renewable and Sustainable Energy Reviews* 13 pp: 167–178.

Sluiter A. (2005) Determination of structural carbohydrates and lignin biomass. *Laboratory Analytical Protocol: National Renewable Energy Laboratory, Golden, CO.*

Steele B., Raj S., Nghiem J., Stowers M. (2005) Enzyme recovery and recycling following hydrolysis of ammonia fiber explosion-treated corn stover. *Applied Biochemistry and Biotechnology - Part A, Enzyme Engineering and Biotechnology*, 124(1-3) pp: 901-910.

Sun Y., Cheng J. (2002) Hydrolysis of lignocellulosic materials for ethanol production: a review. *Bioresource Technology* 83 pp: 1-11.

Taherzadeh M.J., Gustafsson L., Niklasson C., Lidén G. (1999) Conversion of furfural in aerobic and anaerobic batch fermentation of glucose by *Saccharomyces cerevisiae*. *J. Biosci. Bioeng.* 87(2) pp: 169-174.

Thompson J.L., Tyner W.E. (2014) Corn stover for bioenergy production: Cost estimates and farmer supply response-*Biomass and Bioenergy* pp: 1-8.

Tomás-Pejó E., Oliva J.M., Ballesteros M. (2008) Realistic approach for full-scale bioethanol production from lignocelluloses: A review. *Journal of Scientific and Industrial Research*, 67(11) pp: 874-84.

Tu M., Zhang X., Paice M., MacFarlane P., Saddler J.N. (2009) The potential of enzyme recycling during the hydrolysis of a mixed softwood feedstock. *Bioresource Technology*, Article in Press.

von Sivers M., Zacchi G., Olsson L., Hahn-Hagerdal B. (1994) Cost analysis of ethanol production from willow using recombinant *Escherichiacoli*. *Biotechnol. Prog.* 10 pp: 555–560.

Wu C.Z., Yin X.L., Yuan Z.H., Zhou Z.Q., Zhuang X.S. (2009) The development of bioenergy technology in China. *Energy*, Article in Press.

Wyman C.E., Dale B.E., Elander R.T., Holtzapple M., Ladisch M.R., Lee Y.Y. (2005) Coordinated development of leading biomass pretreatment technologies. *Bioresource Technology* 96 (18 SPEC. ISS.) pp: 1959-1966.

Xiros C., Topakas E., Katapodis P., Christakopoulos P. (2008a) Evaluation of *Fusarium oxysporum* as an enzyme factory for the hydrolysis of brewer's spent grain with improved biodegradability for ethanol production. *Industrial Crops and Products* 28(2) pp:213-224.

Xiros C., Topakas E., Katapodis P., Christakopoulos P. (2008b) Hydrolysis and fermentation of brewer's spent grain by *Neurospora crassa*. *Bioresource Technology* 99(13) pp: 5427-5435.

Xiros C., Christakopoulos P. (2009) Enhanced ethanol production from brewer's spent grain by a *Fusarioum oxysporum* consolidated system. *Biotechnology for Biofuels* 2, art. No 4.

Xu Q. Singh A., Himmel M.E. (2009) Perspectives and new directions for the production of bioethanol using consolidated bioprocessing of lignocellulose. *Current Opinion and Biotechnology* 20(3) pp: 364-379.

Yazdi M.T., Radford A., Keen J.N., Woodward J.R. (1990a) Cellulase production by *Neurospora crassa*: purification and characterization of cellulolytic enzymes. *Enzyme Microb. Technol.* 12 pp: 120-123.

Yazdi M.T., Woodward J.R., Radford A. (1990b) The cellulose complex of *Neurospora crassa*: Activity, stability and release. *Journal of General Microbiology* 136(7) pp: 1313-1319.

Yourchisin D.M., van Walsum P.G. (2004) Comparison of microbial inhibition and enzymatic hydrolysis rates of liquid and solid fractions produced from pretreatment of biomass with carbonic acid and liquid hot water. *Appl. Biochem. Biotechnol.* pp: 113-116, 1073– 1086.

Yu J., Zhong J., Zhang X., Tan T. (2008) Ethanol production of H₂SO₃ steam-pretreated corn stover by Simultaneous Saccharification and Fermentation. *Applied Biochemistry and Biotechnology* pp: 1-9 Article in Press.

Zaldivar J., Martinez A., Ingram L.O. (2000) Effect of alcohol compounds found in hemicelluloses hydrolysate on the growth and fermentation of ethanologenic *Escherichia coli*. *Biotechnol. Bioeng.* 50(2) pp: 524-530.

Zaldivar J., Nielsen J., Olsson L. (2001) Fuel ethanol production from lignocellulose: a challenge for metabolic engineering and process integration. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 56 pp: 17-34.

Zhang M., Eddy C., Daenda K., Finkelstein M., Picataggio S.K. (1995) Metabolic engineering of a pentose pathway in ethanologenic *Zymomonas mobilis*. *Science* 267 pp: 240-243.

Zhao Y.L., Dolat A., Steinberger Y., Wang X., Osman A., Xie G.H. (2009) Biomass yield and changes in chemical composition of corn stover grown for biofuel. *Field Crops Research* 111(1-2) pp: 55-64.

Zhou S., Davis F.C., Ingram L.O. (2001) Gene integration and expression and extracellular secretion of *Erwinia chrysanthemi* endoglucanase CeIY (ceIY) and CeIZ (ceIZ) in ethanologenic *Klebsiella oxytoca* P2. *Appl. Environ. Microbiol.* 183 pp: 6-14.
