

Εθνικό **Μ**ετσόβιο **Π**ολυτεχνείο

Σχολή Χημικών Μηχανικών

Εργαστήριο Βιοτεχνολογίας

**Ανάπτυξη ολοκληρωμένης διεργασίας παραγωγής
βιοαιθανόλης από υδροθερμικά προκατεργασμένη
λιγνινοκυτταρινούχο βιομάζα**



Διδακτορική Διατριβή

Θωμάς Πάσχος

Χημικός Μηχανικός

Αθηνά, 2016

Η έγκριση της διδακτορικής διατριβής από την Ανώτατη Σχολή Χημικών Μηχανικών του Ε.Μ. Πολυτεχνείου δεν υποδηλώνει αποδοχή των γνώμων του συγγραφέα. (Ν. 5343/1932, Άρθρο 202).

Τα ζώα έξω από το παράθυρο κοίταζαν
από γουρούνι σε άνθρωπο και από άνθρωπο σε γουρούνι,
αλλά ήταν αδύνατο να πει κανείς
ποιος ήταν ο άνθρωπος και ποιο το γουρούνι.

Έρικ Μπλέρ (Τζόρτζ Όργουελ)

Η φάρμα των ζώων, 1945.

Πρόλογος

Η παρούσα διδακτορική διατριβή εκπονήθηκε στο Εργαστήριο Βιοτεχνολογίας της Σχολής Χημικών Μηχανικών του ΕΜΠ. Με την ολοκλήρωση της διατριβής θα ήθελα να ευχαριστήσω τον επιβλέποντα καθηγητή μου κ. *Πάυλο Χριστακόπουλο* για την βοήθεια, τις συμβουλές και τις υποδείξεις του. Ευχαριστώ επίσης τους καθηγητές κ. *Δημήτρη Κέκο* και κ. *Φραγκίσκο Κολίση* για τις συμβουλές και την υποστήριξη τους όλα αυτά τα χρόνια.

Επίσης, θα ήθελα να ευχαριστήσω θερμά τον Δρ. Χαρίλαο Ξηρό για την σημαντική επιστημονική βοήθεια που μου πρόσφερε και την άπογη καθημερινή συνεργασία που είχαμε. Την Δρ. Χριστίνα Βαφειάδη που με βοήθησε στα πρώτα μου βήματα στο εργαστήριο, την Δρ. Διομή Μάμμα που ήταν εκεί όταν τη χρειάστηκα στα τελευταία μου βήματα και τον Επικ. καθηγητή κ. Ευάγγελο Τόπακα για τις συμβουλές και τη βοήθεια του. Ακόμα θέλω να ευχαριστήσω όλους τους συναδέλφους μου στο εργαστήριο Βιοτεχνολογίας, τον Λεωνίδα, την Ανθή, το Μάκη, την Κατερίνα, τη Μαρία Σ., την Μαρία Μ., την Μαρία Δ., τη Νατάσσα, την Δανάη, τον Γιάννη, τον Σταύρο, την Ελισάβετ, τη Στέλλα, τη Μαριάννα, τη Ριχάμπ, το Στράτο, τον Παναγιώτη, τον Κώστα και την Μαρία Κ. για το φιλικό και ευχάριστο περιβάλλον που μου προσέφεραν, καθώς και όλους τους ανθρώπους του εργαστηρίου τροφίμων που με βοήθησαν και με ανέχτηκαν. Ακόμα θέλω να ευχαριστήσω τους προπτυχιακούς φοιτητές Παπαδάτου Σ., Γιαννακούλη Δ., Χαραλαμπίδη Α., Νταβέλα Ρ., Χανιώτη Σ., Γελεγένη Ν., και Ζουλιάτη Α., με τους οποίους συνεργάστηκα στα πλαίσια της διπλωματικής τους εργασίας.

Τέλος, θέλω να ευχαριστήσω τους γονείς μου Παναγιώτα και Λευτέρη, και την σύντροφο μου Χρύσα, για την συμπαράσταση και την κατανόηση που μου έδειξαν για να μπορέσω να ολοκληρώσω την διατριβή μου.

Η διατριβή χρηματοδοτήθηκε μέσω υποτροφίας από το Ίδρυμα Κρατικών Υποτροφιών, το οποίο ευχαριστώ θερμά.

Δημοσιεύσεις – Ανακοινώσεις σε συνέδρια

Εργασίες σε διεθνή περιοδικά:

1. Paschos T, Xiros C, Christakopoulos P: Simultaneous saccharification and fermentation by co-cultures of *Fusarium oxysporum* and *Saccharomyces cerevisiae* enhances ethanol production from liquefied wheat straw at high solid content. *Ind Crop Prod*, 2015. 76 (15): 793–802
2. Paschos T, Xiros C, Christakopoulos P: Ethanol effect on metabolic activity of the ethalogenic fungus *Fusarium oxysporum*. *BMC Biotechnol*, 2015. 15: 15.
3. Xiros C, Vafiadi C, Paschos T, Christakopoulos P: Toxicity tolerance of *Fusarium oxysporum* towards inhibitory compounds formed during pretreatment of lignocellulosic materials. *J Chem Technol Biotechnol* 2011, 86 (2):223-230.

Ανακοινώσεις σε συνεδρία.

1. Thomas Paschos, Charilaos Xiros, Paul Christakopoulos: Evaluation of *Fusarium oxysporum* consolidated system for ethanol production from the liquefied hydrothermally pretreated wheat straw fiber fraction. *New Biotechnology, Volume 29, Supplement, 23–26 September 2012, Page S46*.
2. Συμμετοχή με ανηρτημένη παρουσίαση στο 10^ο Πανελλήνιο Συνέδριο Χημικής Μηχανικής, Πάτρα, Ιούνιος, 2015, “Επίδραση της αιθανόλης στην μεταβολική και ενζυμική ενεργότητα του μύκητα *Fusarium oxysporum*” Πάσχος Θ., Ξηρός Χ., Χριστακόπουλος Π..

Περιεχόμενα

Περίληψη	i
Abstract	v
Θεωρητική Ανασκόπηση	1
1. Εισαγωγή	1
1.1 Βιομάζα και Βιοκαύσιμα	3
1.2 Βιοαιθανόλη	4
1.3 Λιγνινοκυτταρινούχα υλικά	5
1.3.1 Το άχυρο σίτου	8
1.4 Βιομετατροπή λιγνινοκυτταρινούχων υλικών σε αιθανόλη	10
1.4.1 Υδροθερμική προκατεργασία	15
1.4.2 Εκτίμηση της αποτελεσματικότητας της προκατεργασίας	18
1.4.3 Παρεμποδιστικές ενώσεις	19
1.4.4 Στρατηγικές για την αντιμετώπιση των παρεμποδιστικών φαινομένων	22
1.4.5 Ενζυμική υδρόλυση της λιγνινοκυτταρίνης	25
1.4.6 Διεργασίες βιομετατροπής της λιγνινοκυτταρίνης σε αιθανόλη	29
1.5 Ο μύκητας <i>Fusarium oxysporum</i>	35
1.6 Ο μεταβολισμός των σακχάρων προς αιθανόλη	37
1.7 Η επίδραση της αιθανόλης στον μεταβολισμό των μικροοργανισμών	39
1.7.1 Ανάπτυξη και Μορφολογία Κυττάρων	40
1.7.2 Διαπερατότητα και δομή μεμβράνης	41
Υλικά και Μέθοδοι	44
2. Υλικά και Μέθοδοι	44
2.1 Μικροοργανισμοί	44

2.2 Λιγνινοκυταρινούχα Υποστρώματα	44
2.3 Χημικά Αντιδραστήρια και Ενζυμικά Σκευάσματα	45
2.4 Όργανα και συσκευές	46
2.5 Υδροθερμική προκατεργασία άχυρου σίτου	47
2.6 Ανάπτυξη του μύκητα <i>F. oxysporum</i>	49
2.7 Παραγωγή κυτταρικής βιομάζας του μύκητα <i>F. oxysporum</i>	49
2.8 Μέτρηση βιομάζας	50
2.9 Παραγωγή ενζύμων	50
2.10 Μέτρηση ενζυμικών ενεργοτήτων	51
2.11 Επίδραση των παρεμποδιστικών ενώσεων στην ξυλανολυτική (1,4-β-D-xylan xylanohydrolase EC 3.2.1.8) και κυτταρινολυτική (Cellulase activity EC 3.2.1) ενεργότητα του ενζυμικού συστήματος του <i>F. oxysporum</i>	52
2.12 Επίδραση των παρεμποδιστικών ενώσεων στην ανάπτυξη του <i>F. oxysporum</i> σε αερόβιες βυθισμένες καλλιέργειες	53
2.13 Παραγωγή αιθανόλης σε βυθισμένες αναερόβιες καλλιέργειες υπό την παρουσία παρεμποδιστικών ενώσεων	54
2.14 Επίδραση της αιθανόλης στην ανάπτυξη του <i>F. oxysporum</i> σε αερόβιες βυθισμένες καλλιέργειες	55
2.15 Επίδραση της αιθανόλης στην ξυλανολυτική (1,4-β-D-xylan xylanohydrolase, EC 3.2.1.8) και κυτταρινολυτική (Cellulase activity, EC 3.2.1) ενεργότητα του ενζυμικού συστήματος του <i>F. oxysporum</i>	56
2.16 Σταθερότητα του ενζυμικού συστήματος στην παρουσία αιθανόλης	56
2.17 Παραγωγή αιθανόλης σε βυθισμένες αναερόβιες καλλιέργειες υπό την επίδραση αιθανόλης	57
2.18 Μερική απομάκρυνση της αιθανόλης κατά την ζύμωση	57

2.19 Ανάπτυξη και παραγωγή αιθανόλης από το Υγρό Κλάσμα (ΥΚ) της υδροθερμικής κατεργασίας του άχυρου σίτου σε βυθισμένες καλλιέργειες	58
2.20 Προσαρμογή της ανάπτυξης του μύκητα <i>F. oxysporum</i> στο Υγρό Κλάσμα της υδροθερμικής προκατεργασίας	59
2.21 Κλασματοποίηση του Υγρού Κλάσματος	59
2.22 Αποτοξικοποίηση του Υγρού Κλάσματος με τη χρήση ρητινών ιοντοεναλλαγής	60
2.23 Ρευστοποίηση του Υδροθερμικά κατεργασμένου άχυρου σίτου.	61
2.24 Μέτρηση ιξώδους	63
2.25 Αξιοποίηση του ρευστοποιημένου αχύρου για την παραγωγή αιθανόλης.	64
2.25.1 Παραγωγή αιθανόλης από το ρευστοποιημένο άχυρο με τη ζύμη <i>S. cerevisiae</i>	64
2.25.2 Προσθήκη του συμπυκνωμένου συστήματος ενζύμων του <i>F. oxysporum</i> στη ζύμωση του ρευστοποιημένου αχύρου	64
2.25.3 Προσθήκη κυτταρικής μάζας του <i>F. oxysporum</i> στην ζύμωση του ρευστοποιημένου αχύρου	64
2.25.4 Αξιολόγηση του ενζυμικού και μικροβιακού δυναμικού του μύκητα <i>F. oxysporum</i> σε μικτές καλλιέργειες παραγωγής αιθανόλης	65
2.25.5 Ταυτόχρονη σακχαροποίηση και ζύμωση του ρευστοποιημένου αχύρου με μικτή καλλιέργεια <i>F. oxysporum</i> και <i>S. cerevisiae</i>	66
2.26 Αναλυτικές μέθοδοι	67

Αποτελέσματα και Συζήτηση	69
3. Μελέτη της επίδρασης των παρεμποδιστικών ουσιών που σχηματίζονται κατά την προκατεργασία λιγνινοκυτταρινούχων υλικών, στον μεταβολισμό και το ενζυμικό σύστημα του μύκητα <i>F. oxysporum</i>	69
3.1 Επίδραση παρεμποδιστικών ουσιών στην ανάπτυξη του μύκητα <i>F. oxysporum</i>	69
3.2 Επίδραση παρεμποδιστικών ουσιών στην παραγωγή αιθανόλης (ζύμωση) από το μύκητα <i>F. oxysporum</i>	74
3.3 Μελέτη συνεργιστικής επίδρασης των παρεμποδιστικών ουσιών στην παραγωγή αιθανόλης	78
3.4 Επίδραση παρεμποδιστών στο ενζυμικό σύστημα (κυτταρινολυτικό - ημικυτταρινολυτικό) του <i>F. oxysporum</i>	79
3.5 Συμπεράσματα	83
4. Επίδραση της αιθανόλης στο μεταβολικό και το ενζυμικό σύστημα του <i>F. oxysporum</i>	84
4.1 Αερόβια ανάπτυξη του μύκητα <i>F. oxysporum</i> παρουσία αιθανόλης	84
4.2 Παραγωγή αιθανόλης από το μύκητα <i>F. oxysporum</i> παρουσία αιθανόλης	89
4.3 Επίδραση της αιθανόλης στον ενζυμικό σύστημα του <i>F. oxysporum</i>	93
4.4 Αφαίρεση της παραγόμενης αιθανόλης από το μέσο καλλιέργειας	99
4.5 Συμπεράσματα	102
5. Αξιοποίηση του Υγρού Κλάσματος που προκύπτει από την προκατεργασία του άχυρου σίτου	103
5.1 Αερόβια ανάπτυξη και παραγωγή ενζύμων από το μύκητα <i>F. oxysporum</i> στο Υγρό Κλάσμα	103

5.2 Αξιοποίηση του Υγρού Κλάσματος για την παραγωγή αιθανόλης από το μύκητα <i>F. oxysporum</i>	107
5.3 Προσαρμογή του μύκητα <i>F. oxysporum</i> στο Υγρό Κλάσμα	109
5.4 Αποτοξικοποίηση του Υγρού Κλάσματος για την παραγωγή αιθανόλης από το μύκητα <i>F. oxysporum</i>	111
5.5 Συμπεράσματα	116
6. Αξιολόγηση του προκατεργασμένου άχυρου σίτου για την παραγωγή βιοαιθανόλης	117
6.1 Βελτιστοποίηση της ρευστοποίησης	117
6.2 Επίδραση του ενζυμικού συστήματος του <i>F. oxysporum</i> στη ζύμωση του PWS από τον <i>S. cerevisiae</i>	123
6.3 Μελέτη της ταυτόχρονης σακχαροποίησης και ζύμωσης του ρευστοποιημένου άχυρου με συν-καλλιέργεια <i>F. oxysporum</i> και <i>S. cerevisiae</i>	126
6.4 Συνδυασμένη επίδραση του συστήματος του <i>F. oxysporum</i> σε μικτή καλλιέργεια με τον <i>S. cerevisiae</i>	128
6.5 Ταυτόχρονη σακχαροποίηση και ζύμωση του ρευστοποιημένου άχυρου με μικτή καλλιέργεια <i>F. oxysporum</i> και <i>S. cerevisiae</i>	133
6.6 Συμπεράσματα	139
7. Αξιολόγηση επίδρασης του συστήματος του <i>F. oxysporum</i> στην παραγωγή αιθανόλης από πλούσιο σε ημικυτταρίνη προκατεργασμένο άχυρο σίτου	142
7.1 Ρευστοποίηση και ζύμωση πλούσιου σε ημικυτταρίνη προκατεργασμένου άχυρου σίτου	143
7.2 Αξιολόγηση ενός πειραματικού μίγματος θερμοενζύμων για την ρευστοποίηση του πλούσιου σε ημικυτταρίνη προκατεργασμένου άχυρου σίτου	150
7.3 Συμπεράσματα	156

Συμπεράσματα και μελλοντικές προοπτικές 157

Βιβλιογραφία 164

Περίληψη

Σκοπός της παρούσας διατριβής ήταν η ανάπτυξη μιας ολοκληρωμένης διεργασίας για την παραγωγή βιοαιθανόλης από λιγνινοκυτταρινούχο βιομάζα. Το υλικό που χρησιμοποιήθηκε ως πρώτη ύλη ήταν το υδροθερμικά κατεργασμένο άχυρο σίτου. Το άχυρο σίτου μετά από υδροθερμική κατεργασία δίνει ένα πλούσιο σε κυτταρίνη στερεό κλάσμα (50%) το οποίο είναι ιδανικό για χρήση σε διεργασίες ταυτόχρονης σακχαροποίησης και ζύμωσης.

Για την βιομετατροπή του κατεργασμένου αχύρου σε αιθανόλη χρησιμοποιήθηκαν: εμπορικά ενζυμικά σκευάσματα (Celluclast 1,5L – Novozyme 188) και το ενζυμικό σύστημα του μύκητα *Fusarium oxysporum* F3 για την υδρόλυση των πολυμερών σε μεταβολίσιμα σάκχαρα, η ζύμη *Saccharomyces cerevisiae* και ο μύκητας *F. oxysporum* για την μετατροπή των σακχάρων σε αιθανόλη.

Η ζύμη *S. cerevisiae* είναι ένας διαδεδομένος μικροοργανισμός για τον οποίο έχει διεξαχθεί σημαντικός αριθμός μελετών. Σε αντίθεση η ανθεκτικότητα του μύκητα *F. oxysporum* στις αντιξοότητες της διεργασίας παραγωγής βιοαιθανόλης δεν έχει μελετηθεί επαρκώς. Έτσι κρίθηκε σκόπιμο να μελετηθεί αρχικά το ενζυμικό και το μεταβολικό σύστημα του μύκητα ως προς την αντοχή και ανθεκτικότητά τους α) στις παρεμποδιστικές ενώσεις που σχηματίζονται κατά την υδροθερμική κατεργασία και β) στο κύριο προϊόν της ζύμωσης, την αιθανόλη. Επίδραση των παρεμποδιστών εμφανίστηκε κατά την αερόβια ανάπτυξη του μύκητα τόσο στην τελική απόδοση σε βιομάζα όσο και στο ρυθμό ανάπτυξης του μύκητα. Επίσης, στις περισσότερες περιπτώσεις παρατηρήθηκε αύξηση της λανθάνουσας φάσης ανάπτυξης. Η ικανότητα του μύκητα να μεταβολίζει τα σάκχαρα σε αιθανόλη επηρεάζεται σημαντικότερα από τα καρβοξυλικά οξέα. Αντίθετα,

το ενζυμικό σύστημα του μύκητα επηρεάζεται λιγότερο από τις παρεμποδιστικές ενώσεις.

Η μελέτη της επίδρασης της αιθανόλης στην ανάπτυξη και την ικανότητα του μύκητα να μεταβολίζει τα σάκχαρα σε αιθανόλη έγινε με αρχικές συγκεντρώσεις αιθανόλης μεταξύ 0% και 6% β/ο. Από τα πειραματικά δεδομένα εξάγεται το συμπέρασμα ότι η αιθανόλη παρεμποδίζει την ανάπτυξη του μύκητα *F. oxysporum* σε αερόβιες συνθήκες. Η παρουσία αιθανόλης στο μέσο καλλιέργειας φαίνεται να έχει σημαντική αρνητική επίδραση και στο ρυθμό ανάπτυξης. Η παρουσία 4% (β/ο) αιθανόλης στο μέσο ανάπτυξης αναστέλλει το ποσοστό παραγωγής βιομάζας σε βαθμό μεγαλύτερο του 70%. Επίσης, η παρεμπόδιση που προκαλεί η αιθανόλη στη μεταβολική δράση του μύκητα σε αναερόβιες συνθήκες είναι ακόμα πιο έντονη. Για υπόστρωμα γλυκόζη συγκέντρωσης 2% β/ο, και αρχική συγκέντρωση αιθανόλης 4% β/ο προκύπτει μείωση της καθαρής παραγωγής αιθανόλης κατά 84%. ενώ για μεγαλύτερες αρχικές συγκεντρώσεις αιθανόλης, ο αναερόβιος μεταβολισμός των κυττάρων του μύκητα πρακτικά σταματά. Τέλος, δείχτηκε ότι εάν η αιθανόλη αφαιρεθεί από σύστημα, ο *F. oxysporum* ανακτά τη μεταβολική του ενεργότητα.

Εν συνεχεία, μελετήθηκε η δυνατότητα να αξιοποιηθεί το πλούσιο σε ημικυτταρίνη Υγρό Κλάσμα (ΥΚ) της προκατεργασίας. Από τα αποτελέσματα φάνηκε ότι το ΥΚ είναι έντονα τοξικό για το μύκητα και δεν είναι αποδοτική η παραγωγή αιθανόλης με τη χρήση του ως πηγή άνθρακα. Επιπλέον, η παραγωγή αιθανόλης ήταν χαμηλή και οικονομικά ασύμφορη ακόμα και όταν πραγματοποιήθηκε μερική αποτοξικοποίηση του.

Για την ικανοποιητική βιομετατροπή της πρώτης ύλης σε αιθανόλη επιχειρήθηκε η εισαγωγή ενός σταδίου μείωσης του ιξώδους με σκοπό τη ρευστοποίηση του υλικού πριν τη ζύμωση. Το στάδιο αυτό επετεύχθη με την κατασκευή ενός ειδικού ενζυμικού αντιδραστήρα ρευστοποίησης με τον

οποίο επιτυγχάνεται σημαντική μείωση στο ιξώδες του μίγματος και απελευθέρωση σακχάρων, με τη χρήση του εμπορικού ενζυμικού συστήματος Celluclast 1,5L – Novozyme 188

. Μετά τη ρευστοποίηση του υλικού, έγινε μελέτη της δυνατότητας του ενζυμικού και μικροβιακού συστήματος του μύκητα *F. oxysporum* να συνδράμει στην ταυτόχρονη σακχαροποίηση και ζύμωση του ρευστοποιημένου υλικού. Δείχτηκε ότι η προσθήκη των ενζύμων του *F. oxysporum* κατά την ζύμωση βοηθά σημαντικά στην απόδοση της διεργασίας. Επίσης, με την ταυτόχρονη προσθήκη ενζύμων ($6 \text{ FPU g}^{-1} \text{ ΞΜ}$) και κυτταρικής μάζας του μύκητα ($70 \text{ mg κυττάρων g}^{-1} \text{ ΞΜ}$), επετεύχθη τελική συγκέντρωση αιθανόλης 62 g/L , διπλάσια από την καλλιέργεια με πλήρη απουσία ενζύμων ή κυττάρων του μύκητα. Έτσι για να γίνει δυνατή η αξιοποίηση της ενζυμικής και μεταβολικής δράσης του *F. oxysporum*, σχεδιάστηκε μία ενοποιημένη διεργασία για την ταυτόχρονη εισαγωγή στη ζύμωση καλλιέργειας του μύκητα (περιέχει ενζυμικές ενεργότητες και κυτταρική βιομάζα) και ξηρής ζύμης αρτοποιίας. Με αυτή την διαδικασία δεν γίνεται ξεχωριστή παραγωγή ενζύμων και κυτταρικής μάζας, αλλά προστίθενται στη ζύμωση μέσω μιας στερεής καλλιέργειας του μύκητα. Σε αυτή την περίπτωση η μέγιστη παραγωγή αιθανόλης ήταν 58 g/L , αυξάνοντας την απόδοση σε αιθανόλη κατά 19% σε σχέση με την απουσία του συστήματος του μύκητα. Το αποτέλεσμα αυτό είναι αντίστοιχο του προηγούμενου, καταφέροντας όμως την απαλοιφή από τη διεργασία των ξεχωριστών σταδίων παραγωγής ενζύμων και βιομάζας. Η ενοποιημένη διεργασία που προτείνεται στην παρούσα διατριβή, αυξάνει σημαντικά την απόδοση σε αιθανόλη μειώνοντας ταυτόχρονα το γενικό κόστος της διεργασίας.

Τέλος, με βάση όλα τα ανωτέρω αποτελέσματα μελετήθηκε ένα πλούσιο σε ημικυτταρίνη προκατεργασμένο άχυρο σίτου στο οποίο δεν έγινε

διαχωρισμός της υγρής και της στερεής φάσης της προκατεργασίας., καθώς και η χρήση ενός πιλοτικού μίγματος θερμοενζύμων. Με αυτό το υλικό η μέγιστη παραγωγή αιθανόλης περιορίστηκε στα 35 g L^{-1} . Κάτι που οδηγεί στο συμπέρασμα ότι είναι απαραίτητος το διαχωρισμός του υγρό και του στερεού κλάσματος σε μια διεργασία υδροθερμικής προκατεργασίας.

Abstract

The aim of the present thesis is to develop a consolidated bioprocess for the production of bioethanol from lignocellulosic biomass. The raw material used was the hydrothermally treated wheat straw (PWS). When hydrothermally treated, wheat straw results in a solid fraction rich in cellulose (50%), which is ideal for Simultaneous Saccharification and Fermentation (SSF) processes.

For the bioconversion of the PWS to ethanol the following have been used: commercial enzymes (Celluclast 1,5L – Novozyme 188) and the enzymatic system of the fungus *Fusarium oxysporum* F3 for the hydrolysis of lignocelluloses into platform sugars, the yeast *Saccharomyces cerevisiae* and the fungus *F. oxysporum* for the conversion of the sugars to ethanol.

The yeast *S. cerevisiae* is a widely studied microorganism, in contrast to the fungus *F. oxysporum* whose tolerance to inhibitory compounds and to ethanol has not been adequately studied so far. Thus, it has been considered wise to study the tolerance of the enzymatic and metabolic system of *F. oxysporum* towards the inhibitory compounds formed in the pretreatment stage and the product of the fermentation, the ethanol. The effect of the inhibitors to the aerobic growth of the fungus is deflected to the biomass production and the growth rate. Moreover, in most cases an increase in the lag phase has been noticed. As far as the ability of *F. oxysporum* to ferment the sugars to ethanol is concerned, the carboxylic acids proven to have the most inhibitory effect. On the other hand, the enzymatic system of *F. oxysporum* is less affected by the inhibitory compounds.

The study, of the ethanol effect on the growth and the fermenting ability of *F. oxysporum*, was conducted in initial ethanol concentrations up to 6% w/v. It is concluded from the experimental data that the ethanol inhibits the

growth of *F. oxysporum* under aerobic conditions. The presence of ethanol seems to have a negative effect on the growth rate too; an initial concentration of 4% w/v ethanol in the culture medium reduces the biomass production yield more than 70%. The inhibition by the presence of ethanol in anaerobic conditions is even more intense. In fact, when initial ethanol concentration of 4% w/v was added in the broth, with 2% w/v glucose as carbon source, it resulted in an 84% decrease in the net ethanol production, while in higher initial ethanol concentrations, the metabolic activity seems to cease. Finally, it was proven that if the produced ethanol is removed from the culture medium, *F. oxysporum* regains its metabolic activity.

Following, the ability to exploit the rich in hemicellulose Liquid Fraction (LF) of the wheat straw pretreatment was studied. From the experimental data of the present thesis, it was shown that the LF is highly toxic for the fungus, and its exploitation for ethanol production is not efficient. Even when detoxification of the LF was attempted, efficient ethanol production was not possible.

The introduction of a liquefaction stage before the fermentation of the PWS was studied for the adequate bioconversion of the material. This was achieved with the manufacturing of an enzymatic liquefaction reactor, the use of which results in the effective reduction of the viscosity of the material and the release of monomer sugars. When the liquefied material was used as the carbon source for the ethanol production, it was proven that the addition of *F. oxysporum* enzymatic complex results in higher ethanol production yields. Furthermore, the simultaneous addition of enzymes and cell mass of the fungus resulted in final ethanol concentration of 62 g/L. Thus, in order to exploit both the enzymatic and the metabolic activities of *F. oxysporum* along with the fermenting ability of *S. cerevisiae*, a consolidated process was developed where *F. oxysporum* solid or submerged cultures were added in

the fermentation of the liquefied material along with dry baker's yeast. This resulted in 58 g/L net ethanol production, 19% increased compared to the control experiment. The consolidated process proposed by the present thesis not only increased the ethanol yields significantly, but could also lead to lower overall cost of the process by incorporating *in-situ* enzyme production.

Finally, based on the above mentioned results, it has been attempted to exploit a rich in hemicelluloses pretreated wheat straw, and to use a pilot thermoenzyme mixture. Nevertheless, an efficient ethanol yield was not achieved.

Θεωρητική Ανασκόπηση

1. Εισαγωγή

Από την εποχή της βιομηχανικής επανάστασης έως τις μέρες μας, η χρήση ορυκτών καυσίμων για τις ανάγκες της βιομηχανίας αλλά και των μεταφορών έχει εξαπλωθεί σε υπερθετικό βαθμό. Όμως, μαζί με την εξάπλωση της χρήσης των ορυκτών καυσίμων αναπτύχθηκαν και οι συνέπειές τους. Το φαινόμενο του θερμοκηπίου καθώς και η ρύπανση της ατμόσφαιρας στα αστικά κέντρα γίνονται πλέον αισθητά στην καθημερινότητα των ανθρώπων. Δεδομένης της ανησυχίας για την παγκόσμια θέρμανση και την αστάθεια στις τιμές των συμβατικών καυσίμων (κυρίως του πετρελαίου και του φυσικού αερίου), καθώς και της μείωσης των αποθέματα πετρελαίου, η αναζήτηση ανανεώσιμων πηγών ενέργειας με μειωμένες εκπομπές CO₂ έχει κεντρίσει το ενδιαφέρον των ερευνητών τα τελευταία χρόνια. Οι 195 χώρες που συμμετείχαν στη Διεθνή Διάσκεψη του Οργανισμού Ηνωμένων Εθνών στο Παρίσι για την κλιματική αλλαγή, ενέκριναν τη συμφωνία για την αντιμετώπιση του φαινομένου της υπερθέρμανσης του πλανήτη. Η συμφωνία στοχεύει στον περιορισμό της αύξησης της παγκόσμιας θερμοκρασίας και στην αποσύνδεση των εθνικών οικονομιών από τα ορυκτά καύσιμα. Προβλέπει μεταξύ άλλων όριο στην αύξηση της θερμοκρασίας του πλανήτη, κάτω από 2 βαθμούς Κελσίου, έως το 2050. Είναι η πρώτη συμφωνία που δεσμεύει (εν μέρει) όλες τις χώρες στη μείωση των εκπομπών διοξειδίου του άνθρακα.

Μαζί με την τεχνολογική ανάπτυξη του τελευταίου αιώνα έχει σημειωθεί και ραγδαία ανάπτυξη στον τομέα της βιολογίας. Η λειτουργία των βιολογικών συστημάτων έχει γίνει πλέον κατανοητή σε μεγάλο βαθμό. Η επιστήμη έχει φτάσει στο σημείο να μπορεί να κατανοήσει και να

αξιοποιήσει τα βιολογικά συστήματα όχι μόνο σε βιοχημικό επίπεδο αλλά και στην αποκρυπτογράφηση της μοριακής βάσης και δομής των κυττάρων. Τεχνικές που χρησιμοποιούνταν από τα πρώιμα στάδια του ανθρώπινου πολιτισμού, όπως οι ζυμώσεις, αποτελούν πλέον βασικό εργαλείο στον τομέα της παραγωγής ενέργειας.

Έτσι, η ανάπτυξη βιολογικών εφαρμογών για την παραγωγή καυσίμων φιλικών προς το περιβάλλον έχει γνωρίσει μεγάλη άνθιση τις τελευταίες δεκαετίες. Η αξιοποίηση της βιομάζας για την παραγωγή βιοαιθανόλης αποτελεί πραγματικότητα στις μέρες μας, ενώ χώρες όπως η Βραζιλία έχουν εφαρμόσει την παραγωγή βιοκαυσίμων σε βιομηχανική κλίμακα εδώ και δεκαετίες. Ωστόσο, η συζήτηση σχετικά με την υιοθέτηση της βιοαιθανόλης συνεχίζεται σε σημαντικό βαθμό, όχι πλέον όσον αφορά στη νεωτερικότητα του θέματος αλλά κυρίως στις οικονομικές και περιβαλλοντικές επιπτώσεις. Η εισαγωγή της βιοαιθανόλης έχει ανοίξει διαμάχες όσον αφορά τον ανταγωνισμό της βιομηχανίας παραγωγής βιοκαυσίμων με τον κλάδο των τροφίμων.

Η παραγωγή βιοαιθανόλης μέσω της εκμετάλλευσης καλλιεργειών μεγάλης οικονομικής και διατροφικής αξίας, όπως το ζαχαροκάλαμο και το καλαμπόκι (βιοαιθανόλη πρώτης γενεάς), δημιουργεί αμφιβολίες στην επιστημονική κοινότητα ως προς τη βιωσιμότητα της παραγωγής βιοκαυσίμων. Το «δίλημμα», τρόφιμα ή καύσιμα, απασχόλησε την επιστημονική κοινότητα και τα περιβαλλοντικά φόρα παγκοσμίως. Η ανάπτυξη της έρευνας για παραγωγή βιοκαυσίμων δεύτερης γενεάς (βιοκαύσιμα από την αξιοποίηση υπολειμμάτων και παραπροϊόντων διαφόρων, γεωργικών κυρίως, διεργασιών) προβάλλει ως λύση σε αυτό το «δίλημμα». Στο ερευνητικό αυτό πλαίσιο εντάσσεται και η παρούσα διατριβή.

1.1 Βιομάζα και Βιοκαύσιμα

Η βιομάζα αποτελεί μια ανανεώσιμη μορφή ενέργειας, γνωστή στον άνθρωπο εδώ και πάρα πολλά χρόνια. Με τον όρο βιομάζα ονομάζουμε οποιοδήποτε υλικό προέρχεται από ζωντανούς οργανισμούς, ενώ ειδικότερα η βιομάζα για ενεργειακούς σκοπούς περιλαμβάνει κάθε τύπο οργανικής ύλης που μπορεί να χρησιμοποιηθεί για την παραγωγή στερεών, υγρών και/ή αέριων βιοκαυσίμων. Η αξιοποίηση της βιομάζας για παραγωγή ενέργειας παρουσιάζει σημαντικά πλεονεκτήματα καθώς είναι υλικό ανανεώσιμο. Συνεπώς, δε συνεισφέρει στο φαινόμενο του θερμοκηπίου. Επιπλέον, οι διεργασίες παραγωγής ενέργειας από βιομάζα δεν έχουν αρνητικές επιδράσεις στο περιβάλλον και έχουν αρκετά κοινωνικο-οικονομικά οφέλη. Στις αναπτυγμένες χώρες υπάρχει μια αυξημένη τάση προς την υιοθέτηση των σύγχρονων τεχνολογιών και αποδοτικών μετατροπών βιοενέργειας, χρησιμοποιώντας μια σειρά βιοκαυσίμων ανταγωνιστικών ως προς το κόστος με τα ορυκτά καύσιμα (Puhan et al., 2005).

Τα βιοκαύσιμα αναφέρονται ως στερεά (πέλετς), υγρά (βιοαιθανόλη) ή αέρια (βιοαέριο) καύσιμα που έχουν παραχθεί από βιομάζα. Μια ποικιλία καυσίμων μπορεί να παραχθεί από τις πηγές βιομάζας, συμπεριλαμβανομένων των υγρών καυσίμων, όπως η αιθανόλη, η μεθανόλη, το βιοντήζελ και των αερίων καυσίμων, όπως το υδρογόνο και το μεθάνιο. Υπάρχουν διάφοροι λόγοι για τους οποίους τα βιοκαύσιμα θεωρούνται ως σημαντικά από τις αναπτυγμένες αλλά και από τις βιομηχανικές χώρες (Demirbas et al., 2007). Συνοπτικά, τα πλεονεκτήματα των βιοκαυσίμων είναι τα ακόλουθα: (α) είναι εύκολα διαθέσιμα από τις κοινές πηγές βιομάζας, (β) δεν διαταράσσουν τον κύκλο του διοξειδίου του άνθρακα (γ) είναι βιοδιασπώμενα και (δ) είναι φιλικά προς το περιβάλλον (Purpan et al., 2002).

1.2 Βιοαιθανόλη

Η βιοαιθανόλη είναι ένα άχρωμο και διαυγές υγρό βιοκαύσιμο που μπορεί να παραχθεί από διάφορα είδη βιομάζας. Αποτελεί ένα ελκυστικό εναλλακτικό καύσιμο, θεωρείται ανανεώσιμη πηγή ενέργειας και η χρήση της μειώνει την κατανάλωση ακατέργαστου πετρελαίου και κατ' επέκταση τις εκπομπές CO₂.

Η χρήση της βιοαιθανόλης ως καύσιμο έχει μια τόσο μακρά ιστορία όσο και το ίδιο το αυτοκίνητο. Άρχισε με τη χρήση της αιθανόλης στην μηχανή εσωτερικής κάυσης, ενώ η αιθανόλη καθιερώθηκε ως εναλλακτικό καύσιμο με την πετρελαϊκή κρίση του 1973. Τα μίγματα αιθανόλης - καυσίμων χρησιμοποιούνται επιτυχώς σε όλους τους τύπους οχημάτων και μηχανών που λειτουργούν με βενζίνη (Balat et al., 2005). Η βιοαιθανόλη έχει υψηλό αριθμό οκτανίου, ευρύτερα όρια ευφλεκτότητας, υψηλότερη ταχύτητα φλόγας και υψηλότερες θερμοότητες εξάτμισης απ' ότι η βενζίνη (Πίνακας 1.1). Αυτές οι ιδιότητες επιτρέπουν υψηλότερη αναλογία συμπίεσης και έναν πιο σύντομο χρόνο ανάφλεξης και οδηγούν στα θεωρητικά πλεονεκτήματα αποδοτικότητας σε μια μηχανή εσωτερικής κάυσης (Balat et al., 2007). Επιπλέον, η αιθανόλη έχει υψηλή περιεκτικότητα σε οξυγόνο κάτι που σημαίνει μικρότερη ποσότητα απαραίτητου πρόσθετου οξυγόνου. Το αυξημένο ποσοστό του οξυγόνου επιτρέπει καλύτερη οξείδωση των υδρογονανθράκων της βενζίνης, με επακόλουθη μείωση των εκπομπών του μονοξειδίου του άνθρακα και των αρωματικών ενώσεων (Thomas and Kwong, 2001).

Τα μειονεκτήματα της βιοαιθανόλης αναφέρονται στη χαμηλότερη ενεργειακή πυκνότητα από αυτή της βενζίνης (η βιοαιθανόλη έχει 66% της ενέργειας από αυτή που έχει η βενζίνη), στη δυνατότητα οξείδωσης, στη χαμηλή φωτεινότητα φλόγας, στη χαμηλότερη τάση ατμών (που καθιστά

δυσκολότερη την ψυχρή εκκίνηση των μηχανών), στη δυνατότητα ανάμιξης με το νερό και στην τοξικότητα στα οικοσυστήματα, και τέλος τα αζεότροπα μίγματα αιθανόλης-βενζίνης τα οποία αυξάνουν την πυκνότητα του καυσίμου (MacLean and Lave, 2003). Οι σημαντικότερες ιδιότητες της αιθανόλης παρουσιάζονται στον Πίνακα 1.1.

Η παραγωγή αιθανόλης έχει αυξηθεί μέσω της εφαρμογής ερευνητικών και βιομηχανικών προγραμμάτων σε πολλές χώρες τα τελευταία χρόνια. Όλο και σημαντικότερο ποσοστό της αγροτικής παραγωγής στρέφεται στα βιοκαύσιμα, στο πλαίσιο μιας προσπάθειας μείωσης των εισαγωγών πετρελαίου και της ατμοσφαιρικής ρύπανσης.

Πίνακας 1.1: Ιδιότητες της βιοαιθανόλης (Balat, 2007).

Ιδιότητα	Αιθανόλη
Αριθμός κετανίου	8
Αριθμός οκτανίου	107
Θερμοκρασία αυτανάφλεξης (K)	606
Λανθάνουσα θερμότητα εξάτμισης (MJ/Kg)	0.91

1.3 Λιγνινοκυτταρινούχα υλικά

Μη λαμβάνοντας υπόψη τα γεωργικά προϊόντα που χρησιμοποιούνται από τη βιομηχανία τροφίμων, τα υλικά που μπορούν να αποτελέσουν πρώτη ύλη για την παραγωγή βιοαιθανόλης είναι τα γεωργικά υπολείμματα φυτών όπως το καλαμπόκι και το σιτάρι, ενεργειακά φυτά όπως το γλυκό σόργο, δασικά υπολείμματα και τέλος αστικά οργανικά απόβλητα και απόβλητα της βιομηχανίας τροφίμων. Το κοινό χαρακτηριστικό αυτών των υλικών είναι η

παρουσία στη σύστασή τους πολυμερών όπως η κυτταρίνη, η ημικυτταρίνη και η λιγνίνη. Σε αυτή τη σύσταση οφείλεται και η κατηγοριοποίησή τους ως λιγνινοκυτταρινούχα υλικά.

Η επιλογή των υλικών αυτών βασίστηκε στο γεγονός ότι ως υπολειμματικές μορφές και παραπροϊόντα αγροτικών και βιομηχανικών διεργασιών δεν παρουσιάζουν παρά ελάχιστη βιομηχανική αξία. Αντιθέτως, η βιομετατροπή των περιεχόμενων πολυσακχαριτών τους σε βιοαιθανόλη, μέσω της χρήσης ενζυμικών και κυτταρικών συστημάτων μικροοργανισμών, όπως οι μύκητες και τα βακτήρια, μπορεί να αποτελέσει τη βασική βιοχημική διεργασία για την αξιοποίηση των υλικών αυτών.

Η σύσταση των υλικών αυτών δεν είναι σταθερή ούτε συγκρίσιμη από φυτό σε φυτό (Πίνακας 1.2). Αυτό οφείλεται στο ότι η σύσταση των κυτταρικών τοιχωμάτων των φυτών είναι πολύπλοκη και διαφέρει πολύ από φυτό σε φυτό. Μια χαρακτηριστική ένδειξη αυτής της πολυπλοκότητας παρουσιάζεται στο γονιδίωμα του φυτού *Arahidopsis* που περιέχει περισσότερα από 730 γονίδια που κωδικοποιούν ένζυμα, τα οποία πιστεύεται ότι παίζουν ρόλο στη βιοσύνθεση και τη λειτουργικότητα του κυτταρικού τοιχώματος (Somerville et al., 2004).

Τα κύρια συστατικά της δομής των πρωτογενών και δευτερογενών τοιχωμάτων των φυτικών κυττάρων είναι η κυτταρίνη, η ημικυτταρίνη, η πηκτίνη και η λιγνίνη. Η κυτταρίνη είναι ένα γραμμικό πολυμερές μορίων γλυκόζης ενωμένων με β -1,4 γλυκοζιτικούς δεσμούς. Η επαναλαμβανόμενη δομική μονάδα της κυτταρίνης είναι η κελλοβιόζη, ο δισακχαρίτης που σχηματίζεται από την ένωση δυο μονομερών γλυκόζης με β -1,4 γλυκοζιτικό δεσμό. Τα μικροϊνίδια κυτταρίνης συγκροτούνται από τις κρυσταλλικές δομές που σχηματίζονται από τη δημιουργία δεσμών υδρογόνου μεταξύ των γειτονικών μορίων της κυτταρίνης και από την επίδραση των δυνάμεων van der Waals μεταξύ τους (Zhang and Lynd 2004). Αυτές οι δυνάμεις έχουν

σαν αποτέλεσμα την παράλληλη ευθυγράμμιση της κυτταρίνης (Zhang and Lynd 2004).

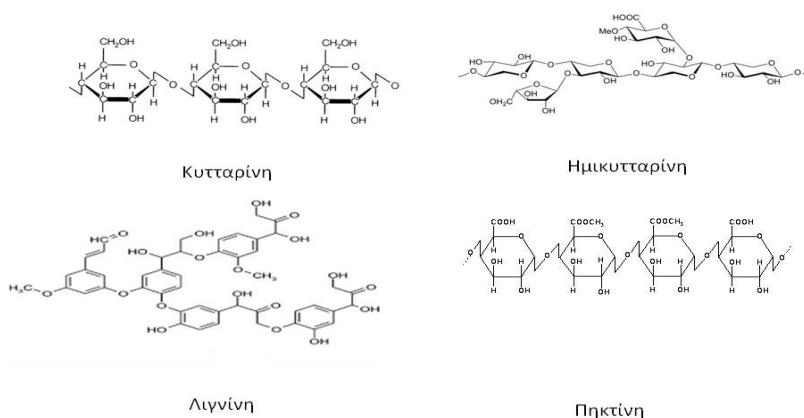
Πίνακας 1.2: Σύσταση διαφόρων λιγνινοκυτταρινούχων υλικών (Demirbas et al., 1991 ; Demirbas et al., 1998).

Υλικό	Κυτταρίνη	Ημικυτταρίνη	Λιγνίνη	Τέφρα	Εκχυλίσματα
Φύκη (πράσινα)	20-40	20-50	-	-	-
Χλόη	25-40	25-50	10-30	-	-
Σκληρό Ξύλο (φυλλοβόλα)	45±2	30±5	20±4	0.6±0.2	5±3
Φλοιός σκληρού ξύλου	22-40	20-38	30-55	0.8±0.2	6±2
Μαλακό Ξύλο (κωνοφόρα)	42±2	27±2	28±3	0.5±0.1	3±2
Φλοιός μαλακού ξύλου	18-38	15-33	30-60	0.8±0.2	4±2
Μίσχος σιταριού	39-47	26-31	3-5	12-16	1-3
Κατεργασμένο άχυρο	37-41	27-32	13-15	11-14	7±2

Η ημικυτταρίνη είναι ένας ετεροπολυσακχαρίτης που περιέχει σάκχαρα όπως εξόζες (γαλακτόζη, μαννόζη, ραμνόζη), πεντόζες (ξυλόζη, αραβινόζη), ουρονικά οξέα (γλυκουρονικό οξύ) καθώς επίσης και σημαντικές ποσότητες οξικού οξέος (Zaldivar et al., 2001).

Η πηκτίνη είναι ένα γραμμικό πολυμερές με επαναλαμβανόμενες μονάδες D-γαλακτουρονικού οξέος ενωμένες με α -(1-4) δεσμούς. Η πηκτίνη σταθεροποιεί το πλέγμα που δημιουργείται από την κυτταρίνη και την ημικυτταρίνη στα πρωτογενή κυτταρικά τοιχώματα. Τον ίδιο ρόλο παίζει η

λιγνίνη στα δευτερογενή κυτταρικά τοιχώματα. Η λιγνίνη είναι ένα αρωματικό πολυμερές που αποτελείται από φαινολικές αλκοόλες. Η δομή των κύριων πολυμερών που συνθέτουν τα κυτταρικά τοιχώματα φαίνεται στο Σχήμα 1.1.



Σχήμα 1.1: Χημική δομή των κυριότερων πολυμερών που συνθέτουν το κυτταρικό τοίχωμα των φυτών.

1.3.1 Το άχυρο σίτου

Το σιτάρι (*Triticum aestivum* L.) είναι η πιο ευρέως διαδεδομένη καλλιέργεια, που παράγεται σε πάνω από 115 έθνη κάτω από ένα ευρύ φάσμα κλιματικών και περιβαλλοντικών συνθηκών. Η παγκόσμια μέση απόδοση του σίτου είναι περίπου $2.4 \cdot 10^3 \text{ kg ha}^{-1}$. Ως εκ τούτου, περίπου $430 \cdot 10^9 \text{ kg}$ από άχυρο σίτου ετησίως είναι διαθέσιμα για παραγωγή περίπου $120 \cdot 10^9 \text{ L}$ βιοαιθανόλης. Αυτός ο όγκος της αιθανόλης μπορεί να αντικαταστήσει περίπου $90 \cdot 10^9 \text{ L}$ βενζίνης, λαμβάνοντας υπόψη τις διαφορές τους σε ογκομετρικό ενεργειακό περιεχόμενο και σε αριθμό

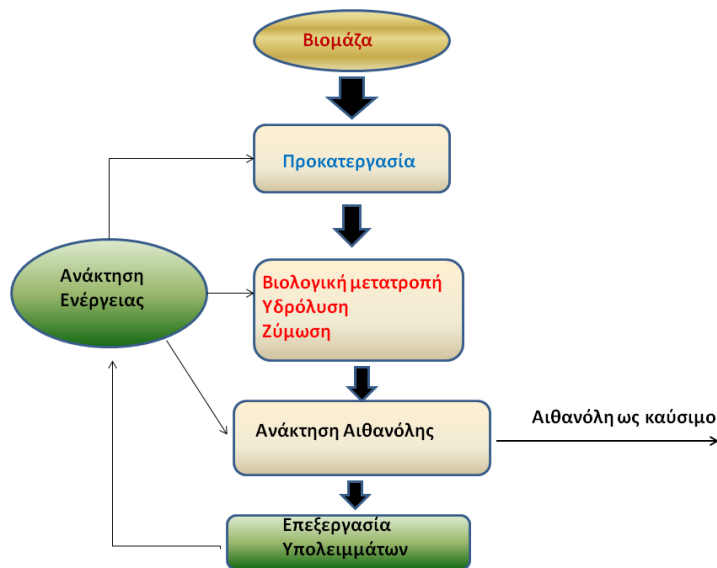
οκτανίου (Otero et al., 2007). Πολλές έρευνες έχουν δείξει ότι με σωστή ρύθμιση των παραμέτρων του κινητήρα, τα μίγματα αιθανόλης - βενζίνης θα οδηγήσουν σε βελτιωμένη απόδοση του κινητήρα και σε μείωση των εκπομπών διοξειδίου του άνθρακα (Wu et al., 2004 ; Bayraktar, 2005). Έτσι, η παραγωγή αιθανόλης από άχυρου σίτου φαίνεται να είναι μια πολλά υποσχόμενη προσέγγιση για την απόκτηση ενέργειας από υπολειμματική βιομάζα και εν μέρει μειώνει την εξάρτηση από ορυκτά καύσιμα, ενώ παράλληλα συμβάλλει στη μείωση του φαινομένου του θερμοκηπίου και τη βελτίωση της ποιότητας του ατμοσφαιρικού αέρα.

Το άχυρο σίτου, όπως και οποιοδήποτε άλλο υλικό λιγνοκυτταρινούχας σύνθεσης, είναι ένα πολύπλοκο μίγμα κυτταρίνης, ημικυτταρίνης και λιγνίνης, μιας μικρής ποσότητας από διαλυτά υποστρώματα (γνωστά ως εκχυλίσματα) και τέφρας. Η συνολική χημική σύνθεση του σιταριού διαφέρει ελαφρώς ανάλογα με το είδος του σιταριού, το έδαφος και τις κλιματικές συνθήκες της περιοχής όπου καλλιεργείται. Το περιεχόμενο της κυτταρίνης, της ημικυτταρίνης και της λιγνίνης στο άχυρο σίτου είναι της τάξης του 33-40, 20-25 και 15-20 (% β/β) αντίστοιχα (Prasad et al., 2007). Τα στελέχη της κυτταρίνης ομαδοποιούνται και συνδέονται «σφιχτά» με τέτοιο τρόπο ώστε ούτε νερό αλλά ούτε και ένζυμο να διεισδύσει μέσα στη δομή (Wu et al., 2004 ; Laureano-Perez et al., 2005). Η ημικυτταρίνη εξυπηρετεί στη σύνδεση μεταξύ λιγνίνης και ινών κυτταρίνης και εύκολα υδρολύεται από αραιό οξύ ή βάση και ένζυμα. Η λιγνίνη συνδέεται ομοιοπολικά με την κυτταρίνη και την ξυλάνη (κυρίαρχο πολυμερές υδατανθράκων στο άχυρο σίτου), έτσι ώστε οι αλληλεπιδράσεις μεταξύ λιγνίνης - κυτταρίνης - ξυλάνης να ασκούν μεγάλη επιρροή στην πεπτικότητα των λιγνοκυτταρινούχων υλικών (Laureano-Perez et al., 2005). Λόγω αυτής της πολυπλοκότητας της δομής του, η παραγωγή αιθανόλης από άχυρο σίτου απαιτεί τουλάχιστον τέσσερις φάσεις επεξεργασίας: (1) την

προκατεργασία, (2) την υδρόλυση, (3) τη ζύμωση και (4) την απόσταξη. Σε αντίθεση με την σακχαρόζη ή το άμυλο, η λιγνοκυτταρινούχα βιομάζα όπως το άχυρο σίτου πρέπει να είναι προκατεργασμένη ώστε να «γίνει προσβάσιμη» η κυτταρίνη για τον αποτελεσματικό ενζυμικό αποπολυμερισμό.

1.4 Βιομετατροπή λιγνινοκυτταρινούχων υλικών σε αιθανόλη

Λόγω της πολυπλοκότητας των βιοχημικών δράσεων που λαμβάνουν χώρα αλλά και της σύνθετης δομής της λιγνινοκυτταρινούχου βιομάζας, η βιομετατροπή της προς αιθανόλη απαιτεί συνήθως διεργασίες πολλών σταδίων (Σχήμα 1.2). Τα στάδια αυτά περιλαμβάνουν: (i) την προκατεργασία (φυσική ή χημική) για το σπάσιμο της κρυσταλλικής δομής και την απελευθέρωση της κυτταρίνης και της ημικυτταρίνης από τη λιγνίνη, (ii) την ενζυμική υδρόλυση των πολυσακχαριτών για την απελευθέρωση άμεσα μεταβολίσιμων μονοσακχαριτών (γλυκόζη, ξυλόζη), (iii) το μεταβολισμό αυτών των σακχάρων και τη βιομετατροπή τους σε αιθανόλη (ζύμωση) και τέλος (iv) τον διαχωρισμό και την απόσταξη της παραχθείσας αιθανόλης (Hamelinck et al., 2005 ; Chandel et al., 2007 ; Cardona and Sánchez, 2007 ; Balat et al., 2008 ; Margeot et al., 2009).



Σχήμα 1.2: Απλοποιημένο διάγραμμα ροής για την παραγωγή βιοαιθανόλης από λιγνινοκυτταρινούχο βιομάζα.

Το πρώτο βήμα για τη βιομετατροπή των λιγνινοκυτταρινούχων υλικών σε βιοαιθανόλη είναι η προκατεργασία τους. Η προεπεξεργασία είναι μια σημαντική διαδικασία για τη βιοχημική μετατροπή λιγνινοκυτταρινούχας βιομάζας σε αιθανόλη. Απαιτείται για να αλλάξει τη δομή της κυτταρινούχας βιομάζας, δηλαδή να κάνει την κυτταρίνη πιο προσιτή στα ένζυμα που μετατρέπουν τα πολυμερή των υδατανθράκων σε σάκχαρα, τα οποία στη συνέχεια υποβάλλονται σε ζύμωση. Η προκατεργασία αποτελεί μια από τις πιο ακριβές διεργασίες στην μετατροπή της κυτταρινούχας βιομάζας σε σάκχαρα (Tomas-Rejo et al., 2009). Το αποτέλεσμα της προκατεργασίας επηρεάζει όλα τα στάδια που ακολουθούν, όπως την ενζυμική υδρόλυση, τη ζύμωση, την ανάκτηση των προϊόντων και τον χειρισμό των αποβλήτων. Ειδικότερα, επιδρά στο βαθμό αφομοίωσης της κυτταρίνης, στην απελευθέρωση τοξικών/παρεμποδιστικών ουσιών για το στάδιο της

ζύμωσης, στις απαιτήσεις σε ανάδευση, στις ενεργειακές ανάγκες για την ανάκτηση και καθαρισμό των προϊόντων και στην επεξεργασία των αποβλήτων (Δόγαρης, 2009 ; Singh et al., 2014).

Έχουν αναπτυχθεί πολυάριθμες μέθοδοι προεπεξεργασίας με σκοπό να αυξήσουν τη δραστικότητα της κυτταρίνης και την απόδοση των σακχάρων που πρόκειται να ζυμωθούν. Οι τυπικοί στόχοι της προκατεργασίας συμπεριλαμβάνουν:

- την παραγωγή υψηλής πεπτικότητας υποστρωμάτων, ώστε να αυξηθεί η απόδοση κατά την ενζυμική υδρόλυση. Αυτό επιτυγχάνεται με αύξηση της επιφάνειας επαφής και του πορώδους.
- Να αποφεύγεται η αποικοδόμηση ή απώλεια των υδατανθράκων.
- Την ελαχιστοποίηση της παραγωγής τοξικών ουσιών που λειτουργούν ως παρεμποδιστές σε μεταγενέστερα στάδια της ζύμωσης.
- Την ανάκτηση της λιγνίνης για μετατροπή της σε χρήσιμα παραπροϊόντα.
- Την μείωση της κρυσταλλικότητας της κυτταρίνης.
- Την χαμηλή κατανάλωση ενέργειας έτσι ώστε να είναι οικονομικά εφικτή και να μπορεί να πραγματοποιείται σε αντιδραστήρες συμβατού μεγέθους.

Η προκατεργασία (Πίνακας 1.3) είναι από τα πιο δαπανηρά στάδια της διεργασίας παραγωγής βιοαιθανόλης από λιγνινοκυτταρινούχα υλικά, αποτελώντας έως και το 33% του συνολικού κόστους παραγωγής. Τις τελευταίες δεκαετίες έχει αναφερθεί ένα ευρύ φάσμα μεθόδων προκατεργασίας οι οποίες διακρίνονται σε τέσσερις κατηγορίες:

- (1) φυσικές (άλεση, κονιορτοποίηση, ακτινοβόληση),
- (2) χημικές (αλκαλική, παρουσία αραιού οξέος, οργανικοί διαλύτες),
- (3) φυσικοχημικές (προκατεργασία με ατμό, υδροθερμόλυση και υγρή οξειδωση) και
- (4) βιολογικές ή και συνδυασμός των παραπάνω (Singh et al., 2014).

Πίνακας 1.3:Κυριότερες μέθοδοι προκατεργασίας λιγνινοκυταρινούχων υλικών.

Προκατεργασία	Κύριες Δράσεις	Βιβλιογραφία
Μηχανική	Αύξηση ειδικής επιφάνειας υποστρώματος, μείωση βαθμού πολυμερισμού	Delgenes et al., 2002
(Υδρο)-θερμική	Διαλυτοποίηση ημικυτταρίνης και λιγνίνης	Zeng et al., 2007
Αλκαλική	Απομάκρυνση λιγνίνης, μείωση κρυσταλλικότητας	Moisier et al., 2005a
Όξινη	Διαλυτοποίηση της ημικυτταρίνης	Hendriks and Zeeman, 2009
Οξειδωτική	Εκλεκτική απομάκρυνση λιγνίνης ή/και ημικυτταρίνης	Hendriks and Zeeman, 2009
Συνδυασμός υδροθερμικής - αλκαλικής - μηχανικής	Διαλυτοποίηση ημικυτταρίνης και λιγνίνης, αύξηση ειδικής επιφάνειας υποστρώματος, μείωση βαθμού πολυμερισμού	Moisier et al., 2005b
Συνδυασμός υδροθερμικής - όξινης	Διαλυτοποίηση ημικυτταρίνης, αλλαγή δομής λιγνίνης, αύξηση ειδικής επιφάνειας υποστρώματος	Moisier et al., 2005a
Αμμωνιακή (AFEX)	Απομάκρυνση λιγνίνης, αύξηση ειδικής επιφάνειας υποστρώματος, μερική διαλυτοποίηση ημικυτταρίνης	Kim and Lee, 2005

Μετά την προκατεργασία των λιγνινοκυταρινούχων υλικών, η βιομετατροπή μπορεί να πραγματοποιηθεί με διαχωρισμό ή συνδυασμό των

σταδίων της ενζυμικής υδρόλυσης και της ζύμωσης (Hahn-Hagerdal et al., 2006 ; Cardona and Sánchez, 2007 ; Sánchez and Cardona, 2008).

Όταν η ενζυμική υδρόλυση πραγματοποιείται ξεχωριστά από το στάδιο της ζύμωσης, η διεργασία καλείται «διακριτή υδρόλυση και ζύμωση» ή συντομογραφικά SHF (Separate Hydrolysis and Fermentation). Στη διάταξη αυτή, η ενζυμική υδρόλυση της κυτταρίνης και της ημικυτταρίνης γίνεται σε ένα βιοαντιδραστήρα και το υγρό με τα προϊόντα της υδρόλυσης (εξόζες και πεντόζες) μεταφέρεται σε έναν δεύτερο βιοαντιδραστήρα όπου κατάλληλοι μικροοργανισμοί μεταβολίζουν τα σάκχαρα σε βιοαιθανόλη.

Η «ταυτόχρονη σακχαροποίηση και ζύμωση» ή αλλιώς SSF (Simultaneous Saccharification and Fermentation) συνδυάζει την ενζυμική υδρόλυση με την αλκοολική ζύμωση, διατηρώντας χαμηλά τα επίπεδα τα σακχάρων στο υγρό. Η μέθοδος SSF οδηγεί σε υψηλότερες αποδόσεις αιθανόλης (έως και 40%), εξαλείφοντας την παρεμπόδιση από τα προϊόντα υδρόλυσης και την ανάγκη για διαφορετικούς αντιδραστήρες υδρόλυσης και ζύμωσης. Μια εναλλακτική στρατηγική στη βιομετατροπή της λιγνινοκυτταρινούχου βιομάζας είναι η «ενοποιημένη βιοδιεργασία» (Consolidated Bioprocessing) ή CBP, γνωστή και ως «άμεση μικροβιακή μετατροπή» (Direct Microbial Conversion, DMC). Σε αυτή τη διεργασία εφαρμόζεται ένα μόνο μικροβιακό σύστημα που έχει την ικανότητα να παράγει τα απαραίτητα υδρολυτικά ένζυμα και να μεταβολίζει τα προϊόντα τους σε αιθανόλη. Οι παραπάνω διεργασίες αναλύονται εκτενέστερα σε επόμενη παράγραφο (1.4.6).

Ορισμένες ουσίες που είτε απελευθερώνονται είτε σχηματίζονται κατά την προκατεργασία δρουν παρεμποδιστικά για τους μικροοργανισμούς. Στις εν λόγω ενώσεις περιλαμβάνονται:

- (α) η φουρφουράλη ή 2-φουραλδεΰδη (furfural, FF) και η 5-υδροξυμεθυλ-2-φουραλδεΰδη (hydroxymethyl-furfural, HMF) οι

οποίες προκύπτουν από την αποικοδόμηση των πεντοζών και εξοζών αντίστοιχα,

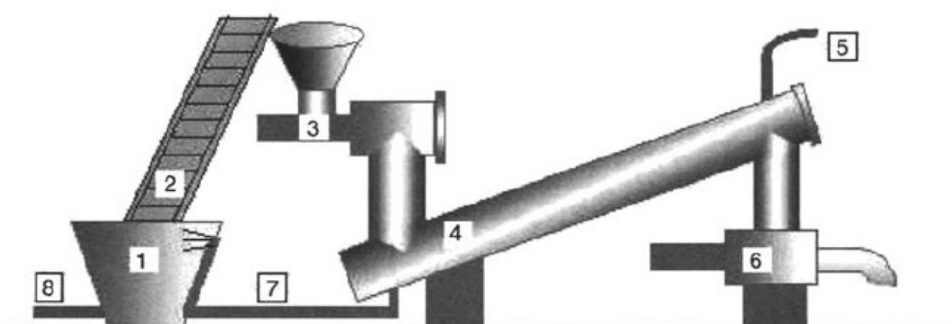
- (β) ασθενή οξέα όπως το μυρμηκικό, το λεβουλνικό και το οξικό οξύ. Η φουρφουράλη μπορεί να αντιδράσει περαιτέρω παράγοντας μυρμηκικό οξύ και η υδροξυμεθυλ-φουρφουράλη μετατρέπεται σε μυρμηκικό και λεβουλνικό οξύ. Το οξικό οξύ προκύπτει από την αποικοδόμηση της ημικυτταρίνης μιας και αποτελεί υποκαταστάτη της αλυσίδας αυτής.
- (γ) Φαινολικές ενώσεις που παράγονται κατά την αποικοδόμηση της λιγνίνης (Thomsen et al., 2009).

1.4.1 Υδροθερμική προκατεργασία

Στο πλαίσιο της παρούσας διατριβής χρησιμοποιήθηκε ως πρώτη ύλη για την παραγωγή αιθανόλης το υδροθερμικά προκατεργασμένο άχυρο σίτου. Γι' αυτό το λόγο θα γίνει μια εκτενέστερη περιγραφή αυτής της διεργασίας.

Η υδροθερμική προκατεργασία είναι από τις πλέον υποσχόμενες για βιώσιμη εφαρμογή σε βιομηχανικό επίπεδο (Larsen et al., 2008). Έχουν αναφερθεί διάφορες εκδοχές της υδροθερμικής προκατεργασίας στην επιστημονική βιβλιογραφία και κάποιες από τις πιο κοινές είναι: η εκτόνωση ατμού ή πολύ υψηλή πίεση, η αντίθετη ροή ζεστού νερού ή προσθήκη ασθενούς οξέος ή βάσης (Hendricks and Zeeman, 2009). Ο κύριος στόχος όλων αυτών των διεργασιών είναι η διαλυτοποίηση της ημικυτταρίνης και της λιγνίνης, με σκοπό την παραλαβή ενός στερεού κλάσματος εμπλουτισμένου σε κυτταρίνη. Ταυτόχρονα όμως εμφανίζουν και το μειονέκτημα ότι παράγονται παραπροϊόντα από την αποικοδόμηση της ημικυτταρίνης και της λιγνίνης, τα οποία εμφανίζουν παρεμποδιστική δράση.

Μια περίπτωση όπου μια τεχνολογία υδροθερμικής προκατεργασίας βρίσκεται σε φάση βιομηχανικής εκμετάλλευσης είναι η διεργασία που εντάσσεται στο πρόγραμμα IBUS (Integrated Biomass Utilization System) (Σχήμα 1.3). Προϊόν της συγκεκριμένης διεργασίας είναι και η πρώτη ύλη της παρούσας διατριβής, το υδροθερμικά κατεργασμένο άχυρο σίτου.



1. Είσοδος βιομάζας και δοχείο διαβροχής με ζεστό νερό που ανακυκλώνεται από τον αντιδραστήρα
2. Ταινιόδρομος με βάση που απομακρύνει το νερό
3. Αντλία Νο.1 για εισαγωγή της βιομάζας στον αντιδραστήρα
4. Ζώνη αντίδρασης με σύστημα διπλού κοχλιόδρομου
5. Είσοδος νερού στον αντιδραστήρα
6. Αντλία Νο.2 για εξαγωγή της βιομάζας από τον αντιδραστήρα
7. Σύστημα ανακύκλωσης για το νερό της διεργασίας
8. Αποχέτευση

Σχήμα 1.3: Σχηματική απεικόνιση διεργασίας IBUS
(Τροποποιημένο από Thomsen et al., 2006).

Σκοπός του προγράμματος IBUS είναι η ανάπτυξη μιας οικονομικά και ενεργειακά αποδοτικής διεργασίας για τη συμπαραγωγή αιθανόλης και ηλεκτρισμού. Η προκατεργασία στο πλαίσιο του συγκεκριμένου προγράμματος βασίζεται στη χρήση νερού και ατμού, χωρίς τη χρήση πρόσθετων χημικών ενώσεων (οξέα, βάσεις), οι οποίες θα έπρεπε μετέπειτα να ανακτηθούν ή/και να απενεργοποιηθούν. Αυτή η προσέγγιση οδηγεί σε σημαντική εξοικονόμηση πόρων, τόσο στα πάγια κεφάλαια της μονάδας όσο και στο λειτουργικό κόστος. Στη διεργασία αυτή (Σχήμα 1.3) το άχυρο σίτου

(η κύρια πρώτη ύλη της) κόβεται σε κομμάτια των 5-10 εκατοστών και διαβρέχεται με ζεστό νερό (80 °C) για διάστημα έως και 30 λεπτά πριν την είσοδό του στον αντιδραστήρα.

Η είσοδος του άχυρου στον αντιδραστήρα γίνεται με μια ειδικά σχεδιασμένη αντλία σωματιδίων. Ο αντιδραστήρας είναι ειδικά σχεδιασμένος για να αντέχει υψηλές θερμοκρασίες και πιέσεις. Το υλικό που έχει εισαχθεί στον αντιδραστήρα θερμαίνεται με τη νερού σε αντιστροφή με το άχυρο, σε θερμοκρασίες από 180 έως 200 °C. Το άχυρο παραμένει στη υψηλή αυτή θερμοκρασία για 5 με 15 λεπτά (Thomsen et al., 2006).

Η προκατεργασμένη βιομάζα εισέρχεται στη συνέχεια μέσω μιας δεύτερης αντλίας σωματιδίων στο σύστημα έκπλυσης και συμπίεσης. Μετά την έκπλυση και την απομάκρυνση της υγρής φάσης το στερεό κλάσμα συμπιέζεται σε συγκέντρωση στερεών 30 - 40% προκειμένου να χρησιμοποιηθεί μετέπειτα (Thomsen et al., 2006 ; Larsen et al., 2008). Το αποτέλεσμα της διεργασίας αυτής είναι ένα υγρό και ένα στερεό κλάσμα. Το στερεό κλάσμα περιέχει πάνω από το 90% της κυτταρίνης και ένα μέρος της λιγνίνης, ενώ το υγρό κλάσμα περιέχει τη διαλυτοποιημένη ημικυτταρίνη, μικρομοριακές ενώσεις, κλάσματα ολιγοσακχαριτών και το μεγαλύτερο μέρος των παραγόμενων παρεμποδιστών (Thomsen et al., 2009). Στον Πίνακα 1.4 παρουσιάζονται συγκεντρωτικά τα αποτελέσματα της διεργασίας.

Πίνακας 1.4: Ισοζύγιο Μάζας της προκατεργασίας του άχυρου σίτου, βάση 1000 kg άχυρου περιεκτικότητας 86% ξηρής μάζας (σύνθεση άχυρου - γλουκάνη: 38.0%, ξυλάνη: 19.6%, αραβινάνη: 2,7% και λιγνίνη: 19.8% (Larsen et al., 2008)).

	Συστατικό	Ποσότητα (kg)	Ανάκτηση (%)
Στερεό κλάσμα	Γλυκάνη	312	-
	Ξυλάνη	56	-
	Αραβινάνη	4	-
	Λιγνίνη	172	100
Υγρό κλάσμα	Διαλυτή γλυκάνη	10	-
	Γλυκόζη	4	-
	Διαλυτή ξυλάνη	42	-
	Ξυλόζη	20	-
	Διαλυτή αραβινάνη	6	-
	Αραβινόζη	0	-
Ολική ανάκτηση	C6		100
	C5		68
	C6 + C5		89

1.4.2 Εκτίμηση της αποτελεσματικότητας της προκατεργασίας

Για την αξιολόγηση των μεθόδων και των συνθηκών προκατεργασίας των λιγνινοκυτταρινούχων υποστρωμάτων χρησιμοποιούνται κάποιες από τις παρακάτω μεθόδους (Galbe and Zacchi, 2007):

- εκτίμηση της περιεκτικότητας του υγρού κλάσματος της διεργασίας σε σάκχαρα και ολιγομερή και ανάλυση του περιεχομένου της στερεάς φάσης σε υδατάνθρακες,
- ενζυμική υδρόλυση των αδιάλυτων στερεών (με ή χωρίς έκπλυση),

- ζύμωση του υγρού κλάσματος της προκατεργασίας και εκτίμηση της πιθανής παρεμπόδισης των συστατικών στον μεταβολισμό των μικροοργανισμών και,
- ζύμωση (με εφαρμογή ταυτόχρονης σακχαροποίησης και ζύμωσης) του συνολικού μίγματος της διεργασίας ή του στερεού κλάσματος μετά από έκπλυση.

Επίσης, σε αρκετές επιστημονικές μελέτες που πραγματεύονται την προκατεργασία λιγνινοκυτταρινούχων υλικών έχει γίνει χρήση του «παράγοντα έντασης» (severity factor) της διεργασίας, ώστε να μπορεί να γίνει σύγκριση μεταξύ των διαφορετικών διεργασιών. Ο παράγοντας έντασης (SF) (Εξίσωση 1), περιγράφει την ένταση της προκατεργασίας ως συνάρτηση του χρόνου και της θερμοκρασίας της (Garrote et al., 1999 ; Galbe and Zacchi, 2007 ; Olofson et al., 2008).

$$SF = \log(R) = \log \left(t \cdot e^{\frac{T-100}{14.75}} \right) \quad [\text{Εξ. 1}]$$

Όπου: t: ο χρόνος κατεργασίας και T: η θερμοκρασία κατεργασίας (°C).

1.4.3 Παρεμποδιστικές ενώσεις

Παρ' όλα τα πλεονεκτήματα που έχει η υδροθερμική προκατεργασία, μειονέκτημα της αποτελεί η δημιουργία μια σειράς ενώσεων - παραπροϊόντων που εμφανίζουν παρεμποδιστική δράση στη μεταβολική δραστηριότητα των μικροοργανισμών και στη δράση των κυτταρινολυτικών ενζύμων (Σχήμα 1.4). Όπως προαναφέρθηκε, τέτοιες ενώσεις είναι τα καρβοξυλικά οξέα, η φουρφοουράλη, η HMF και άλλες διαλυτές φαινολικές ενώσεις (Larsen et al., 2008 ; Thomsen et al., 2009).

Ενώσεις όπως η φουρφοουράλη και η υδρόξυ-μέθυλο-φουρφοουράλη μειώνουν την απόδοση και την παραγωγικότητα της αιθανόλης, εμφανίζουν παρεμποδιστική δράση στην ανάπτυξη των μικροοργανισμών ή/και

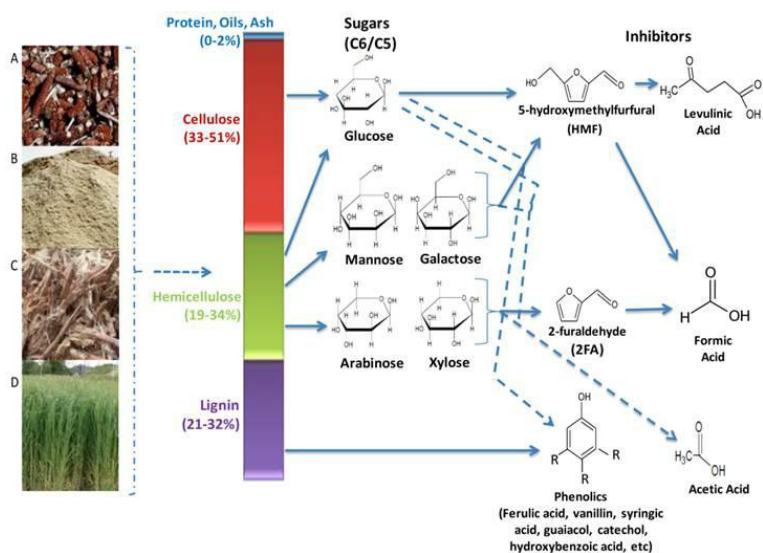
αυξάνουν τη διάρκεια της λανθάνουσας φάσης ανάπτυξής τους (Brandberg et al., 2004 ; Almeida et al., 2007 ; Heer and Sauer, 2008 ; Jönsson et al., 2013).

Η υδρόξυ-μέθυλο-φουρφουράλη και η φουρφουράλη παρεμποδίζουν ενδοκυτταρικά ένζυμα, όπως η αλκοολική αφυδρογονάση (alcohol dehydrogenase, ADH), η αλδεϋδική αφυδρογονάση (aldehyde dehydrogenase, ALDH) και η πυροσταφυλική αφυδρογονάση (pyruvate dehydrogenase, PDH) (Modig et al., 2002). Γενικά, οι μικροοργανισμοί μεταβολίζουν τις ενώσεις αυτές 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).

Από τα ασθενή οργανικά οξέα που δημιουργούνται από την προκατεργασία, το οξικό, το φορμικό (μυρμηκικό) και το λεβουλνικό οξύ είναι τα πιο συνηθισμένα και έχουν την πιο έντονη δράση. Το οξικό οξύ σχηματίζεται από την από-ακετυλίωση της ημικυτταρίνης, ενώ το φορμικό και το λεβουλνικό οξύ είναι προϊόντα της αποδόμησης της HMF. Η παρουσία ασθενών οξέων μειώνει την παραγωγή βιομάζας και έχει παρεμποδιστική δράση στον μεταβολισμό των σακχάρων προς αιθανόλη. Η παρεμποδιστική δράση των ασθενών οξέων μπορεί να αποδοθεί στην αποσύζευξη και στην εσωκυτταρική συσσώρευση ανιόντων. Τα οξέα μπορούν να διαχυθούν από το μέσο ζύμωσης στο εσωτερικό του κυττάρου, μέσω της κυτταρικής μεμβράνης, όπου δίστανται λόγω υψηλότερου pH με αποτέλεσμα να προκαλούν μείωση του εσωκυτταρικού pH. Η εν λόγω μείωση του pH αντισταθμίζεται από την ATPase, η οποία αντλεί πρωτόνια έξω από το κύτταρο σε βάρος όμως της υδρόλυσης του ATP, του οποίου η διαθεσιμότητα για την παραγωγή βιομάζας μειώνεται. Επιπλέον, τα ασθενή

οξέα μειώνουν την πρόσληψη των αρωματικών αμινοξέων από το μέσο ανάπτυξης, παρεμποδίζοντας έτσι την ανάπτυξη της ζύμης (Almeida et al., 2007 ; Jönsson et al., 2013).

Το ποσοστό και ο τύπος των φαινολικών που μπορεί να σχηματιστούν κατά την προκατεργασία της βιομάζας εξαρτάται από το είδος της πρώτης ύλης. Παρ' όλα αυτά, οι χαμηλού μοριακού βάρους φαινολικές ενώσεις έχει φανεί να έχουν ισχυρότερη παρεμποδιστική δράση από αυτές με μεγάλο μοριακό βάρος. Επιπλέον, η θέση του υποκαταστάτη *πάρα-*, *όρθο-*, *μέτα-* είναι επίσης σημαντική για την τοξικότητα των μορίων αυτών (Kline et al., 2004 ; Almeida et al., 2007). Οι φαινολικές ενώσεις πιθανά επιδρούν στις βιολογικές μεμβράνες προκαλώντας τη διάρρηξη αυτών, επηρεάζοντας έτσι την ικανότητά τους να δρουν ως επιλεκτικά φράγματα και μήτρες ενζύμων με αποτέλεσμα τη μείωση του ρυθμού ανάπτυξης και της παραγωγής αιθανόλης (Almeida et al., 2007).



Σχήμα 1.4: Σύσταση λιγνινοκυτταρινούχου βιομάζας και παρεμποδιστικές ενώσεις που σχηματίζονται κατά την προκατεργασία (Almeida et al., 2007).

Έχουν χρησιμοποιηθεί αρκετές στρατηγικές για την αντιμετώπιση της παρεμπόδισης των μικροοργανισμών από τις φουρφουράλες. Αυτές περιλαμβάνουν την αποτοξικοποίηση του μέσου που πρόκειται να υποστεί ζύμωση (Mussatto and Roberto, 2004 ; Huang et al., 2008 ; Sánchez and Cardona, 2008) ή την αξιοποίηση της εγγενούς ικανότητας αποτοξικοποίησης των μικροοργανισμών (Taherzadeh et al., 2000 ; Liu et al., 2004 ; Nichols et al., 2008 ; Sánchez and Cardona, 2008 ; Margeot et al., 2009).

1.4.4 Στρατηγικές για την αντιμετώπιση των παρεμποδιστικών φαινομένων

Σύμφωνα με τα παραπάνω, μπορεί να παρουσιαστούν έντονα προβλήματα σε μια διεργασία παραγωγής αιθανόλης εξαιτίας των παρεμποδιστικών ενώσεων που σχηματίζονται κατά την προκατεργασία της βιομάζας. Στη βιβλιογραφία έχουν αναφερθεί διάφορα εναλλακτικά μέτρα που μπορεί να ληφθούν για να αποφευχθούν τα παραπάνω προβλήματα. Οι συγκεντρώσεις των παρεμποδιστών και των ελεύθερων σακχάρων στα υδρο λήματα εξαρτώνται από την πρώτη ύλη και από τις συνθήκες της κατεργασίας (Larsson et al., 1999 ; Galbe and Zacchi, 2007). Έτσι, μια εναλλακτική λύση αποτελεί η επιλογή ήπιων συνθηκών κατεργασίας και υλικών που δεν βοηθούν στην ανάπτυξη παρεμποδιστών. Ωστόσο, προκειμένου να είναι εφικτή η ιδέα της βιομηχανικής εφαρμογής και της εμπορικής εκμετάλλευσης της αιθανόλης, απαιτείται ευρεία χρήση υποστρωμάτων (Jonsson et al., 2013). Επιπλέον, η απόδοση της διεργασίας εξαρτάται από την σακχαροποίηση και την προσβασιμότητα της κυτταρίνης. Συνεπώς, δεν είναι λογικό να γίνει αποδεκτή μια προκατεργασία με χαμηλή απόδοση για να επιτευχθούν ήπιες συνθήκες κατεργασίας. Επίσης, είναι

επιθυμητός ο σχεδιασμός διεργασιών ζύμωσης που θα αποφεύγουν τα φαινόμενα παρεμπόδισης που εμφανίζονται αλλά θα είναι και οικονομοτεχνικά βιώσιμες. Σε αυτό συμβάλλουν η υψηλή παραγωγικότητα, η υψηλή τελική συγκέντρωση του προϊόντος αλλά και η δυνατότητα ανακύκλωσης του νερού της διεργασίας (Jonsson et al., 2013). Είναι γνωστό πως η παραγωγή αιθανόλης από υδρολύματα με χαμηλή συγκέντρωση σακχάρων, κάτι το οποίο συνεπάγεται και χαμηλότερη συγκέντρωση αιθανόλης, οδηγεί σε αύξηση του κόστους και της απαιτούμενης ενέργειας για την απόσταξη του προϊόντος. (Lin and Tanaka, 2006).

Για να γίνει δυνατή η αξιοποίηση τέτοιων ρευμάτων της προκατεργασίας είναι απαραίτητη η ικανοποιητική αποτοξικοποίησή τους πριν τη ζύμωση. Έχει αναφερθεί μια πληθώρα μεθόδων (χημικών, φυσικών και βιολογικών) για την αποτοξικοποίηση των υδρολυμάτων (Persson et al., 2002 ; Pienkos and Zhang, 2009; Parawira and Tekere, 2011). Στον Πίνακα 1.5 παρουσιάζονται συγκεντρωτικά οι μέθοδοι αυτές. Η σύγκριση μεταξύ αυτών των μεθόδων βασίζεται στην επίδρασή τους στη δομή, στη χημική σύσταση και στην ικανότητα ζύμωσης των υδρολυμάτων (Cantarella et al., 2004 ; Pienkos and Zhang, 2009). Βασικό μειονέκτημα της αποτοξικοποίησης είναι η απαίτηση ενός ακόμα σταδίου σε μια διεργασία.

Μία ακόμα δυνατότητα για τον υπερκερασμό της παρεμπόδισης είναι η χρήση μεγάλης ποσότητας εμβολίου, καθώς αυτό μειώνει την παρεμπόδιση (Chung and Lee, 1985 ; Pienkos and Zhang, 2009 ; Alriksson et al., 2005). Ωστόσο, αυτή η λύση δεν είναι ελκυστική για βιομηχανική εφαρμογή (Wingren et al., 2003) διότι η χρήση μεγάλης ποσότητας εμβολίου απαιτεί και την ανακύκλωση του μικροοργανισμού. Αυτό δεν είναι εφικτό λόγω της δυσκολίας και του κόστους διαχωρισμού του μικροοργανισμού από τα στερεά υπολείμματα της ζύμωσης (Wingren et al., 2003 ; Wingren et al., 2005).

Πίνακας 1.5: Τεχνικές αποτοξικοποίησης λιγνινοκυτταρινούχων υδρολυμάτων (Jonsson et al., 2013).

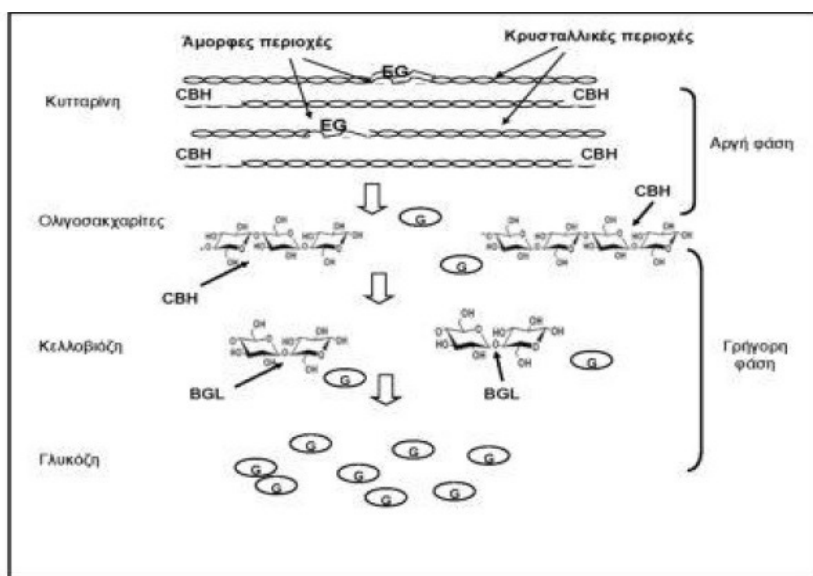
Τεχνική	Διαδικασία	Αναφορά
Χημική	Αλκάλεια [όπως Ca(OH) ₂ , NaOH, NH ₄ OH]	Alriksson et al.,(2005) ; Alriksson et al.,(2006)
	Αναγωγικοί παράγοντες	Alriksson et al.,(2011)
Ενζυμική κατεργασία	Λακάσες	Jonsson et al.,(1998) ; Jurado et al.,(2009)
	Υπεροξειδάσες	Jonsson et al.,(1998),
Θερμική	Εξάτμιση	Larsson et al.,(1999)
	Θερμική κατεργασία	Ratanunga et al.,(2000)
Εκχύλιση (Υγρού - Υγρού)	Οξικός εθυλεστέρας	Fenske et al.,(1998) ; Cantarella et al.,(2004)
	Εκχύλιση υπερκρίσιμου ρευστού	Persson et al.,(2002)
	Τρι-αλκυλαμίνη	Zhu et al.,(2011)
Εκχύλιση (Υγρού - Στερεού)	Ενεργός άνθρακας	Parajo et al.,(1997)
	Ιοντοεναλλαγή	Nilvebrant et al.,(2001), Horvath et al.,(2004)
	Λιγνίνη	Bjorklund et al.,(2002)
Μικροβιακή	<i>Coniochaeta ligniaria</i>	Lopez et al.,(2004) ; Nichols et al.,(2008)
	<i>Trichoderma reesei</i>	Larsson et al.,(1999) ; Palmqvist et al.,(1997)
	<i>Ureibacillus thermosphaericus</i>	Okuda et al.,(2008)

Άλλες στρατηγικές που στοχεύουν στους μικροοργανισμούς για τη λύση του προβλήματος της παρεμπόδισης είναι η επιλογή ανθεκτικών στελεχών αλλά και η προσαρμογή τους στα τοξικά υλικά (Dien et al., 2000 ; Keatting et al., 2005 ; Fraden et al., 2013). Μεγάλο ερευνητικό ενδιαφέρον έχει αποκτήσει η τροποποίηση της ζύμης *S. cerevisiae* ώστε να αυξηθεί η ανθεκτικότητά της στις φαινόλες (Larsoon et al., 2001a ; Larsson et al., 2001b), στις αλδεϋδες (Petersson et al., 2006 ; Gorsich et al., 2006) και στα οργανικά οξέα (Hasunuma et al., 2011a ; Hasunuma et al., 2011b).

1.4.5 Ενζυμική υδρόλυση της λιγνινοκυτταρίνης

Υδρόλυση της κυτταρίνης

Για την αποδοτική υδρόλυση της κυτταρίνης (Σχήμα 1.5) απαιτείται η συνεργιστική δράση τριών ενζυμικών ομάδων: (i) των 1,4-β-D-γλουκαν-4-γλυκανοϋδρολασών (EC3.2.1.4) ή αλλιώς ενδογλουκανασών (EG), οι οποίες δρουν σε άμορφες περιοχές κυτταρίνης ή περιοχές με χαμηλή κρυσταλλικότητα. Τα ένζυμα αυτά υδρολύουν τους β-(1,4) γλυκοζιτικούς δεσμούς απελευθερώνοντας ολιγοσακχαρίτες. (ii) Των εξωγλουκανασών ή κελλοβιοϋδρολασών (EC 3.2.1.91) που απομακρύνουν μονάδες κελλοβιοζης και γλυκόζης από τα ελεύθερα άκρα της κυτταρινικής αλυσίδας ή από τους προηγούμενως απελευθερωμένους από τις ενδογλουκανάσες ολιγοσακχαρίτες και τέλος (iii) των β-γλυκοζιδασών (EC 3.2.1.21) που υδρολύουν την κελλοβιοζή σε γλυκόζη (Sun and Cheng, 2002).



Σχήμα 1.5: Συνοπτική παρουσίαση της δράσης των λιγνινοκυτταρινολυτικών ενζύμων στην υδρόλυση της κυτταρίνης (Ξηρός, 2011).

Η δράση των κυτταρινολυτικών ενζύμων (που αφορά αδιάλυτα υποστρώματα) πραγματοποιείται σε τρεις ταυτόχρονες και διακριτές φάσεις. Τη μεταβολή στη δομή της αδιάλυτης στερεής κυτταρίνης, την υδρόλυση της κυτταρίνης προς την παραγωγή διαλυτών ολιγομερών της γλυκόζης και τέλος την υδρόλυση των διαλυτών αυτών ενδιαμέσων σε γλυκόζη. Το βραδύ στάδιο της ολικής υδρόλυσης είναι οι αντιδράσεις που σχετίζονται με τη στερεή φάση της κυτταρίνης, ενώ οι αντιδράσεις υδρόλυσης των διαλυτών μορίων έχουν μεγαλύτερη ταχύτητα αντίδρασης (Zhang and Lynd, 2004).

Παράγοντες που επηρεάζουν την ενζυμική υδρόλυση είναι η συγκέντρωση του υποστρώματος, της σελοβιόζης, του τελικού προϊόντος και οι συνθήκες αντίδρασης. Τα ένζυμα προσροφώνται μη συναγωνιστικά στην λιγνινοκυτταρίνη, με αποτέλεσμα τη μείωση της δραστηότητάς τους (Kristensen et al., 2007 ; Xiros et al., 2009). Σημαντικό ρόλο στη διαδικασία της υδρόλυσης διαδραματίζει η β -γλυκοζιδάση. Η κελλοβιόζη είναι ένα τελικό προϊόν αναστολέας πολλών κυτταρινασών, συμπεριλαμβανομένων τόσο των εξω- όσο και των ενδο-γλουκανασών. Έτσι, η παρουσία β -γλυκοζιδάσης στο ενζυμικό σύστημα είναι απαραίτητη για την γρήγορη και αποτελεσματική απομάκρυνση της κελλοβιόζης από το υδρόλυμα (Galbe and Zacchi, 2002 ; Rabinovich et al., 2002). Η β -γλυκοζιδάση με τη σειρά της αναστέλλεται από την γλυκόζη και έτσι η ενζυμική υδρόλυση είναι ευαίσθητη στη συγκέντρωση του υποστρώματος και του προϊόντος.

Τέλος, μια οικογένεια ενζυμικών ενεργοτήτων (παλαιότερα γνωστών ως GH61) που τώρα αναφέρονται στην βιβλιογραφία ως AA9 -LPMOs (Auxiliary Activity family 9 - Lytic Polysaccharide Mono-Oxygenase) φαίνεται να διαδραματίζει σημαντικό ρόλο στην υδρόλυση της κυτταρίνης μέσω οξειδωαναγωγικών δράσεων στη κύρια δομή της κυτταρίνης μειώνοντας την κρυσταλικότητά της (Langston et al., 2011 ; Harris et al., 2014). Επιπλέον, η προεπεξεργασία των κυτταρινικών υλικών και οι

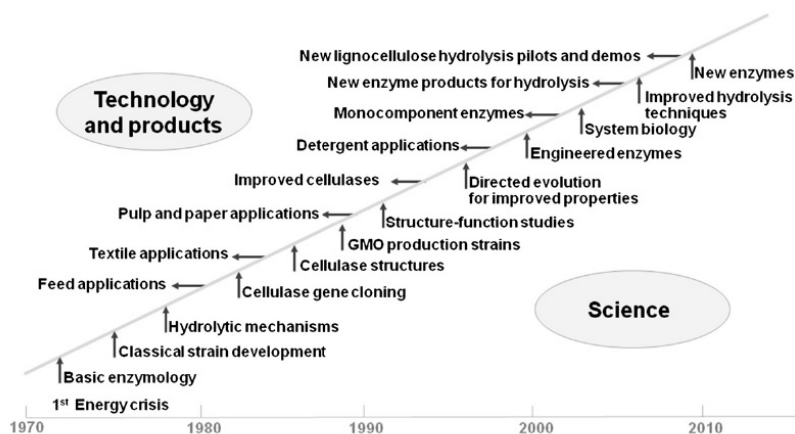
συνθήκες υδρόλυσης, όπως η θερμοκρασία και το pH, είναι μεταξύ των παραγόντων που επηρεάζουν την αποτελεσματικότητα της ενζυμικής υδρόλυσης. Οι περισσότερες κυτταρινάσες παρουσιάζουν βέλτιστη δραστηριότητα σε θερμοκρασίες και pH εύρους 45-55 °C και 4.0-6.0 αντίστοιχα (Galbe και Zacchi, 2002).

Υδρόλυση της ημικυτταρίνης

Για την αποτελεσματική αξιοποίηση των λιγνινοκυτταρινούχων υλικών απαιτείται εκτός από την αποικοδόμηση της κυτταρίνης και η αποικοδόμηση της ημικυτταρίνης (Galbe and Zacchi, 2002 ; Fukuda et al., 2009). Η δράση των κυτταρινασών δεν θα μπορούσε να είναι ολοκληρωμένη χωρίς την ταυτόχρονη δράση των ενζύμων που είναι απαραίτητα για την αποδόμηση της ημικυτταρίνης. Είναι γνωστό ότι η συζευγμένη δράση των κυτταρινασών και των ημικυτταρινασών οδηγεί σε υψηλότερη τελική παραγωγή σακχάρων (Mazeau et al., 2005). Η ημικυτταρίνη, βασικό συστατικό της οποίας είναι η ξυλάνη, υδρολύεται σε ολιγοσακχαρίτες από μια ομάδα ενζύμων που ονομάζονται ένδο-β-1,4-ξυλανάσες (EC 3.2.1.8). Εν συνεχεία, οι ολιγοσακχαρίτες που έχουν δημιουργηθεί από τη δράση των ενδο-ξυλανασών, υδρολύονται προς σχηματισμό μονομερών ξυλόζης από μια ομάδα ενζύμων που ονομάζονται β-ξυλοζιδάσες (EC 3.2.1.37). Επικουρικά στις δύο αυτές ομάδες ενζύμων δρουν οι α-L-αραβινοφουρανοζιδάσες, οι ακέτυλ-εστεράσες, οι α-γλυκουρονοζιδάσες και οι εστεράσες του φερουλικού οξέος. Στο πλέγμα της ημικυτταρίνης περιλαμβάνονται και αλυσίδες γλυκομαννάνης, οι οποίες αποδομούνται από τις β-μαννανάσες και τις β-μαννοζιδάσες (Kumar et al., 2008 ; Carvalhiero et al., 2008 ; Fukuda et al., 2009).

Ανάπτυξη καινοτόμων ενζυμικών μιγμάτων

Εδώ και δεκαετίες ένα κομμάτι της επιστημονικής κοινότητας έχει αφοσιωθεί στην ανάπτυξη καινοτόμων ενζυμικών σκευασμάτων για την αποτελεσματική αποδόμηση της λιγνινοκυτταρίνης (Σχήμα 1.6). Ο στόχος για τη μείωση του κόστους παραγωγής βιοαιθανόλης από λιγνινοκυτταρινούχα υλικά μπορεί να διαχωριστεί σε τρεις υποκατηγορίες: το κόστος των ενζύμων, το κόστος των παραγόμενων σακχάρων και το κόστος παραγωγής της αιθανόλης. Όσον αφορά στο πρώτο σκέλος, η αποδοτικότητα των ενζυμικών συστημάτων μπορεί να βελτιωθεί με το σχεδιασμό ενζύμων με βέλτιστη δομή και ιδιότητες πρόσδεσης, με υψηλή ειδική ενεργότητα, με μικρή παρεμπόδιση από τα προϊόντα της υδρόλυσης και με υψηλότερη θερμοκρασιακή σταθερότητα. Το κόστος της ενζυμικής υδρόλυσης εξαρτάται από την αποτελεσματικότητα, την απόδοση, τη συνεργιστική δράση των κυτταρινασών με τα βοηθητικά ένζυμα και τέλος από την ποσότητα των εξωτερικά προστιθέμενων ενζύμων.



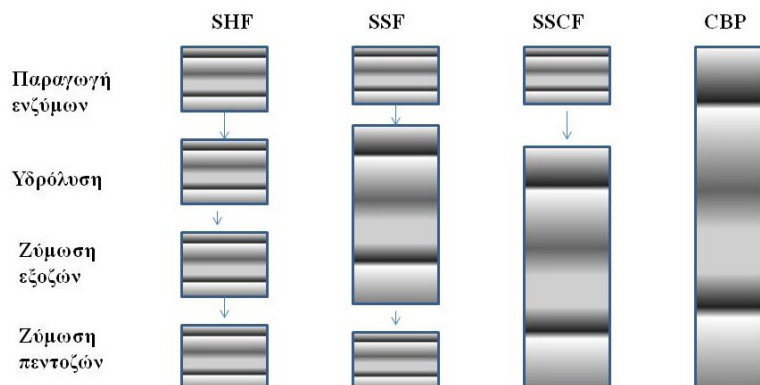
Σχήμα 1.6: Η ιστορία της ανάπτυξης των κυτταρινολυτικών ενζύμων: από την επιστήμη στην τεχνολογία (Viikari et al., 2012).

Η μείωση αυτού του κόστους είναι σημαντική για την αξιοποίηση των ενζύμων στη βιομηχανική παραγωγή αιθανόλης. Το ολοκληρωμένο σενάριο της ενοποιημένης βιοδιεργασίας (CBP), που συνδυάζει την ταυτόχρονη υδρόλυση και ζύμωση από έναν μικροοργανισμό (ή ομάδα μικροοργανισμών) σε έναν αντιδραστήρα, προβάλλει ως μια υποσχόμενη τεχνική για την παραγωγή βιοαιθανόλης. Παρ' όλο που σε ένα ιδανικό σενάριο η CBP δεν απαιτεί ένα ξεχωριστό στάδιο για την παραγωγή ενζύμων, στην πράξη η προσθήκη εξωγενώς παραγμένων ενζύμων κρίνεται αναγκαία. Αυτό συμβαίνει γιατί (προς το παρόν) δεν υπάρχει ο ιδανικός μικροοργανισμός που μπορεί να παράγει σε αξιόλογες συγκεντρώσεις όλα τα απαραίτητα ένζυμα για την υδρόλυση και να είναι ταυτόχρονα αποδοτικός στην ζύμωση των σακχάρων. Πιθανοί μικροοργανισμοί για μια τέτοια διεργασία είναι κάποια στελέχη βακτηρίων (π.χ. *Clostridium thermocellum*) και μυκήτων (π.χ. *Fusarium oxysporum* και *Neurospora crassa*) (Xu et al., 2009 ; Viikari et al., 2012). Το κόστος της υδρόλυσης μπορεί να μειωθεί εάν τα πρόσθετα ένζυμα που απαιτούνται μπορούν να παραχθούν στην ίδια μονάδα και να εισαχθούν στην διεργασία χωρίς περαιτέρω κατεργασία (Viikari et al., 2012). Μία τέτοια προσέγγιση θα εφαρμοστεί και στην παρούσα διατριβή, όπου εξωγενώς παραγμένα ένζυμα από τον μύκητα *F. oxysporum* θα εισαχθούν σε μια ενοποιημένη βιοδιεργασία παραγωγής αιθανόλης από το μύκητα και τη ζύμη *Saccharomyces cerevisiae*.

1.4.6 Διεργασίες βιομετατροπής της λιγνινοκυτταρίνης σε αιθανόλη

Η διεργασία βιομετατροπής της λιγνινοκυτταρινούχου βιομάζας σε αιθανόλη περιλαμβάνει τέσσερα διαφορετικά στάδια: **την παραγωγή σακχαρολυτικών ενζύμων** (κυτταρινάσες και ημικυτταρινάσες), **την**

υδρόλυση των υδατανθράκων που περιέχονται στη βιομάζα σε απλούστερα σάκχαρα, τη ζύμωση των εξοζών (γλυκόζη, μαννόζη και γαλακτόζη) και τη ζύμωση των πεντοζών (ξυλόζη και αραβινόζη) (Lynd et al., 2005). Ανάλογα με το βαθμό που αλληλοσυνδέονται αυτά τα στάδια, διακρίνονται οι παρακάτω τεχνολογίες παραγωγής αιθανόλης.



Σχήμα 1.7: Διεργασίες παραγωγής βιοαιθανόλης (Τροποποιημένο από Lynd et al., 2002).

- **Ξεχωριστή σακχαροποίηση και ζύμωση (Separate Hydrolysis and Fermentation, SHF)**

Η διεργασία αυτή, όπως προκύπτει και από το σχήμα 1.7, περιλαμβάνει τέσσερα ξεχωριστά στάδια και τέσσερις διαφορετικούς βιοκαταλύτες (Lynd et al., 2005). Το βασικό πλεονέκτημά της είναι ότι το κάθε στάδιο μπορεί να διεξαχθεί στις βέλτιστες συνθήκες θερμοκρασίας και pH (Zaldivar et al., 2001). Ωστόσο, η συσσώρευση των τελικών προϊόντων της υδρόλυσης (γλυκόζη και κελλοβιόζη) παρεμποδίζει τη δράση των κυτταρινασών, ιδιαίτερα της β-γλυκοζιδάσης που καταλύει την υδρόλυση της κελλοβιόζης σε γλυκόζη. Το αποτέλεσμα είναι η μείωση του ρυθμού σακχαροποίησης και της τελικής συγκέντρωσης των σακχάρων, που οδηγούν σε μικρότερη απόδοση αιθανόλης (Szczo drak and Fiedurek, 1995 ; Alfani et al., 2000 ; Zaldivar et al., 2001).

- **Ταυτόχρονη σακχαροποίηση και ζύμωση (Simultaneous Saccharification and Fermentation, SSF) και ταυτόχρονη σακχαροποίηση και συμμεταβολισμός (Simultaneous Saccharification and Cofermentation, SSCF)**

Η ταυτόχρονη σακχαροποίηση και ζύμωση συγχωνεύει την υδρόλυση της κυτταρίνης και τη ζύμωση των εξοζών σε ένα στάδιο, ενώ η παραγωγή σακχαρολυτικών ενζύμων και η ζύμωση των πεντοζών που προκύπτουν από την υδρόλυση της ημικυτταρίνης πραγματοποιούνται σε δύο επιπρόσθετα ξεχωριστά στάδια. Με την ταυτόχρονη σακχαροποίηση και τον συμμεταβολισμό, πραγματοποιείται η παραγωγή σακχαρολυτικών ενζύμων και σε ένα δεύτερο στάδιο διεξάγεται η υδρόλυση της κυτταρίνης και της ημικυτταρίνης καθώς και η ζύμωση των προϊόντων τους για την παραγωγή αιθανόλης (Lynd et al., 2005).

Συγκριτικά με την ξεχωριστή υδρόλυση και ζύμωση (SHF), η ταυτόχρονη σακχαροποίηση και ζύμωση έχει τα ακόλουθα πλεονεκτήματα: (1) αύξηση του ρυθμού υδρόλυσης, λόγω μετατροπής των σακχάρων που παρεμποδίζουν τη δράση των κυτταρινασών, (2) μικρότερες απαιτήσεις σε ένζυμα, (3) μεγαλύτερη παραγωγή προϊόντος, (4) μείωση της χρονικής διάρκειας της διεργασίας, και (5) μείωση στο κόστος επένδυσης λόγω χρήσης μικρότερου αριθμού αντιδραστήρων (Szczo drak and Fiedurek, 1995 ; Zaldivar et al., 2001 ; Sun and Cheng, 2002 ; Ballesteros et al., 2004). Ωστόσο, είναι απαραίτητος ένας συμβιβασμός όσον αφορά στη θερμοκρασία που θα διεξαχθεί η σακχαροποίηση και η ζύμωση της κυτταρίνης (Ballesteros et al., 2004).

- **Άμεση μικροβιακή μετατροπή ή Ενοποιημένη βιοδιεργασία** (Direct Microbial Conversion, DMC ή Consolidated Bioprocessing, CBP)

Με τη μέθοδο αυτή, 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.

Η βασική διαφορά της άμεσης μικροβιακής μετατροπής από τις προηγούμενες μεθόδους είναι η απουσία ξεχωριστού σταδίου για την παραγωγή σακχαρολυτικών ενζύμων. Σε αντίθεση με τις άλλες μεθόδους, ολόκληρη η ποσότητα της πρώτης ύλης είναι διαθέσιμη για την παραγωγή υδρολυτικών ενζύμων. Το αποτέλεσμα είναι η αύξηση του ρυθμού υδρόλυσης και η περαιτέρω μείωση του κόστους επένδυσης, λόγω μείωσης του όγκου του αντιδραστήρα. Επιπλέον, με τη μέθοδο αυτή μπορεί να επιτευχθεί μεγαλύτερη παραγωγή του επιθυμητού προϊόντος καθώς και βελτίωση της σταθερότητας των καλλιιεργειών και των στελεχών που χρησιμοποιούνται (Lynd et al., 2002 ; Lynd et al., 2005).

Στη βιβλιογραφία έχουν αναφερθεί φυσικά στελέχη μικροοργανισμών που είναι ικανά να διασπών και να μεταβολίζουν τους υδατάνθρακες σε αιθανόλη. Τα περισσότερα από αυτά ανήκουν σε γένη νηματοειδών μυκήτων (*Fusarium*, *Neurospora*, *Rhizopus*, *Aspergillus*, *Trichoderma*). Το βασικό πλεονέκτημα αυτών των μικροοργανισμών είναι η ικανότητά τους να παράγουν τα απαραίτητα υδρολυτικά ένζυμα ή/και να μεταβολίζουν τα παραγόμενα σάκχαρα (γλυκόζη – ζυλόζη) σε αιθανόλη. Αντίθετα, το κύριο μειονέκτημά το ψ είναι η χαμηλή απόδοση σε αιθανόλη και η μικρή

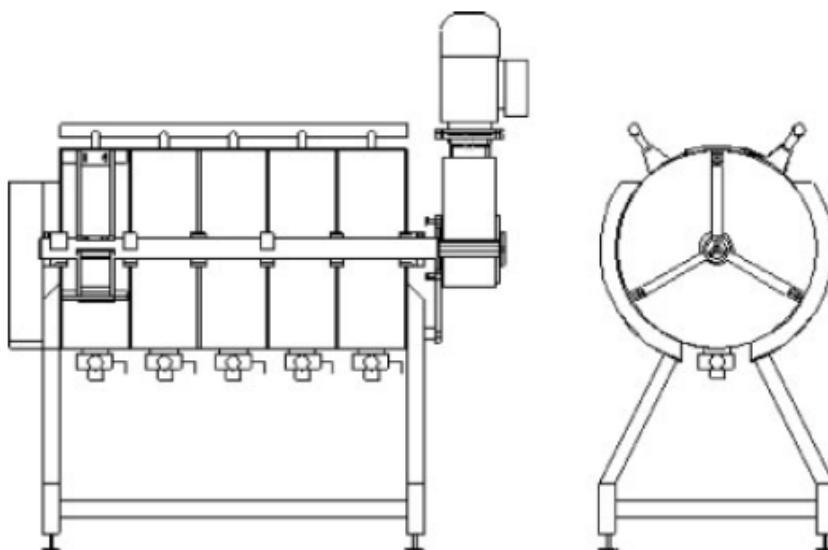
ταχύτητα τους (Panagiotou et al., 2005a ; Xu et al., 2009 ; Dogaris et al., 2009).

Η χρήση του *F. oxysporum* στην άμεση μικροβιακή μετατροπή παρουσιάζει ιδιαίτερο ενδιαφέρον, αφενός λόγω της ικανότητας του μύκητα να παράγει το απαραίτητο σύστημα ενζύμων και αφετέρου λόγω της ικανότητας του να ζυμώνει τις εξόζες και τις πεντόζες σε αιθανόλη (Christakopoulos et al., 1989 ; Christakopoulos et al., 1995 ; Christakopoulos et al., 1996 ; Panagiotou et al., 2005b ; Xiros et al., 2009).

- **Διεργασίες ταυτόχρονης σακχαροποίησης και ζύμωσης με προϋδρόλυση σε υψηλή συγκέντρωση υποστρώματος**

Ο κύριος ανασταλτικός παράγοντας για την εφαρμογή των βιοκαυσίμων δεύτερης γενεάς σε βιομηχανική κλίμακα είναι το υψηλό λειτουργικό κόστος για την παραγωγή τους (Janssen et al., 2013). Προοπτικές για να λυθεί αυτό το πρόβλημα δίνει η δυνατότητα παραγωγής βιοαιθανόλης υπό υψηλή (High - Solids) και πολύ υψηλή (Very - High - Solids) συγκέντρωση υποστρώματος. Αυτές οι διεργασίες επιτρέπουν την επίτευξη υψηλής τελικής συγκέντρωσης αιθανόλης (άνω του 4% β/β), κάτι το οποίο με τη σειρά του μειώνει το κόστος της απόσταξης καθιστώντας εφικτή τη βιομηχανική παραγωγή δεύτερης γενεάς βιοαιθανόλης (Kawa-Rygielska and Pietrzak, 2014). Όμως, η λειτουργία υπό υψηλή συγκέντρωση υποστρώματος δημιουργεί τεχνικά προβλήματα και στις δυο βασικές διεργασίες παραγωγής βιοαιθανόλης (SSF και SHF) (Korppam et al., 2013). Έχει αποδειχθεί ότι τα λιγνινοκυτταρινούχα υλικά σε συγκεντρώσεις άνω του 20% ΕΜ εμφανίζουν υψηλό ιξώδες, το οποίο καθιστά την ανάμιξή τους λιγότερο αποδοτική και απαιτεί μεγάλη κατανάλωση ενέργειας για την ανάμιξή τους σε βιοαντιδραστήρες βυθισμένης καλλιέργειας (Viikari et al.,

2012). Με σκοπό να ξεπεραστεί το πρόβλημα της ανάμιξης αναπτύχθηκαν η διεργασία ρευστοποίησης – προϋδρόλυσης πριν από τη ζύμωση (Xiros and Olsson, 2014) και νέου τύπου αντιδραστήρες ανάμιξης (Jorgensen et al., 2007). Οι αντιδραστήρες ανάμιξης ελεύθερης πτώσης (Free - fall mixing reactors) (Σχήμα 1.8) μπορούν να βελτιώσουν τις συνθήκες ανάμιξης και να μειώσουν την ενεργειακή κατανάλωση.



Σχήμα 1.8: Αντιδραστήρας ανάμιξης ελεύθερης πτώσης (Free-fall mixing reactor) (Jorgensen et al., 2007).

Η επιστημονική έρευνα πίσω από αυτούς τους αντιδραστήρες και την εισαγωγή του σταδίου της προϋδρόλυσης πριν από την ζύμωση αναφέρει πως η χρήση τους οδηγεί σε ικανοποιητική ανάμιξη των υποστρωμάτων με τα ένζυμα, μειώνοντας το ιξώδες και αυξάνοντας την απόδοση και την παραγωγικότητα της ζύμωσης (Jorgensen et al., 2007 ; Thomsen et al., 2009; Viikari et al., 2012 ; Cannella and Jorgensen, 2013 ; Matsakas et al., 2013 ; Karnaouri et al., 2014 ; Xiros and Olsson, 2014 ; Kawa-Rygielska and Pietrzak, 2015). Η διεργασία που περιλαμβάνει ένα στάδιο προϋδρόλυσης

πριν την ζύμωση αναφέρεται ως Ταυτόχρονη σακχαροποίηση και ζύμωση με προϋδρόλυση, (prehydrolysis, simultaneous saccharification, and fermentation, P-SSF) (Xiros and Olsson, 2014).

1.5 Ο μύκητας *Fusarium oxysporum*

Ο *F. oxysporum* είναι ένας νηματοειδής μύκητας ικανός για παραγωγή αιθανόλης, όχι μόνο από εξόζες αλλά και από πεντόζες. Επίσης, διαθέτει την ικανότητα να εκκρίνει πληθώρα κυτταρινολυτικών και ημικυτταρινολυτικών ενζύμων, ικανότητα που του επιτρέπει να αναπτύσσεται σε λιγνινοκυτταρινούχα υποστρώματα σε βυθισμένες ή στερεές καλλιέργειες (Christakopoulos et al., 1989 ; Christakopoulos et al., 1995 ; Christakopoulos et al., 1996 ; Xiros et al., 2009 ; Hennesey et al., 2013). Ο αργός ρυθμός παραγωγής αιθανόλης και σε αρκετές περιπτώσεις ο σχηματισμός οξικού οξέος ως παραπροϊόντος θεωρούνται εμπόδια για την βιομηχανική εκμετάλλευσή του. Παρ'όλα αυτά, έχει αποδειχθεί ότι τα αποτελεσματικά λιγνινοκυτταρινολυτικά ένζυμα του μικροοργανισμού καθώς και η ικανότητά του να ζυμώνει πεντόζες (ξυλόζη) μπορούν να βελτιώσουν σημαντικά την παράγωγή βιοαιθανόλης από λιγνινοκυτταρινούχα υποστρώματα, σε μικτές καλλιέργειες με τη ζύμη *S. cerevisiae* (Mamma et al., 1996 ; Panagiotou et al., 2011). Το στέλεχος *F. oxysporum* F3, που έχει απομονωθεί από το κύμινο, παράγει ένα ευρύ φάσμα κυτταρινασών και ημικυτταρινασών σε βυθισμένη ζύμωση, χρησιμοποιώντας σαν πηγή άνθρακα διάφορα λιγνοκυτταρινούχα υλικά. Το στέλεχος αυτό έχει την εξαιρετική ιδιότητα υδρολύει την κυτταρίνη και την ξυλάνη και να μεταβολίζει την γλυκολόζη και την ξυλόζη σε αιθανόλη. Συνεπώς, αν χρησιμοποιηθεί ο *F. oxysporum* για την παραγωγή αιθανόλης από βιομάζα, δεν είναι απαραίτητο να πραγματοποιηθεί ξεχωριστή ενζυμική υδρόλυση της

λιγνινοκυτταρινούχας πρώτης ύλης, αφού ο μύκητας αυτός μπορεί να παράγει όλα τα αναγκαία ένζυμα (Panagiotou et al., 2003 ; Panagiotou et al., 2005a).

Διάφοροι φυσικοί παράγοντες όπως το pH, η θερμοκρασία και οι συνθήκες αερισμού επηρεάζουν σημαντικά την παραγωγή αιθανόλης από τον *F. oxysporum*. Η μέγιστη συγκέντρωση αιθανόλης έχει πραγματοποιηθεί σε τιμές pH 5.0-6.0. Το pH αυτό για την αναερόβια καλλιέργεια, είναι επίσης το βέλτιστο για την ενεργότητα της β-γλυκοζιδάσης, που έχει βρεθεί ότι είναι το ένζυμο κλειδί για την άμεση μετατροπή της κυτταρίνης από τον *F.oxysporum* F3 (αναστέλλει την παρεμπόδιση από την κελλοβιόζη). Η επίδραση της θερμοκρασίας στην παραγωγή αιθανόλης εξαρτάται από το στέλεχος που χρησιμοποιείται. Πιο συγκεκριμένα, έχει βρεθεί ότι για το στέλεχος F3 η βέλτιστη θερμοκρασία για την παραγωγή ενζύμων είναι 30 °C και για την παραγωγή αιθανόλης με υπόστρωμα κυτταρίνη υπό αναερόβιες συνθήκες είναι 34 °C. Οι συνθήκες αερισμού παίζουν επίσης πολύ σημαντικό ρόλο. Επειδή ο μύκητας δεν αναπτύσσεται υπό αναερόβιες συνθήκες και η αιθανόλη δεν παράγεται υπό αερόβιες συνθήκες, συνήθως αναπτύσσεται πρώτα ο μικροοργανισμός αερόβια και στη συνέχεια τα μυκήλια τοποθετούνται σε μικρο-αερόβιες συνθήκες για την παραγωγή αιθανόλης (Christakopoulos et al., 1989 ; Singh and Kumar 1991).

Οι ιδιότητες αυτές του *F. oxysporum* θα μπορούσαν να χρησιμοποιηθούν επαρκώς σε μια ενοποιημένη βιοδιεργασία (CBP), όπου ένα μικροβιακό σύστημα ικανό να υδρολύει τα υποστρώματα και να ζυμώνει τα παραγόμενα σάκχαρα τίθεται σε εφαρμογή σε ένα μόνο αντιδραστήρα (Panagiotou et al., 2011). Η οικονομική απόδοση μιας τέτοιας διεργασίας μπορεί να βελτιωθεί περαιτέρω εάν λειτουργεί σε συνθήκες υψηλής συγκέντρωσης στερεών (ολική συγκέντρωση στερεών πάνω από 20% β/ο). Παρά το ότι η λειτουργία σε τόσο υψηλές συγκεντρώσεις δημιουργεί τεχνικά προβλήματα, όπως η

ανεπαρκής ανάδευση και ανάμιξη των μιγμάτων, έχει κερδίσει το ενδιαφέρον, διότι είναι ικανή να πετύχει τελικές συγκεντρώσεις αιθανόλης πάνω από 4% β/ο (Korppam et al., 2014) κάτι που μπορεί να μειώσει το κόστος της απόσταξης (Galbe et al., 2007). Η αντοχή των μικροοργανισμών που θα χρησιμοποιηθούν στην αιθανόλη είναι κρίσιμη για την απόδοσή τους σε μεγάλης κλίμακας διεργασίες. Στην παρούσα διατριβή γίνεται εκτενής μελέτη για την αξιοποίηση του μύκητα *F. oxysporum* σε διεργασίες παραγωγής αιθανόλης.

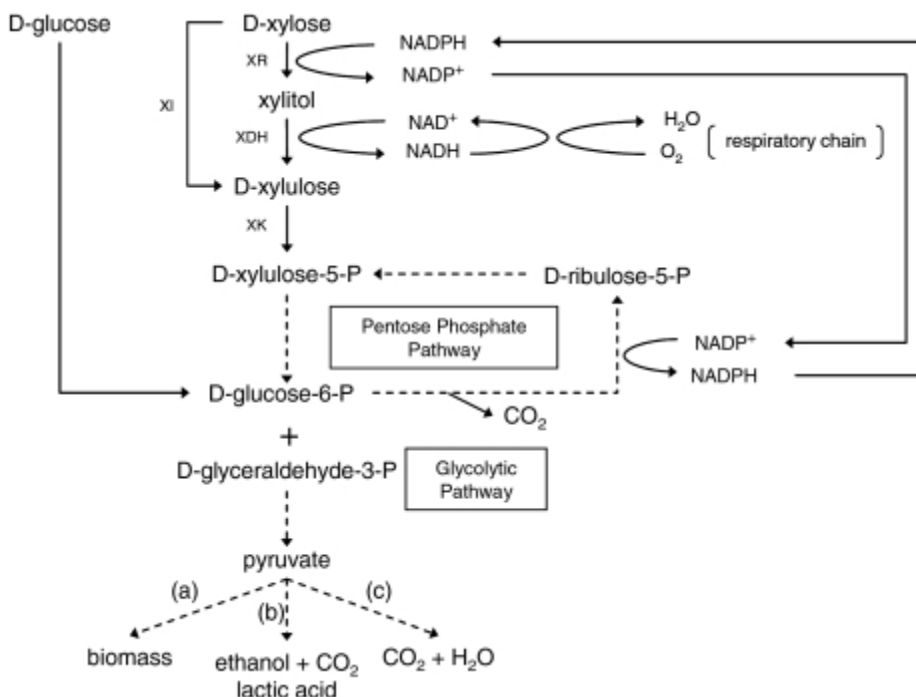
1.6 Ο μεταβολισμός των σακχάρων προς αιθανόλη

Το τελικό στάδιο στις διεργασίες μετατροπής των λιγνινοκυτταρινούχων υποστρωμάτων σε αιθανόλη είναι η ζύμωση των υδρολυμένων σακχάρων σε αιθανόλη. Η γρήγορη και αποτελεσματική μετατροπή των σακχάρων είναι ιδιαίτερα σημαντική για την απόδοση και το κόστος της όλης διεργασίας.

- **Μεταβολισμός Γλυκόζης**

Οι μικροοργανισμοί όταν υπόκεινται σε συνθήκες περιορισμένης παροχής οξυγόνου μεταβολίζουν τη γλυκόζη μέσω του μεταβολικού μονοπατιού της γλυκόλυσης (Embden-Meyerhof pathway, EM) (σχήμα 1.9). Αντίθετα με τους μύκητες, σε πολλά βακτήρια χρησιμοποιείται το μεταβολικό μονοπάτι Entner-Doudoroff (ED). Η βιοχημική πορεία της γλυκόλυσης (EM) συνδέεται με το μονοπάτι των φωσφορικών πεντοζών (PPP) μέσω δυο ενδιάμεσων μεταβολιτών, της 3-φωσφορικής γλυκεραλδεύδης και της 6-φωσφορικής φρουκτόζης. Η σύνδεση αυτή επιτρέπει την ικανότητα ρύθμισης του μεταβολισμού του μικροοργανισμού ανάλογα με τις ανάγκες του κυττάρου. Με αυτό το μηχανισμό ρυθμίζεται η

ισορροπία του κυττάρου ανάμεσα στις αναβολικές και καταβολικές του αντιδράσεις.



Σχήμα 1.9: Ο μεταβολισμός των σακχάρων (γλυκόζη – ξυλόζη) προς αιθανόλη (Maas et al., 2008).

• Μεταβολισμός Ξυλόζης

Ο μεταβολισμός της ξυλόζης πραγματοποιείται από διαφορετικά μεταβολικά μονοπάτια στα βακτήρια και στις ζύμες ή στους μύκητες. Στις ζύμες και τους νηματοειδείς μύκητες, η ξυλόζη μετατρέπεται σε ξυλιτόλη και στη συνέχεια σε ξυλουλόζη (σχήμα 1.9). Οι αντιδράσεις αυτές καταλύονται από τα ένζυμα: αναγωγή της ξυλόζης (XR) και αφυδρογονάση της ξυλιτόλης (XDH) αντίστοιχα. Η ξυλουλόζη (αφού υποστεί φωσφορυλίωση) μεταβολίζεται μέσω του μονοπατιού των φωσφορικών πεντοζών (PPP) και της γλυκόλυσης (μονοπάτι EM) σε αιθανόλη. Όμως, η πορεία αυτή του μεταβολισμού της ξυλόζης δημιουργεί

στους μύκητες μια οξειδοαναγωγική ανισορροπία. Το NAD που καταναλώνεται κατά την αφυδρογόνωση της ξυλιτόλης δεν εξισορροπείται από τη δράση της αναγωγάσης, αφού κατά τη μετατροπή της ξυλόζης σε ξυλιτόλη χρησιμοποιείται σαν αναγωγικός παράγοντας το NADPH και παράγεται NADP. Αυτή η ανισορροπία είναι και η βασική αιτία της μειωμένης απόδοσης της ζύμωσης όταν χρησιμοποιείται ξυλόζη ως πηγή άνθρακα.

1.7 Η επίδραση της αιθανόλης στον μεταβολισμό των μικροοργανισμών

Η βέλτιστη μετατροπή των σακχάρων προς βιοαιθανόλη απαιτεί στελέχη με μεγάλη αντοχή, αφού η τελευταία παρεμποδίζει τη μικροβιακή ανάπτυξη και κατ' επέκταση τη ζύμωση (Gray, 1941 ; Hallsworth, 1998 ; Meaden et al., 1999). Η επίδραση των αλκοολών στους αιθανολοπαραγωγούς μικροοργανισμούς και οι μηχανισμοί παρεμπόδισης της αποτελούν θέμα ερευνών εδώ και δεκαετίες. Οι βασικές επιδράσεις των αλκοολών τόσο σε ευκαρυωτικούς όσο και σε προκαρυωτικούς μικροοργανισμούς διέπονται από τις ίδιες γενικές αρχές και οφείλονται κυρίως στις φυσικοχημικές ιδιότητες των αλκοολών (Ingram and Buttke, 1984). Πιο συγκεκριμένα, έχειδειχθεί ότι η υδροφοβικότητα των ουσιών αυτών επιδρά άμεσα στην κυτταρική λειτουργία. Επίσης, βασικό ρόλο παίζουν και οι χημικές ιδιότητες της εκάστοτε αλκοόλης. Έχει αποδειχθεί ότι η αιθανόλη επιδρά στις κυτταρικές μεμβράνες, τα συστήματα μεταφορών και η λιπιδική σύσταση των μεμβρανών.

1.7.1 Ανάπτυξη και Μορφολογία Κυττάρων

Σημαντική επίδραση της βιοαιθανόλης στους μικροοργανισμούς είναι η παρεμπόδιση της κυτταρικής τους ανάπτυξης. Έχει αποδειχθεί ότι σχετικά μικρές συγκεντρώσεις (3-5% β/ο) της εμποδίζουν την κυτταρική διαίρεση, μειώνουν τον κυτταρικό όγκο καθώς και το ρυθμό ανάπτυξης. Αντίθετα, σε μεγάλες συγκεντρώσεις (>10% β/ο) η αιθανόλη είναι υπεύθυνη για την αύξηση των κυτταρικών θανάτων και τη μείωση του πληθυσμού των κυττάρων (Birch and Walker, 2000). Επίσης, ερευνητές διαπίστωσαν βλάβη του μιτοχονδριακού DNA των ζυμών και των μυκήτων (Nagodawithana and Steinkraus, 1976 ; Leao et al., 1982 ; Ingram and Buttke, 1984 ; Alexandre et al., 2001 ; Stanley et al., 2010). Επιπλέον, έχει δειχθεί ότι αυξημένες συγκεντρώσεις αιθανόλης εμποδίζουν το σχηματισμό μικκυλίων στον μικροοργανισμό *N.crassa* (Turian et al., 1972).

Ακόμη, η αιθανόλη επιδρά στη μορφολογία του κενοτόπιου, ενός σημαντικού κυτταρικού οργάνου και το μεταβάλλει από ένα κυστίδιο με καθαρά διαχωρισμένες δομές σε ένα μεγάλο και ενιαίο οργανίδιο εμποδίζοντας έτσι τις φυσιολογικές λειτουργίες του (Meaden et al., 1999).

Μεταξύ των ευκαρυωτικών μικροοργανισμών, ο ζυμομύκητας *S.cerevisiae* φαίνεται ότι παρουσιάζει τη μεγαλύτερη ανθεκτικότητα στην αιθανόλη και μπορεί να αναπτύσσεται ακόμα και σε συγκεντρώσεις αιθανόλης 70 - 110 g/L. Τέλος, έχει αποδειχθεί ότι 201 (Alexandre et al., 2001) και 274 (Chandler et al., 2004) γονίδια αντίστοιχα είχαν χαμηλότερα επίπεδα έκφρασης κατά τη διάρκεια της έκθεσής τους σε αιθανόλη. Αυτά τα γονίδια αποδείχθηκε ότι σχετίζονταν με τη σύνθεση πρωτεϊνών, το σχηματισμό και τις λειτουργίες του RNA, το μεταβολισμό των αμινοξέων και των νουκλεοτιδίων.

1.7.2 Διαπερατότητα και δομή μεμβράνης

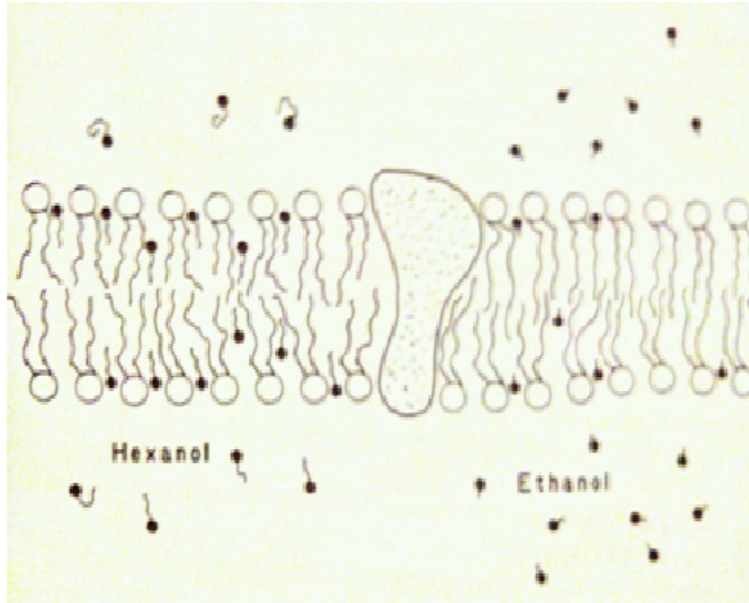
Μια πληθώρα φυσικών μεθόδων έχουν αναπτυχθεί και χρησιμοποιηθεί για τη μελέτη των επιδράσεων της αιθανόλης και άλλων αλκοολών στη δομή των κυτταρικών μεμβρανών. Όλες οι μελέτες που έχουν πραγματοποιηθεί καταλήγουν στο ίδιο συμπέρασμα, δηλαδή στο ότι η προσθήκη παραπλήσιων συγκεντρώσεων αλκοολών μεγέθους C_{1-9} αυξάνει την ελευθερία κινήσεων διαμέσου της μεμβράνης, δηλαδή τη διαπερατότητά της, αυξάνει την αταξία στη δομή της, και επίσης αυξάνει τη διαπερατότητα της μεμβράνης σε ιόντα και μικρού μεγέθους μεταβολίτες, όπως αμινοξέα και άλλες ουσίες (Mishra and Prasad, 1989). Πιο συγκεκριμένα, συγκεντρώσεις αιθανόλης που εμπόδιζαν την κυτταρική ανάπτυξη του μικροοργανισμού *S.cerevisiae* αποδείχθηκε ότι προκαλούσαν εκροή ενζύμων, όπως πρωτεασών. Άλλες μελέτες έδειξαν ότι παρουσία αιθανόλης παρατηρείται έντονη εκροή μικρού μεγέθους ιόντων, όπως το κάλιο αλλά και πρωτονίων. Επίσης, έχει δειχθεί ότι όσο αυξάνεται η υδροφοβικότητα καθώς και το μέγεθος της ανθρακικής αλυσίδας της αλκοόλης, τόσο αυξάνονται και οι αρνητικές επιδράσεις της (Thomas et al., 1992).

Παρότι οι μεγαλύτερες αλλά και οι μικρότερου μεγέθους αλκοόλες επιδρούν στην κυτταρική μεμβράνη αυξάνοντας τη διαπερατότητά της, φαίνεται ότι επιδρούν με διαφορετικό τρόπο στα βιολογικά συστήματα. Οι αλκοόλες αποτελούνται από δυο κύριες λειτουργικές ομάδες, μια υδροξυλομάδα και μια υδρογονανθρακική αλυσίδα. Οι επιδράσεις των μικρότερων σε μέγεθος αλκοολών, όπως η αιθανόλη, συνδέεται με την πολική ομάδα. Στις μεγαλύτερες αλκοόλες, όπως η εξανόλη, η υδροφοβική φύση της υδρογονανθρακικής αλυσίδας κυριαρχεί στις επιδράσεις της.

Η προσθήκη μικρών αλκοολών, όπως η αιθανόλη, έχει ποικίλες βιοφυσικές συνέπειες στα κύτταρα. Πιο συγκεκριμένα, προσθήκη αιθανόλης

προκαλεί αύξηση του pH (Ingram and Buttke, 1984) η οποία οφείλεται στην αντικατάσταση του νερού από έναν απρωτικό διαλύτη. Οι υδροφοβικοί δεσμοί είναι σπουδαίας σημασίας για τη δομή της κυτταρικής μεμβράνης και την οργάνωση των συστατικών της. Προσθήκη αλκοολών αναμένεται να προκαλέσει σημαντικές μεταβολές σε αυτή την πολύπλοκη οργάνωση. Το υδρόφοβο εσωτερικό της μεμβράνης λειτουργεί ως το πρώτο επίπεδο διαπερατότητας του κύτταρου και αποτρέπει την ελεύθερη ανταλλαγή πολικών μορίων. Αυτό καταλήγει σε αύξηση της επιφάνειας που καταλαμβάνει κάθε φωσφολιπίδιο με συνεπαγόμενη μείωση της συνοχής της μεμβράνης και αύξηση της διαπερατότητάς της (Ferchak and Pet, 1983 ; Hallsworth , 1998 ; Zhao and Bai., 2009 ; Stanley et al., 2010).

Οι επιδράσεις μεγαλύτερων σε μέγεθος αλκοολών, όπως η εξανόλη, οφείλονται στην υδρογονανθρακική αλυσίδα τους. Συγκεκριμένα, η εξανόλη συμμετέχει ενεργά στη μεμβράνη και προκαλεί αξιοσημείωτες αυξήσεις στην ελευθερία των κινήσεών της, όπως φαίνεται και στο Σχήμα 1.9 (Jain and Wu, 1977). Παρότι η επίδρασή της στην πολικότητα του υδρόφοβου εσωτερικού είναι πολύ μικρότερη από αυτήν της αιθανόλης, προκαλεί και αυτή αύξηση της διαπερατότητας της μεμβράνης και έντονες απώλειες ενδοκυτταρικών μορίων.



Σχήμα 1.9: Επίδραση αιθανόλης και εξανόλης στην πλασματική μεμβράνη (Jain and Wu, 1977).

Υλικά και Μέθοδοι

2. Υλικά και Μέθοδοι

2.1 Μικροοργανισμοί

Οι μικροοργανισμοί που χρησιμοποιήθηκαν στην παρούσα διατριβή είναι ο μύκητας *Fusarium oxysporum* F3 και η ζύμη *Saccharomyces cerevisiae*.

Ο μύκητας *F. oxysporum* απομονώθηκε από το κύμινο (Christakopoulos et al., 1989). Η διατήρηση του μύκητα γινόταν σε δοκιμαστικούς σωλήνες των 20 mL, πληρωμένους με 7 mL θρεπτικό μέσο σε επικλινή μορφή. Το θρεπτικό υλικό αποτελούνταν από Άγαρ με εκχύλισμα πατάτας (PDA, 3.9 % β/ο). Ο μικροοργανισμός επωαζόταν στους 30 °C για 5 ημέρες και στη συνέχεια φυλασσόταν στους 4 °C. Οι αποθεματικές καλλιέργειες ανανεωνόταν κάθε 3 μήνες.

Η ζύμη *S. cerevisiae* χρησιμοποιήθηκε σε εμπορική μορφή ως ζύμη αρτοποιίας (Αλλατίνη ΑΕ, Ελλάδα ; Γιώτης ΑΕ, Ελλάδα).

2.2 Λιγνινοκυταρινούχα Υποστρώματα

Ως βασική πρώτη ύλη στην παρούσα διατριβή χρησιμοποιήθηκε το υδροθερμικά κατεργασμένο άχυρο σίτου (ΥΑΣ) (Pretreated Wheat Straw, PWS). Η προκατεργασία του πραγματοποιήθηκε από την εταιρία Inbicon (Δανία) (Thomsen et al., 2006 ; Jorgensen et al., 2007). Η σύσταση του αχύρου πριν την κατεργασία ήταν (g/100 g ΞΜ): **Κυτταρίνη 30.4, Ήμικυτταρίνη 21.3, Λιγνίνη 19.4, Τέφρα 5.4, Στερεό Υπόλειμμα 23** (Thomsenet al., 2006).

Μετά την παραλαβή του αποθηκεύτηκε στους -18 °C. Πριν τη χρήση ξηράθηκε στους 65 °C μέχρι σταθερού βάρους (αρχική υγρασία 71%) και κόπηκε με χρήση εργαστηριακού μύλου σε μέγεθος σωματιδίων μικρότερο των 3 χιλιοστών.

Το υπόλειμμα βύνης (YB) προμηθεύτηκε από την Αθηναϊκή Ζυθοποιία ΑΕ. Το υλικό αποθηκεύτηκε στους -18 °C. Πριν τη χρήση ξηράθηκε στους 65 °C μέχρι σταθερού βάρους και κόπηκε με χρήση εργαστηριακού μύλου σε μέγεθος σωματιδίων μικρότερο των 5 χιλιοστών. Η σύσταση του YB αναλύθηκε σε προηγούμενη μελέτη των Xiros et al. (2008).

Η προμήθεια του σπάρδικα αραβοσίτου (ΣΑ) έγινε από το Γεωπονικό πανεπιστήμιο Αθηνών σε ξηρή μορφή. Κόπηκε με εργαστηριακό μύλο σε μέγεθος σωματιδίων μικρότερο των 2 χιλιοστών. Η σύσταση του YB αναλύθηκε σε προηγούμενη μελέτη των Katapodis and Christakopoulos (2008).

2.3 Χημικά Αντιδραστήρια και Ενζυμικά Σκευάσματα

Τα χημικά αντιδραστήρια που χρησιμοποιήθηκαν ήταν αναλυτικής καθαρότητας και προήλθαν από τις εταιρίες Sigma (ΗΠΑ), Merck (Γερμανία), Fluka (Ελβετία), Panreac Quimica S.A.U. (Ισπανία) και Lab-Scan Analytical Sciences (Ιρλανδία).

Τα διαλύματα που χρησιμοποιήθηκαν στην υγρή χρωματογραφία υψηλής απόδοσης ήταν αντίστοιχης καθαρότητας (HPLC Grade).

Τα εμπορικά ενζυμικά σκευάσματα που χρησιμοποιήθηκαν ήταν τα Celluclast 1,5L, Ultraflo και Novozym 188. Τα σκευάσματα αυτά ήταν προσφορά τη εταιρίας Novozyme (Δανία). Το πειραματικό ενζυμικό σκεύασμα Thermomix ήταν μια ευγενική παραχώρηση του Τεχνολογικού Πανεπιστημίου του Ελσίνκι (Φιλανδία) και της Καθηγήτριας Κυρίας Liisa

Viikari. Το σύστημα αυτό περιέχει ενεργότητες ενζύμων: Κελλοβιοϋδρολάση At CBHI/Cel7A, Κελλοβιοϋδρολάση Ct CBHI/Cel6A, Ενδογλουκανάση Ta EGII/Cel5A και Ξυλανάση Ta XYL/Xyn10A σε αναλογίες 3.6/1.2/1.2/1 με επιπρόσθετη β-γλυκοζιδάση At Bg/Cel3A σε συγκέντρωση 1 mg/g στερεών (ΞΜ). Η τελική ενεργότητα του ενζύμου είναι 135 FPU/ml.

2.4 Όργανα και συσκευές

Κατά τη διεξαγωγή των πειραμάτων χρησιμοποιήθηκαν τα ακόλουθα όργανα:

- Αναδευόμενος αντιδραστήρας βυθισμένης καλλιέργειας 20 λίτρων (MBR Bioreactor AG, Ελβετία).
- Αναδευόμενοι αντιδραστήρες βυθισμένης καλλιέργειας 2.5 λίτρων (BIOFLO[®] 310, New Brunswick Scientific, ΗΠΑ).
- Αντιδραστήρας - Αναμικτήρας ενζυμικής υδρόλυσης ελεύθερης πτώσης που κατασκευάστηκε από την εταιρία INOX MAR (Ελλάδα) κατόπιν σχεδιασμού, στο πλαίσιο της παρούσας διατριβής (εκτενής παρουσιάσή του γίνεται παρακάτω).
- Επωαστήρες ZHWY-211C (Zhicheng, Κίνα).
- Αυτόκλειστο (Sanyo, Μ. Βρετανία).
- Συσκευές φυγοκέντρωσης.
- Σύστημα χρωματογραφίας υψηλής απόδοσης (Szimadju, Ιαπωνία) εξοπλισμένο με στήλη διαχωρισμού Aminex HPX-87H (Bio-Rad, 300 × 7.8 mm, particle size 9 μm) και φωτομετρικό ανιχνευτή διάθλασης του φωτός (RI) (Szimadju, Ιαπωνία).

- Σύστημα αέριας χρωματογραφίας (GC, Perkin-Elmer Chromatograph) με στήλη διαχωρισμού αέριας χρωματογραφίας (DB-WAX, 30m*0.53 μm).
- Συσκευή υπερδιήθησης με μεμβράνες PM-10 (Millipore, ΗΠΑ).
- Σύστημα παραγωγής υπερκάθαρου νερού Milli-Q (Millipore, ΗΠΑ).
- Σύστημα φωτομέτρησης SpectraMax (Molecular Devices, ΗΠΑ).
- Περιτροφικό ιξωδόμετρο RHEOTEST RC1 (Medingen GmbH, Γερμανία).
- pH-μετρο 537 (WTW, Γερμανία).
- Αναλυτικοί ζυγοί.
- Θερμοστατούμενος αναδευόμενος επωαστήρας (Thermomixer, Eppendorf, Γερμανία).
- Συσκευή λυοφιλίωσης (freeze dryer, B. Braun biotech international, Γερμανία).

2.5 Υδροθερμική προκατεργασία άχυρου σίτου

Η προκατεργασία του άχυρου σίτου έγινε στην πιλοτική μονάδα της εταιρίας Inbicon στη Δανία. Η διαδικασία της προκατεργασίας περιγράφεται σε προηγούμενο κεφάλαιο αλλά και στη μελέτη των Larsen et al.(2008). Στην παρούσα εργασία χρησιμοποιήθηκε άχυρο που υπέστη δυο διαφορετικές κατεργασίες.

Στην πρώτη περίπτωση η κατεργασία του άχυρου έγινε σε θερμοκρασία 190 °C για 12 λεπτά σε συγκέντρωση στερεών 86%. Ο «παράγοντας

έντασης» της διεργασίας υπολογίστηκε σε 3.73 με βάση την Εξίσωση 1 (Garrote et al., 1999).

$$SF = \log(R) = \log\left(t \cdot e^{\frac{T-100}{14.75}}\right)$$

Μετά την κατεργασία πραγματοποιήθηκε έκπλυση και διαχωρισμός της στερεής από την υγρή φάση. Η τελική σύσταση της στερεής φάσης (71% υγρασία) (% ξηρή βάση) ήταν: **50.2 ± 1.1 κυτταρίνη, 3.8 ± 0.4 ημικυτταρίνη**, 31.6 ± 2.3 λιγνίνη, 2,8 ± 0,8 άμυλο, 8,5 ± 1,2 τέφρα. Μετρήθηκαν επίσης 0.7 (± 0.1) g ελεύθερα σάκχαρα ανά 100 g ξηρού υλικού. Αντίστοιχα, η σύσταση του υγρού κλάσματος (Liquid Fraction, LF) μετρήθηκε (% β/ο): **κυτταρίνη 3.4 ± 0.2 (0.4±0.05 ελεύθερη γλυκόζη), ημικυτταρίνη 11.3 ± 0.9 (2.6 ± 0.5 ελεύθερη ξυλόζη)**. Η ανάλυση έγινε σύμφωνα με το πρωτόκολλο του NREL (Sluiter et al., 2005). Στο υγρό κλάσμα μετρήθηκαν οι παρακάτω παρεμποδιστικές ενώσεις: **Φουρφουράλη 27 mg/L, 5-υδρόξυ-μέθυλο-φουρφουράλη 7 mg/L, 2-Φουροϊκό οξύ 14 mg/L, φαινόλες 45 mg/L, Οξικό οξύ 5,46 g/L και μυρμιγκικό οξύ 0.14 g/L.**

Στη δεύτερη περίπτωση, η κατεργασία του άχυρου πραγματοποιήθηκε σε θερμοκρασία 185 °C για 19 λεπτά. Ο «παράγοντας έντασης» της διεργασίας υπολογίστηκε σε 3.58 με βάση την Εξίσωση 1. Μετά την κατεργασία δεν πραγματοποιήθηκε έκπλυση και διαχωρισμός της στερεής από την υγρή φάση (**συγκέντρωση στερεών 20% β/ο**). Η τελική σύσταση του μίγματος ήταν (% ξηρή βάση): **39.0 ± 1.5 κυτταρίνη και 22.0 ± 1.2 ημικυτταρίνη**, 28.2 ± 1.8 λιγνίνη και 8.0 ± 1,5 τέφρα. Η ανάλυση έγινε σύμφωνα με το πρωτόκολλο του NREL (Sluiter et al., 2005). Στο υλικό μετρήθηκαν επίσης (g/L): **4 ± 0.3 οξικό οξύ, 0.1 ± 0.04 υδρόξυ-μέθυλο-φουρφουράλη και 0.4 ± 0.1 φαινόλες.**

2.6 Ανάπτυξη εμβολίου του μύκητα *F. oxysporum*

Για την παρασκευή του εμβολίου, σε κάθε δοκιμαστικό σωλήνα αποθεματικής καλλιέργειας του μύκητα προστείθεντο 15 mL αποστειρωμένου απιονισμένου νερού και χρησιμοποιούνταν 5 mL εναιωρήματος ανά φιάλη για τον εμβολιασμό υπό ασηπτικές συνθήκες κωνικών φιαλών (Erlenmeyer flasks) όγκου 250 mL (ενεργού όγκου 100 mL). Οι καλλιέργειες περιείχαν το ακόλουθο θρεπτικό μέσο: 1.00 KH_2PO_4 , 0.30 $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, 0.30 $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 10.00 $(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$, 6.94 $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, 9.52 $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ (σε g L^{-1}). Ως πηγή άνθρακα χρησιμοποιήθηκε είτε γλυκόζη - ξυλόζη (2 % β/ο) (αποστειρωμένη ξεχωριστά στους 109 °C για 40 λεπτά) για τις καλλιέργειες παραγωγής βιομάζας, είτε YB/ΣΑ (2-1) (4% β/ο) για την παραγωγή ενζύμων. Πριν τον εμβολιασμό, το pH ρυθμιζόταν στο 6.0. Οι καλλιέργειες επώαστηκαν υπό ανάδευση (200 rpm) στους 30 °C για 48 (γλυκόζη) ή 72 (YB/ΣΑ) ώρες αντίστοιχα, για την παρασκευή μικκυλίου του μικροοργανισμού.

2.7 Παραγωγή κυτταρικής βιομάζας του μύκητα *F. oxysporum*

Η παραγωγή κυτταρικής μάζας έγινε σε βιοαντιδραστήρες βυθισμένης καλλιέργειας (BIOFLO[®] 310, New Brunswick Scientific, ΗΠΑ) ενεργού όγκου 1 λίτρου. Κάθε αντιδραστήρας (αποστειρωμένος στους 110 °C για 40 min) περιείχε 1000 mL του κατάλληλου θρεπτικού μέσου (παράγραφος 2.5) και 20 g μίγματος γλυκόζης - ξυλόζης (1:1 (β/β)) ως πηγή άνθρακα. Η επώαση πραγματοποιήθηκε στους 30 °C για 3 μέρες, υπό ανάδευση (180 rpm). Στο τέλος της κυτταρικής ανάπτυξης η καλλιέργεια φυγοκεντρήθηκε ασηπτικά (10,000 rpm, στους 4 °C για 10 min) και τα κύτταρα χρησιμοποιήθηκαν στα πειράματα παραγωγής αιθανόλης.

2.8 Μέτρηση βιομάζας

Στις περιπτώσεις όπου ως πηγή άνθρακα χρησιμοποιούταν γλυκόζη ή/και ξυλόζη, δείγματα από τις καλλιέργειες φιλτράρονταν υπό κενό. Τα φίλτρα είχαν μέγεθος πόρων 0.2 μm (Millipore, ΗΠΑ). Έπειτα, τα φίλτρα μαζί με τη βιομάζα ξηραίνονταν στους 65 °C μέχρι σταθερού βάρους. Ο προσδιορισμός της κυτταρικής μάζας γινόταν με βάση το βάρος των ξηρών δειγμάτων. Αντίστοιχα, όταν ως πηγή άνθρακα χρησιμοποιούταν κάποιο λιγνινοκυτταρινούχο υπόστρωμα ο προσδιορισμός της κυτταρικής μάζας γινόταν με βάση τον προσδιορισμό της γλυκοζαμίνης του κυτταρικού τοιχώματος (Scotti et al., (2001)),

2.9 Παραγωγή ενζύμων

Για την παραγωγή των ενζύμων χρησιμοποιήθηκε κυλινδρικός αντιδραστήρας 20 λίτρων (MBR, Ελβετία). Ο λειτουργικός όγκος του βιοαντιδραστήρα ήταν 16 L. Το μέσο της καλλιέργειας αποστειρωνόταν *in situ* για 40 λεπτά στους 120 °C. Το μέσο καλλιέργειας περιέχει υπόλειμμα βύνης και σπάδικα αραβοσίτου σε αναλογία 2/1 (40 g/L), ως πηγή άνθρακα, και το κατάλληλο θρεπτικό μέσο (παράγραφος 2.5). Η ταχύτητα ανάδευσης ρυθμιζόταν στις 200 στροφές ανά λεπτό. Η παροχή αέρα στον αντιδραστήρα προσαρμοζόταν έτσι ώστε το διαλυμένο οξυγόνο της καλλιέργειας να είναι πάντα σε τιμές μεγαλύτερες του 20%. Η μέτρηση του οξυγόνου γινόταν με ηλεκτρόδιο οξυγόνου Ingold O₂ (Ingold, Steinbach, Germany). Μετά το πέρας της ανάπτυξης η καλλιέργεια συλλέχθηκε και φυγοκοκεντρήθηκε στις 14,000 στροφές ανά λεπτό (4 °C) για 40 λεπτά. Τελικά, το υπερκείμενο υγρό συμπυκνώθηκε σε συσκευή Amicon με μεμβράνη υπερδιήθησης 10,000. Το τελικό συμπύκνωμα διατηρήθηκε στους -18 °C.

2.10 Μέτρηση ενζυμικών ενεργοτήτων

Ως 1 Unit ενζύμου ορίζεται η ποσότητα του ενζύμου που απελευθερώνει 1 μ mole προϊόντος ανά λεπτό, στις συνθήκες της αντίδρασης.

- Κυτταρινάσες (Filter paper activity)

Για τον προσδιορισμό της δραστηρότητας των κυτταρινασών χρησιμοποιήθηκε ως υπόστρωμα διηθητικό χαρτί Watman No 1 (50 mg) (6cm*1cm). Το αντιδρών μίγμα περιείχε το διηθητικό χαρτί, 1 mL ρυθμιστικού διαλύματος με pH=6.0 και 500 μ L ενζυμικού διαλύματος. Επώαστηκε στους 50 °C σε θερμαινόμενο αναδευτήρα Eppendorf (1300 rpm) για 60 min (Wood and Bhat, 1988). Τα απελευθερωμένα αναγωγικά σάκχαρα προσδιορίστηκαν με τη μέθοδο του 3,5 δινιτρο-σαλικυλικού οξέος (Miller, 1959).

- β -Γλυκοζιδάσες

Η ενεργότητα της β -γλυκοζιδάσης μετρήθηκε χρησιμοποιώντας ως υπόστρωμα 1 mM pNP-glucose, σε ρυθμιστικό διάλυμα 50 mM κιτρικού-όξινου φωσφορικού νατρίου με pH=6.0. Ο ενζυμικός προσδιορισμός έγινε με επώαση στους 45 °C για 10 min και οι αντιδράσεις ξεκίνησαν με την προσθήκη 50 μ L ενζυμικού δείγματος σε συνολικό όγκο αντίδρασης 250 μ L. Ο προσδιορισμός της απόδοσης της αντίδρασης έγινε με μέτρηση της απορρόφησης της απελευθερωμένης παρα-νιτροφαινόλης στα 410 νανόμετρα.

- Ξυλανάσες

Η ενεργότητα της β -1,4-d-ενδοξυλανάσης έγινε με επώαση του ενζυμικού μίγματος σε υπόστρωμα 1% (β /o) ξυλάνης (birchwood xylan) για

10 λεπτά στους 50 °C (Bailey et al., 1992). Τα απελευθερωμένα αναγωγικά σάκχαρα προσδιορίστηκαν με τη μέθοδο του 3,5 δινιτρο-σαλικυλικού οξέος (Miller, 1959).

2.11 Επίδραση των παρεμποδιστικών ενώσεων στην ξυλανολυτική (1,4-β-D-xylan xylanohydrolase EC 3.2.1.8) και κυτταρινολυτική (Cellulase activity EC 3.2.1) ενεργότητα του ενζυμικού συστήματος του *F. oxysporum*

Όλες οι μετρήσεις ενζυμικής ενεργότητας πραγματοποιήθηκαν όπως περιγράφεται προηγουμένως. Οι αποδόσεις εκφράζονται ως Units ανά mL καλλιέργειας ή ως Units ανά g ξηρής μάζας, για όλες τις εξεταζόμενες περιπτώσεις. Το ενζυμικό σύστημα που χρησιμοποιήθηκε παρήχθη υπό τις βέλτιστες για τον *F. oxysporum* συνθήκες (Xiros and Christakopoulos, 2009). Τα παρεμποδιστικά αποτελέσματα όλων των παρεμποδιστών στην κυτταρινολυτική και ημικυτταρινολυτική δράση του ενζυμικού συστήματος εξετάστηκαν υπό τις ίδιες συνθήκες. Οι παρεμποδιστές προστέθηκαν στο μέσο της αντίδρασης, πριν από την προσθήκη των ενζύμων, σε κατάλληλες συγκεντρώσεις. Όλοι οι παρεμποδιστές χρησιμοποιήθηκαν σε συμπυκνωμένη μορφή διαλυμένοι σε DMSO (Di-methyl-sulfoxide). Για να βεβαιωθεί η μη επίδραση του DMSO στις ενζυμικές δράσεις πραγματοποιήθηκαν πειράματα αναφοράς μόνο με DMSO. Τα οργανικά οξέα χρησιμοποιήθηκαν με τη μορφή αλάτων του νατρίου. Οι σταθερές παρεμπόδισης για όλες τις εξεταζόμενες ενώσεις υπολογίστηκαν σύμφωνα με την γενική εξίσωση παρεμπόδισης (Εξίσωση 2.1):

$$r = r_0 \left(\frac{K_i}{K_i + C} \right) \quad [\text{Εξ. (2.1)}]$$

Όπου: r είναι ο ρυθμός της αντίδρασης (σε $\text{g L}^{-1} \text{h}^{-1}$), r_0 είναι ο μέγιστος ρυθμός της αντίδρασης (σε $\text{g L}^{-1} \text{h}^{-1}$) και C είναι η συγκέντρωση του εκάστοτε παρεμποδιστή (σε g L^{-1}).

2.12 Επίδραση των παρεμποδιστικών ενώσεων στην ανάπτυξη του *F. oxysporum* σε γλυκόζη σε αερόβιες βυθισμένες καλλιέργειες

Βυθισμένες καλλιέργειες του μύκητα πραγματοποιήθηκαν σε κωνικές φιάλες των 250 mL (Erlenmeyer flasks) που περιείχαν 2 g γλυκόζης και 100 mL από το κατάλληλο θρεπτικό μέσο (pH=6.0). Το μέσο καλλιέργειας και η γλυκόζη αποστειρώθηκαν ξεχωριστά στους 109 °C για 40 λεπτά. Η καλλιέργεια εμβολιάστηκε με 10 mL εμβολίου (όπως περιγράφεται παραπάνω) αναπτυγμένο για 48 ώρες. Οι καλλιέργειες επώαστηκαν στους 30 °C για 7 ημέρες.

Οι παρεμποδιστικές ενώσεις προστέθηκαν στις καλλιέργειες πριν από τον εμβολιασμό. Χρησιμοποιήθηκαν διαφορετικές τεχνικές για κάθε ένωση με βάση τις φυσικοχημικές της ιδιότητες. Ειδικότερα, οι 5-υδρόξυ-μέθυλο-φουρφοουράλη, φουρφοουράλη, 2-φουροϊκό οξύ, βανιλικό οξύ και ακετοσυρινγκόνη προστέθηκαν στο μέσο μετά την αποστείρωση, μέσω ενός αποστειρωμένου φίλτρου διαμέτρου πόρων 0,22 μm , υπό την μορφή συμπυκνωμένων διαλυμάτων σε DMSO. Η τελική συγκέντρωση του DMSO ήταν 1% v/v, σε όλες τις περιπτώσεις. Πραγματοποιήθηκε επίσης καλλιέργεια αναφοράς με την ίδια συγκέντρωση DMSO και χωρίς την προσθήκη παρεμποδιστών. Η φαινόλη χρησιμοποιήθηκε σε στερεή μορφή και αποστειρωμένη μαζί με τη γλυκόζη. Τέλος, το οξικό και το μυρμηκικό οξύ προστέθηκαν στο μέσο καλλιέργειας πριν την αποστείρωση με την μορφή αλάτων του νατρίου.

Η % διαφορά στην παραγωγή βιομάζας ή αιθανόλης ανάμεσα στην εκάστοτε καλλιέργεια και την καλλιέργεια αναφοράς εκφράστηκε ως η παρεμπόδιση στην ανάπτυξη ή ζύμωση (Εξίσωση 2.2):

$$GI = \frac{x_C - x_i}{x_C} \cdot 100 \quad [\text{Εξ. (2.2)}]$$

Όπου: GI είναι η παρεμπόδιση ανάπτυξης (%), x_C είναι η μέγιστη παράγωγη βιομάζας (σε g L^{-1}) στην καλλιέργεια αναφοράς και x_i η μέγιστη παραγωγή βιομάζας (σε g L^{-1}) στην εκάστοτε καλλιέργεια.

Ο ειδικός ρυθμός ανάπτυξης στην εκθετική φάση (μ) δίνεται από την Εξίσωση 2.3:

$$\mu = \frac{\ln(x_t / x_0)}{t} \quad [\text{Εξ. (2.3)}]$$

Όπου: x_t η συγκέντρωση της κυτταρικής μάζας (σε g L^{-1}), x_0 η αρχική συγκέντρωση της κυτταρικής μάζας (σε g L^{-1}) και t το χρονικό διάστημα μεταξύ των x_0 και x_t (σε h).

2.13 Παραγωγή αιθανόλης σε βυθισμένες αναερόβιες καλλιέργειες με παρουσία παρεμποδιστικών ενώσεων

Τα πειράματα παραγωγής αιθανόλης υπό την επίδραση των παρεμποδιστικών ενώσεων πραγματοποιήθηκαν σε αναερόβιες βυθισμένες καλλιέργειες, σε κωνικές φιάλες των 250 mL (Erlenmeyer flasks) που περιείχαν 4 g γλυκόζη αποστειρωμένη για 40 λεπτά στους 109 °C. Στην εκάστοτε φιάλη προστίθεντο 50 mL αερόβιας καλλιέργειας αναπτυγμένης για 4 ημέρες και 50 mL θρεπτικού μέσου. Η προσθήκη των παρεμποδιστών έγινε όπως περιγράφεται στην προηγούμενη παράγραφο. Όλες οι καλλιέργειες επώαστηκαν στους 30 °C για 7 μέρες.

Σε κάθε περίπτωση το pH του μέσου ρυθμίστηκε κατάλληλα στην τιμή 6.0 με τη χρήση NaOH 1 M.

Στο πείραμα μελέτης της συνεργιστικής δράσης των παρεμποδιστικών ενώσεων χρησιμοποιήθηκαν οι παρακάτω συγκεντρώσεις των ενώσεων:

5.5 g L⁻¹ οξικό οξύ, 0.25 g L⁻¹ ακετοσυρινγκόνη, 1.4 g L⁻¹ φορμικό οξύ, 1 g L⁻¹ φουρφουράλη, 0.25 g L⁻¹ φουροϊκό οξύ, 0.1 g L⁻¹ γουαϊακόλη, 0.2 g L⁻¹ φαινόλη, 0.5 g L⁻¹ βανιλικό οξύ και 3 g L⁻¹ 5-υδρόξυ-μέθυλο-φουρφουράλη.

2.14 Επίδραση της αιθανόλης στην ανάπτυξη του *F. oxysporum* σε αερόβιες βυθισμένες καλλιέργειες

Βυθισμένες καλλιέργειες του μύκητα πραγματοποιήθηκαν σε κωνικές φιάλες των 250 mL (Erlenmeyer flasks) που περιείχαν 2 g γλυκόζης και 100 mL από τα κατάλληλα θρεπτικά μέσο (pH=6.0). Το μέσο καλλιέργειας και η γλυκόζη αποστειρώθηκαν ξεχωριστά στους 109 °C για 40 λεπτά. Η καλλιέργεια εμβολιάστηκε με 10 ml εμβολίου (όπως περιγράφεται παραπάνω) αναπτυγμένο για 48 ώρες. Οι καλλιέργειες επώαστηκαν στους 30 °C για 7 ημέρες. Για να μελετηθεί ή επίδραση της αιθανόλης στην αερόβια ανάπτυξη του μύκητα, ποσότητα αιθανόλης έως 6% β/ο προστέθηκε εξωγενώς και ασηπτικά στην καλλιέργεια, μετά την αποστείρωση. Στη συνέχεια, έγινε παρακολούθηση της κυτταρικής ανάπτυξης και της κατανάλωσης υποστρώματος.

2.15 Επίδραση της αιθανόλης στην ξυλανολυτική (1,4- β -D-xylan xylanohydrolase, EC 3.2.1.8) και κυτταρινολυτική (Cellulase activity, EC 3.2.1) ενεργότητα του ενζυμικού συστήματος του *F. oxysporum*

Για να γίνει αξιολόγηση της επίδρασης που έχει η παρουσία αιθανόλης στο ενζυμικό σύστημα του *F. oxysporum* πραγματοποιήθηκαν μετρήσεις ενζυμικών ενεργοτήτων πριν από την προσθήκη των ενζύμων, υπό την προσθήκη αιθανόλης έως 10% β/ο στο μέσο της αντίδρασης. Όλες οι μετρήσεις ενζυμικής ενεργότητας πραγματοποιήθηκαν όπως περιγράφεται προηγουμένως. Οι μετρήσεις πραγματοποιήθηκαν σε θερμοκρασίες 30 °C ή 50 °C. Το ενζυμικό σύστημα που χρησιμοποιήθηκε παρήχθη υπό τις βέλτιστες για τον *F. oxysporum* συνθήκες (Xiros and Christakopoulos, 2009). Τα παρεμποδιστικά αποτελέσματα στην κυτταρινολυτική και ημικυτταρινολυτική δράση του ενζυμικού συστήματος εξετάστηκαν υπό τις ίδιες συνθήκες (50 °C, pH = 6).

2.16 Σταθερότητα του ενζυμικού συστήματος στην παρουσία αιθανόλης

Η μελέτη της σταθερότητας των ενζύμων όταν βρίσκονται σε μέσο παρουσία αιθανόλης πραγματοποιήθηκε στους 30 °C. Δηλαδή, τη θερμοκρασία στην οποία τα ένζυμα υπόκεινται παρουσία αιθανόλης για πολλές ώρες σε μια διεργασία Ταυτόχρονης Σακχαροποίησης και Ζύμωσης. Το ενζυμικό σύστημα επώαστηκε στους 30 °C παρουσία 25 g/L και 50 g/L αιθανόλης στο μέσο επώασης. Σε διάφορα χρονικά διαστήματα πραγματοποιούταν μέτρηση της κυτταρινολυτικής δράσης των ενζύμων.

2.17 Παραγωγή αιθανόλης σε βυθισμένες αναερόβιες καλλιέργειες υπό την επίδραση αιθανόλης

Τα πειράματα παραγωγής αιθανόλης υπό την επίδραση αιθανόλης πραγματοποιήθηκαν σε αναερόβιες βυθισμένες καλλιέργειες σε κωνικές φιάλες των 250 mL (Erlenmeyer flasks), που περιείχαν 4 g γλυκόζη αποστειρωμένη για 40 λεπτά στους 109 °C. Στην εκάστοτε φιάλη προστέθηκαν 50 mL αερόβιας καλλιέργειας αναπτυγμένης για 4 ημέρες και 50 mL θρεπτικού μέσου. Η προσθήκη της αιθανόλης (έως 6% β/ο) έγινε ασηπτικά στο μέσο καλλιέργειας πριν τον εμβολιασμό. Όλες οι καλλιέργειες επώαστηκαν στους 30 °C για 7 μέρες. Σε κάθε περίπτωση το pH του μέσου ρυθμίστηκε κατάλληλα σε τιμή 6.0 με τη χρήση NaOH 1 M.

2.18 Μερική απομάκρυνση της αιθανόλης κατά την ζύμωση

Πειράματα παραγωγής αιθανόλης υπό μικρο-αερόβιες συνθήκες πραγματοποιήθηκαν σε αποστειρωμένες κωνικές φιάλες που περιείχαν 9.5 g γλυκόζης. Στις φιάλες προστέθηκαν 100 mL πλήρως αναπτυγμένης αερόβιας καλλιέργειας του μύκητα. Οι αναερόβιες καλλιέργειες επώαστηκαν στους 30 °C για 7 μέρες, υπό ανάδευση 80 rpm. Κάθε 48 ώρες οι καλλιέργειες φυγοκεντρούνταν ασηπτικώς για το διαχωρισμό των κυττάρων από το μέσο καλλιέργειας. Το μέσο μεταφερόταν σε περιστροφικό εξατμιστήρα (Rotavapor RE 11, Buchi (Switzerland)), όπου η περιεχόμενη αιθανόλη αφαιρούταν μερικώς υπό κενό. Η όλη διαδικασία πραγματοποιήθηκε στους 75 °C για 10 λεπτά. Εν συνεχεία, το μέσο καλλιέργειας και τα φυγοκεντρημένα κύτταρα επιστρέφονταν στις κωνικές φιάλες και συνεχιζόταν η επώαση. Για να αποφευχθεί η συμπύκνωση του συστήματος, λόγω απώλειας νερού και αιθανόλης κατά την εφαρμογή του κενού, οι

απώλειες μετρήθηκαν με ζύγιση και η απαιτούμενη ποσότητα αποστειρωμένου και απιονισμένου νερού προστέθηκε στις καλλιέργειες. Σε όλες τις περιπτώσεις η προσθήκη που απαιτήθηκε ήταν λιγότερη από 3 mL.

2.19 Ανάπτυξη και παραγωγή αιθανόλης από το Υγρό Κλάσμα (ΥΚ) της υδροθερμικής κατεργασίας του άχυρου σίτου σε βυθισμένες καλλιέργειες

Όλα τα πειράματα ανάπτυξης του μύκητα στο ΥΚ πραγματοποιήθηκαν σε κωνικές φιάλες (Erlenmeyer flasks, 250 mL), σε θερμοκρασία 30 °C, ανάδευση 200 rpm και pH=6.0 για 7 ημέρες. Το ΥΚ συμπυκνωνόταν καταλλήλως (έως 8 φορές) στους 60 °C και χρησιμοποιούταν ως πηγή άνθρακα μόνο του ή με την προσθήκη σακχάρων (γλυκόζη - ξυλόζη, 4% β/ο). Το ΥΚ εμπλουτιζόταν με το κατάλληλο θρεπτικό μέσο όπως περιγράφεται παραπάνω. Πριν τον εμβολιασμό πραγματοποιούταν ξεχωριστή αποστείρωση του ΥΚ και των σακχάρων στους 110 °C για 40 λεπτά.

Στα πειράματα παραγωγής αιθανόλης από το ΥΚ, το κατάλληλα συμπυκνωμένο ΥΚ μόνο του ή εμπλουτισμένο με τα αντίστοιχα σάκχαρα, εμβολιαζόταν με προηγούμενως πλήρως αναπτυγμένη αερόβια καλλιέργεια του μύκητα και αφηνόταν για επώαση στους 30 °C, 200 rpm και pH=6.0 για 7 ημέρες.

Σε κατάλληλα χρονικά διαστήματα λαμβάνονταν δείγματα ασηπτικά για τον προσδιορισμό της κατανάλωσης υποστρώματος και της παραγόμενης βιομάζας και αιθανόλης.

2.20 Προσαρμογή της ανάπτυξης του μύκητα *F. oxysporum* στο Υγρό Κλάσμα της υδροθερμικής προκατεργασίας

Πραγματοποιήθηκαν διαδοχικές βυθισμένες καλλιέργειες του μύκητα σε κωνικές φιάλες των 250 mL, που περιείχαν 2 g ξυλόζη και τα κατάλληλα θρεπτικά συστατικά, στους 30 °C. Το pH ρυθμίστηκε στο 6.0 και οι φιάλες με το ΥΚ και τα σάκχαρα αποστειρώθηκαν χωριστά στους 109 °C για 40 λεπτά. Χρησιμοποιήθηκε συμπυκνωμένο ΥΚ (2 φορές). Ανά 24 ώρες μετρήθηκε η κατανάλωση του υποστρώματος. Στο τέλος της εκθετικής φάσης, 10 mL της καλλιέργειας χρησιμοποιούταν ως εμβόλιο για την επόμενη καλλιέργεια.

Μετά την πέμπτη και την δέκατη ανακαλλιέργεια πραγματοποιήθηκαν ζυμώσεις προς παραγωγή αιθανόλης από το «προσαρμοσμένο» στο ΥΚ στέλεχος του μύκητα. Οι ζυμώσεις πραγματοποιήθηκαν σε κωνικές φιάλες των 250 mL, στους 30 °C για 7 μέρες. Κάθε φιάλη περιείχε 4 g ξυλόζη, 50 mL προηγούμενης αναπτυγμένης σε ΥΚ καλλιέργειας του μύκητα και 50 mL συμπυκνωμένου (2 φορές) ΥΚ. Τα σάκχαρα, το ΥΚ και τα θρεπτικά αποστειρώνονταν χωριστά στους 109 °C για 40 λεπτά. Κάθε 24 ώρες παίρνονταν δείγματα για τον προσδιορισμό της παραγόμενης αιθανόλης και της κατανάλωσης του υποστρώματος.

2.21 Κλασματοποίηση του Υγρού Κλάσματος

Για την κλασματοποίηση του ΥΚ με σκοπό την απομάκρυνση των βλαβερών για τον μύκητα ουσιών, χρησιμοποιήθηκαν τρεις διαφορετικοί διαλύτες. Το εξάνιο, ο διαιθυλαιθέρας, και ο οξικός αιθυλεστέρας. Πριν από την εκχύλιση, το ΥΚ ξηράθηκε υπό κενό και τα εναπομείναντα στερεά χρησιμοποιήθηκαν στις εκχυλίσεις. Οι εκχυλίσεις πραγματοποιήθηκαν σε

συσκευή Soxhlet. Πραγματοποιήθηκαν 30 κύκλοι εκχύλισης κάθε φορά. Τα κλασματοποιημένα στερεά ξηράθηκαν μέχρι σταθερού βάρους στους 55 °C για την απομάκρυνση των διαλυτών. Εν συνεχεία, επαναδιαλύθηκαν στον αρχικό όγκο ΥΚ απ' τον οποίο προήλθαν και χρησιμοποιήθηκαν σε πειράματα παραγωγής αιθανόλης.

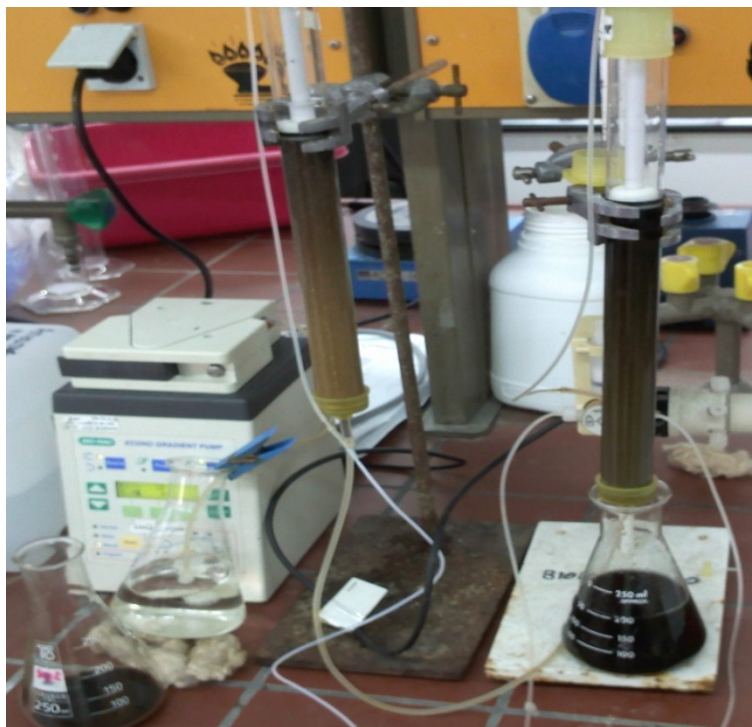
2.22 Αποτοξικοποίηση του Υγρού Κλάσματος με τη χρήση ρητινών ιοντοεναλλαγής

Σε αυτό το στάδιο χρησιμοποιήθηκαν δύο συστήματα ρητινών ιοντοεναλλαγής. Πριν από τις κατεργασίες το ΥΚ φυγοκεντρήθηκε και τα στερεά που συλλέχθηκαν επαναδιαλύθηκαν στο υγρό μετά τις κατεργασίες.

Η κατεργασία με την εμπορική ρητίνη Q-Sepharose (Sigma-Aldrich, USA) πραγματοποιήθηκε σε κωνικές φιάλες που περιείχαν 1 L ΥΚ και 200 g ρητίνη (αναγεννημένη προηγουμένως σε διάλυμα 1M NaOH). Η κατεργασία πραγματοποιήθηκε σε θερμοκρασία δωματίου για μία ώρα και υπό ανάδευση 200 rpm. Μετά το πέρας της διαδικασίας η ρητίνη αφαιρέθηκε από το ΥΚ με διήθηση υπό κενό. Το κατεργασμένο ΥΚ χρησιμοποιήθηκε για πειράματα παραγωγής αιθανόλης με την ταυτόχρονη προσθήκη σακχάρων (γλυκόζης - ξυλόζης) όπως περιγράφεται παραπάνω.

Στο δεύτερο σύστημα ρητινών χρησιμοποιήθηκαν οι εμπορικές ρητίνες A103 S και A860 S (Purolite, USA). Οι ρητίνες ξεπλύθηκαν με απιονισμένο νερό πριν από την χρήση τους και τοποθετήθηκαν σε στήλες (35 x 3 cm, Biorad). Οι στήλες πληρώθηκαν με αντιροή 3 BV/min για τη βέλτιστη πλήρωσή τους. Οι δύο στήλες ρητινών χρησιμοποιήθηκαν σε σειρά (Εικόνα 2.1). Το ΥΚ εισήχθη στο σύστημα με ροή 5 mL/min. Το υγρό που συλλέχθηκε χρησιμοποιήθηκε σε πειράματα παραγωγής αιθανόλης. Χρησιμοποιήθηκαν 50 mL πλήρως αναπτυγμένης καλλιέργειας του μύκητα

και 50 mL κατεργασμένο ΥΚ με την προσθήκη 40 g ξυλόζης. Οι ζυμώσεις έγιναν σε περιστροφικό επωαστήρα (80 rpm) στους 30 °C.



Εικόνα 2.1: Επεξεργασία του ΥΚ με τη χρήση του συστήματος δύο ρητινών (A103 S και A860 S).

2.23 Ρευστοποίηση του Υδροθερμικά κατεργασμένου άχρου σίτου

Για την αποδοτική ρευστοποίηση - σακχαροποίηση του υδροθερμικά κατεργασμένου άχρου σίτου κατασκευάστηκαν (Εικόνα 2.2) δύο αντιδραστήρες - αναμικτήρες βασισμένοι στην βαρυτική ανάμιξη, σύμφωνα με την τεχνική που παρουσιάστηκε από τον Jorgensen et al. (2007) (Σχήμα 1.8). Ο πρώτος αντιδραστήρας αποτελείται από ένα κυλινδρικό τύμπανο βάθος 25 εκατοστών και διαμέτρου 60 εκατοστών και στο τύμπανο έχει προσαρμοστεί ένας περιστροφικός άξονας με τρία πτερύγια για την ανάμιξη

του υλικού. Ο άξονας περιστρέφεται διαμέσου ενός μοτέρ ισχύος 0.55 kW. Η ταχύτητα περιστροφής ελέγχεται ηλεκτρονικά από 0 έως 20 στροφές ανά λεπτό και η φορά περιστροφής του άξονα μπορεί να ρυθμιστεί ώστε να περιστρέφεται δεξιόστροφα, αριστερόστροφα ή να εναλλάσσεται. Η θερμοκρασία του τύμπανου ελέγχεται ηλεκτρονικά (έως 90 °C) και ρυθμίζεται διαμέσου ενός ελαιόλουτρου που περιβάλλει το τύμπανο. Ο δεύτερος αντιδραστήρας, με τα ίδια τεχνικά χαρακτηριστικά, αποτελείται από δύο μικρότερα τύμπανα βάθους 5 εκατοστών και διαμέτρου 30 εκατοστών.

Τα πειράματα της παρούσας διατριβής διεξήχθησαν σε θερμοκρασία 50 °C και 55 °C, με συγκέντρωση στερεών από 20% έως 30% ΞΜ (ως % ΞΜ ορίζεται η ποσότητα σε βάρος του ξηρού άχυρου σε 100 γραμμάρια συνολικού μίγματος άχυρου και διαλύτη). Η κατάλληλη ποσότητα υδροθερμικά κατεργασμένου άχυρου αναμιγνυόταν με ρυθμιστικό διάλυμα κατάλληλου pH (pH = 5.5), στο οποίο είχε ήδη διαλυθεί η απαιτούμενη ποσότητα ενζύμου. Στο πλαίσιο της συγκεκριμένης μελέτης χρησιμοποιήθηκε ενζυμικό φορτίο από 3 έως 7 FPU g⁻¹ ΞΜ. Η ταχύτητα περιστροφής ρυθμίστηκε στα 7 rpm αλλάζοντας την φορά περιστροφής δεξιόστροφα και αριστερόστροφα δύο φορές ανά λεπτό. Η διάρκεια της ρευστοποίησης ήταν 6 και 8 ώρες. Κατά τη διάρκεια της διεργασίας ρευστοποίησης λαμβάνονταν δείγματα για την μέτρηση του ιξώδους και των απελευθερωμένων σακχάρων.



Εικόνα 2.2: Αντιδραστήρες ρευστοποίησης του υδροθερμικά κατεργασμένου άχυρου σίτου.

2.24 Μέτρηση ιξώδους

Το ιξώδες του ρευστοποιημένου υλικού μετρήθηκε σε περιστροφικό ιξωδόμετρο (RHEOTEST RC1; Medingen GmbH, Radeburg, Germany). Το σύστημα μέτρησης αποτελείται από μία ηλεκτρονική μονάδα, ένα ηλεκτρόδιο μέτρησης της θερμοκρασίας (Pt100), ένα σύστημα θερμοστάτησης (FTK-CC; -10 ως 90°C) και το λογισμικό RHEO 2000. Το σύστημα μέτρησης αποτελείται από ένα σύστημα διπλών κυλίνδρων MS-CC25 DIN/FTK. Το ιξώδες μετρήθηκε σε ρυθμό διάτμησης 44.45 s^{-1} . Όλες οι μετρήσεις έγιναν σε θερμοκρασία δωματίου. Οι μετρήσεις παρουσιάζονται σε cP (1 cP = 1000 Pa.s).

2.25 Αξιοποίηση του ρευστοποιημένου αχύρου για την παραγωγή αιθανόλης

2.25.1 Παραγωγή αιθανόλης από το ρευστοποιημένο άχυρο με τη ζύμη *S. cerevisiae*

Το κατάλληλα ρευστοποιημένο υλικό χρησιμοποιήθηκε ως υπόστρωμα για την παραγωγή αιθανόλης με την προσθήκη 5 mg g^{-1} ΞΜ ξηρής ζύμης αρτοποιίας. Οι ζυμώσεις πραγματοποιήθηκαν ως βάση αναφοράς για την αξιολόγηση της προσθήκης του συστήματος του *F. oxysporum*. Οι ζυμώσεις πραγματοποιήθηκαν υπό ανάδευση (80 rpm) για 144 ώρες, στους $30 \text{ }^{\circ}\text{C}$ και σε κωνικές φιάλες των 250 mL οι οποίες περιείχαν 100 g μίγματος.

2.25.2 Προσθήκη του συμπυκνωμένου συστήματος ενζύμων του *F. oxysporum* στη ζύμωση του ρευστοποιημένου αχύρου

Στο προκατεργασμένο - ρευστοποιημένο άχυρο με εμπορικά ένζυμα, προστέθηκαν όπως και προηγουμένως 5 mg g^{-1} ΞΜ ξηρής ζύμης αρτοποιίας μαζί με το συμπυκνωμένο ενζυμικό σύστημα του *F. oxysporum* (από 0 έως 5 FPU g^{-1} ΞΜ). Σε αυτό το στάδιο δεν υπήρξε προσθήκη βιομάζας του μύκητα. Οι ζυμώσεις πραγματοποιήθηκαν υπό ανάδευση (80 rpm) για 144 ώρες, στους $30 \text{ }^{\circ}\text{C}$ και σε κωνικές φιάλες των 250 mL οι οποίες περιείχαν 100 g μίγματος.

2.25.3 Προσθήκη κυτταρικής μάζας του *F. oxysporum* στην ζύμωση του ρευστοποιημένου αχύρου

Στο προκατεργασμένο - ρευστοποιημένο άχυρο με εμπορικά ένζυμα, προστέθηκαν όπως και προηγουμένως 5 mg g^{-1} ΞΜ ξηρής ζύμης αρτοποιίας

μαζί με φυγοκεντρημένη κυτταρική μάζα του *F. oxysporum* (από 0 έως 46 mg g⁻¹ ΞΜ). Σε αυτό το στάδιο δεν υπήρξε προσθήκη ενζύμων του μύκητα. Οι ζυμώσεις πραγματοποιήθηκαν υπό ανάδευση (80 rpm) για 144 ώρες, στους 30 °C και σε κωνικές φιάλες των 250 mL οι οποίες περιείχαν 100 g μίγματος.

2.25.4 Αξιολόγηση του ενζυμικού και μικροβιακού δυναμικού του μύκητα *F. oxysporum* σε μικτές καλλιέργειες παραγωγής αιθανόλης από το ρευστοποιημένο άχυρο

Στο προκατεργασμένο - ρευστοποιημένο ΥΑΣ με εμπορικά ένζυμα, προστέθηκαν όπως και προηγουμένως 5 mg g⁻¹ ΞΜ ξηρής ζύμης αρτοποιίας μαζί με φυγοκεντρημένη κυτταρική μάζα (από 0 έως 46 mg g⁻¹ ΞΜ) και συμπυκνωμένο ενζυμικό σύστημα (από 0 έως 7 FPU g⁻¹ ΞΜ) του *F. oxysporum*. Οι ζυμώσεις πραγματοποιήθηκαν υπό ανάδευση (80 rpm) για 144 ώρες, στους 30 °C και σε κωνικές φιάλες 250 mL οι οποίες περιείχαν 100 g μίγματος.

Για να εξεταστεί το συνδυασμένο αποτέλεσμα των ενζύμων και των κυττάρων, στην παραγωγή αιθανόλης από τον *F. oxysporum* σε προκατεργασμένο άχυρο σίτου, χρησιμοποιήθηκε η μεθοδολογία επιφάνειας απόκρισης (RSM). Για το λόγο αυτό, 3² κεντρικά σύνθετα σχέδια εφαρμόστηκαν για τη δημιουργία 11 συνδυασμών επεξεργασίας. Τα κωδικοποιημένα επίπεδα για κάθε εξεταζόμενη παράμετρο και τα πειραματικά αποτελέσματα για την δύο-παραγόντων - δύο-επιπέδων επιφανειακή ανάλυση φαίνονται στον Πίνακα 2.1. Αυτό το σχέδιο εκπροσωπείται από ένα δεύτερης τάξης πολυωνυμικό μοντέλο παλινδρόμησης για τη δημιουργία περιγραμμάτων. Το πολυωνυμικό αυτό μοντέλο είναι το εξής:

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

Πίνακας 2.1: Παραγοντικός πειραματικός σχεδιασμός για την επίδραση της κυτταρικής μάζας και του ενζυμικού συστήματος του *F. oxysporum* στην παραγωγή αιθανόλης από μικτή καλλιέργεια του μύκητα με τη ζύμη *S. cerevisiae*.

Κατεργασία	Κωδικοποιημένα επίπεδα		Πραγματικά επίπεδα	
	(X1= FPU/g ΞΜ, X2=κύτταρα mg/g ΞΜ)		(X1= FPU/g ΞΜ, X2= κύτταρα mg/g ΞΜ)	
	X1	X2	X1	X2
1	-1	-1	2	30
2	1	-1	6	30
3	-1	1	2	70
4	1	1	6	70
5	0	0	4	50
6	0	0	4	50
7	-1.414	0	1,2	50
8	1.414	0	6,8	50
9	0	-1.414	4	21,8
10	0	1.414	4	78,2
11	0	0	4	50

2.25.5 Ταυτόχρονη σακχαροποίηση και ζύμωση του ρευστοποιημένου αχύρου με μικτή καλλιέργεια *F. oxysporum* και *S. cerevisiae*

Σε αυτή την περίπτωση το ρευστοποιημένο υλικό, για 6 ώρες στους 50 °C, με 7 FPU g⁻¹ ΞΜ εμπορικό ενζυμικό φορτίο χρησιμοποιήθηκε ως πηγή άνθρακα για την παραγωγή αιθανόλης σε συγκέντρωση 26% ΞΜ. Σε 70 g ρευστοποιημένο υλικό (40% ΞΜ) προστέθηκαν 30 g υγρής ή στερεής καλλιέργειας του μύκητα *F. oxysporum* και 5 mg g⁻¹ ΞΜ ξηρή ζύμη αρτοποιίας. Οι ζυμώσεις πραγματοποιήθηκαν υπό ανάδευση (80 rpm) για

144 ώρες, στους 30 °C και σε κωνικές φιάλες των 250 mL οι οποίες περιείχαν 100 g μίγματος.

2.26 Αναλυτικές μεθόδους

- Ο προσδιορισμός της συγκέντρωσης των αναγωγικών σακχάρων έγινε με τη μέθοδο του δίνιτρο-3,5-σαλικυλικού οξέος (dinitro 3,5-salicylic acid (DNS) method) (Miller, 1959). Η γλυκόζη μετρήθηκε σύμφωνα με το D-Glucose GOD/PAP Assay Kit (Biosis, Greece).

- Η παραγόμενη ποσότητα αιθανόλης μετρήθηκε με τη χρήση συστήματος χρωματογραφίας υψηλής απόδοσης (HPLC) (Szimadju), εξοπλισμένο με στήλη διαχωρισμού Aminex HPX-87H Bio-Rad, 300 × 7.8 mm, particle size 9 μm), χρησιμοποιώντας ανιχνευτή δείκτη διάθλασης του φωτός (refractive index (RI) detector). Η ανάλυση πραγματοποιείται με τη χρήση 5 mM H₂SO₄ ως κινητή φάση, με ροή 0.6 mL/min. Ο όγκος του δείγματος ήταν 50 μL και ο χρόνος ανάλυσης 30 λεπτά, στους 40 °C. Όλα τα δείγματα φιλτράρονταν πριν την ανάλυση (0.2 μm; Macherey-Nagel).

- Η ανάλυση της σύστασης του άχυρου (αρχικού και στερεού υπολείμματος) έγινε σύμφωνα με τη μέθοδο NREL (Sluiter, 2005). Η μέθοδος αυτή περιλαμβάνει την όξινη υδρόλυση 300 mg από ξηρό δείγμα με 3 mL διαλύματος 72% (β/β) θειικού οξέος για 60 λεπτά στους 30 °C. Ακολουθεί αραίωση με 84 mL απιονισμένου νερού και επώαση σε κλίβανο αποστείρωσης για 60 λεπτά στους 120 °C. Μετά από εξουδετέρωση των διαλυμάτων με CaCO₃, φυγοκέντρηση (10 λεπτά, 10000 rpm) και φιλτράρισμα (0.2 μm) γίνεται ανάλυση των σακχάρων σε σύστημα HPLC.

- Η διαδικασία της αποστείρωσης πραγματοποιήθηκε σε κλίβανο υγρής αποστείρωσης (SANYO Labo Autoclave). Για την αποστείρωση

σακχάρων οι συνθήκες διεξαγωγής της ήταν 110 °C και 40 min, ενώ για την αποστείρωση άχυρου οι συνθήκες ήταν 121°C για 20 min.

- Μέτρηση πρωτεϊνών (Lowry method).

Η μέθοδος Lowry βασίζεται στην αντίδραση του Cu^+ , που παράγεται από την οξείδωση του ομόλογου πεπτιδίου με το αντιδραστήριο Folin-Ciocalteu (ένα μίγμα φωσφοβολφραμικού οξέος και φωσφομολυβδαινικού οξέος στη Folin-Ciocalteu αντίδραση). Ο μηχανισμός αντίδρασης δεν είναι πλήρως κατανοητός, αλλά συνεπάγεται με την αναγωγή του αντιδραστηρίου Folin και την οξείδωση των αρωματικών υπολειμμάτων. Με απορρόφηση στα 750 nm μετριέται η συγκέντρωση του μειωμένου αντιδραστηρίου Folin.

Σύμφωνα με τη μέθοδο Lowry, χρησιμοποιήθηκαν αρχικά τέσσερα αποθεματικά αντιδραστήρια (Stock reagents). Το «Α» περιείχε 1% (β/ο) θειικό χαλκό (copper sulphate (CuSO_4)), το «Β» 2% (β/ο) τρυγικό κάλιο-νάτριο, το «Γ» 0.2M καυστικού νατρίου (sodium hydroxide (NaOH)) και το «Δ» 4% (β/ο) ανθρακικού νατρίου (sodium carbonate (Na_2CO_3)). Σε 49 mL από το «Γ» προστίθενται 49 ml του «Δ». Τότε προστίθενται 1mL από το «Α» και 1mL από το «Β». Έτσι, σχηματίζεται το αντιδραστήριο «Ε» που πρέπει να παρασκευάζεται κάθε φορά λίγο πριν τη χρήση. Στη συνέχεια σχηματίζεται το αντιδραστήριο «F» με την προσθήκη 10 mL Folin-Ciocalteu και 10 mL H_2O . Παίρνουμε 0.5 mL δείγματος και του προσθέτουμε 2.5 mL «Ε». Αναδεύεται και αφήνεται για 10 min. Προσθέτουμε 0.25 mL «F». Το υπάρχον μίγμα αναδεύεται και αφήνεται για 30 λεπτά. Το τελικό βήμα είναι η μέτρηση της απορρόφησης στα 750nm.

Αποτελέσματα και Συζήτηση

3. Μελέτη της επίδρασης των παρεμποδιστικών ουσιών που σχηματίζονται κατά την προκατεργασία λιγνινοκυτταρινούχων υλικών, στον μεταβολισμό και το ενζυμικό σύστημα του μύκητα *F. oxysporum*

3.1 Επίδραση παρεμποδιστικών ουσιών στην ανάπτυξη του μύκητα *F. oxysporum*

Η παρεμποδιστική επίδραση εννέα διαφορετικών ουσιών, οι οποίες σχηματίζονται συνήθως κατά τη θερμική προκατεργασία λιγνινοκυτταρινούχων υλικών (Πίνακας 3.1), στην αερόβια ανάπτυξη του μύκητα *F. oxysporum* εξετάζεται στο παρόν τμήμα της μελέτης. Οι ουσίες αυτές, τρία παράγωγα φουρανίου (φουρφοουράλη, υδρόξυ-μεθυλοφουρφοουράλη (5-HMF) και φουροϊκό οξύ), δυο καρβοξυλικά οξέα (μεθανικό, μυρμηκικό (φορμικό) και οξικό οξύ) και τέσσερις φαινολικές ενώσεις (φαινόλη, γουαϊακόλη, ακετοσυρινγκόνη και βανιλικό οξύ) μελετήθηκαν ξεχωριστά η κάθε μία για την επίδρασή τους στην ανάπτυξη του μύκητα. Το εύρος των συγκεντρώσεων που μελετήθηκαν για κάθε παρεμποδιστή επιλέχθηκε με βάση τις συγκεντρώσεις που αναφέρονται σε λιγνινοκυτταρινικά υδρολύματα (Πίνακας 3.1).

Η ανάπτυξη μελετήθηκε με τη χρήση γλυκόζης ως πηγή άνθρακα και αξιολογήθηκε με βάση την αύξηση της κυτταρικής βιομάζας. Η επίδραση αυτών των πιθανώς παρεμποδιστικών ενώσεων στην ανάπτυξη του μύκητα *F. oxysporum* παρουσιάζεται στον Πίνακα 3.2. Είναι εμφανές ότι η παρουσία των παρεμποδιστών επηρεάζει κυρίως την παραγωγή της βιομάζας παρά τον ειδικό ρυθμό ανάπτυξης. Σε όλες τις περιπτώσεις παρατηρήθηκε εμφάνιση λανθάνουσας φάσης παρουσία υψηλών συγκεντρώσεων

παρεμποδιστών. Αυτή η εμφάνιση λανθάνουσας φάσης μπορεί να αποδοθεί στον χρόνο προσαρμογής που χρειάστηκε ο μύκητας στην παρουσία των ενώσεων.

Πίνακας 3.1: Τα επίπεδα συγκέντρωσης παρεμποδιστικών ενώσεων που σχηματίζονται κατά την κατεργασία λιγνινοκυτταρινούχων υλικών.

Διεργασία / Πρώτη Ύλη	Φουρφουράλη	5-HMF	Οξικό οξύ	Φορμικό οξύ	Φουροϊκό οξύ	Φαινόλες
Υδροθερμική / άχυρο σίτου ¹	0 - 1.2	0.007 - 0.308	0.69 - 4.94	0.14 - 2.17	0.004 - 0.069	0.032 - 0.167
Αραιό οξύ / Μαλακό ξύλο ²	0 - 3.75	0.05 - 6	1 - 6.5	0 - 10	-	-
Αλκαλική / άχυρο σίτου ³	0	0	5.8	6.5	0.007	2.7
Οξύ-Ατμός / Σκληρό ξύλο ⁴	0.3 - 3.2	0.2 - 2.6	2 - 10	-	-	-

* (1: Thomsen et al., 2009 ; 2: Larsson et al., 1999 ; 3: Klinke et al., 2003 ; 4: Taherzadeh et al., 1997)

* όλες οι συγκεντρώσεις αναφέρονται σε g L⁻¹

Πίνακας 3.2: Επίδραση μεμονωμένων παρεμποδιστικών ενώσεων στην παραγωγή βιομάζας, το ρυθμό ανάπτυξης και τη λανθάνουσα φάση του μύκητα.

Παρεμποδιστική ένωση	C (Παρεμποδιστή) (g L ⁻¹)	μ (h ⁻¹)	Παρεμπόδιση Βιομάζας (%)	Λανθάνουσα Φάση (h)
Φουρφουράλη	0.6	0.142	2.4	10
	3	0.079	14.3	30
	5	-	94.6	-
HMF	0.16	0.08	0	5
	0.8	0.084	0	5
	1.5	0.076	0	10
	3.2	0.032	8.2	55
2 φουροϊκό οξύ	0.04	0.084	0	5
	0.2	0.072	0	5
	1	0.07	16	5
	5	0.064	46.2	5
Οξικό οξύ	2.5	0.086	0	5
	7.5	0.022	50.4	70
	12.5	-	80	80
Μυρμηκικό οξύ	1.9	0.126	0	5
	9.5	0.128	0	5
	47.5	0.73	0	48
Φαινόλη	0.1	0.067	2.6	5
	0.5	0.067	2.4	5
	1	0.057	3	5
	2.5	-	93.2	5
Βανιλικό οξύ	1.25	0.096	0	5
	6.25	0.072	0	5
Ακέτοσυρινγκονη	0.6	0.063	3.6	10
	1.5	0.062	20.9	10
	3	0.054	71.6	10
Γουαϊακόλη	0.025	0.094	14.4	5
	0.45	0.075	23.1	10
	2.25	-	100	-
Πείραμα αναφοράς	0	0.088	0	5

Όσον αφορά στα καρβοξυλικά οξέα, η επίδραση του μυρμηκικού οξέος περιορίστηκε μόνο στην αύξηση της λανθάνουσας φάσης ανάπτυξης (στις 48 ώρες). Ενώ, δεν επηρέασε την παραγωγή κυτταρικής μάζας (Πίνακας 3.2). Η παρουσία οξικού οξέος είχε εντονότερη επίδραση στον μεταβολισμό του μύκητα. Το οξικό οξύ επηρέασε την παραγωγή βιομάζας όταν προστέθηκε στο μέσο καλλιέργειας σε συγκεντρώσεις μεγαλύτερες των 2.5 g L^{-1} , φτάνοντας σε 51% και 80% παρεμπόδιση της παραγωγής βιομάζας για αρχικές συγκεντρώσεις οξέος 7.5 g L^{-1} και 12.5 g L^{-1} αντίστοιχα. Επιπλέον, η παρουσία οξικού οξέος επέδρασε αρνητικά τόσο στον ρυθμό ανάπτυξης όσο και στη δημιουργία λανθάνουσας φάσης ανάπτυξης. Πιο συγκεκριμένα, με την αρχική προσθήκη 7.5 g L^{-1} οξέος παρουσιάστηκε μείωση του ρυθμού ανάπτυξης κατά 75% και αύξηση της λανθάνουσας φάσης που έφτασε σε αυτή την περίπτωση τις 72 ώρες. Με βάση τα παραπάνω, φαίνεται ότι η ανθεκτικότητα του μύκητα στην παρουσία οξικού οξέος είναι μικρότερη σε σχέση με αυτή της ζύμης *S. cerevisiae* CBS 1200, η οποία σύμφωνα με προηγούμενες μελέτες μπορεί να μεγαλώσει ακόμα και υπό την παρουσία 15 g L^{-1} οξικού οξέος στο μέσο καλλιέργειας (Delgenes et al., 1996). Σε αντίθεση με τα βιβλιογραφικά δεδομένα, όπου αναφέρεται ότι το μυρμηκικό οξύ έχει μεγαλύτερη παρεμποδιστική δράση λόγω της μικρότερης τιμής της σταθεράς διάστασης pK_a (3.75 στους 20° C και 4.75 στους 25° C για το μυρμηκικό και το οξικό αντίστοιχα) (Almeida et al., 2007), στην παρούσα μελέτη η επίδραση του οξικού οξέος στην βιομάζα του μύκητα είναι πιο σημαντική.

Όπως φαίνεται και στον Πίνακα 3.2 ο μύκητας *F. oxysporum* μπόρεσε να αναπτυχθεί υπό την παρουσία και των τριών παραγώγων φουρανίου. Από τα τρία συστατικά η φουρφοουράλη παρουσίασε την πλέον έντονη επίδραση, όπου με την προσθήκη 5 g L^{-1} στο μέσο καλλιέργειας μετρήθηκε παρεμπόδιση στην βιομάζα της τάξης του 94%. Αντιθέτως, το φουροϊκό οξύ

και η 5-HMF επέδρασαν κυρίως στο ρυθμό ανάπτυξης και επέκτειναν την λανθάνουσα φάση ανάπτυξης.

Συγκριτικά με τον μύκητα, έχει αναφερθεί στη βιβλιογραφία και η ικανότητα ζυμών να αναπτύσσονται υπό την παρουσία τέτοιων ενώσεων. Ο *S. cerevisiae* εμφάνισε ανθεκτικότητα στις φουράνες και αυτό αποδίδεται στην ικανότητά του να μεταβολίζει τις ενώσεις αυτές σε λιγότερο επιβλαβείς ουσίες. Η υδρόξυ-μέθυλο-φουρφουράλη ανάγεται σε 2,5-δ-υδρόξυμεθυλοφουράνη ενώ η φουρφουράλη ανάγεται σε 2-φουρφουρομεθανόλη (φουρφουραλική αλκοόλη) (Liu et al., 2004 ; Almeida et al., 2007). Σε σχέση με τον *S. cerevisiae*, ο *F. oxysporum* εμφανίστηκε περισσότερο ανθεκτικός στην επίδραση των παραγώγων του φουρανίου. Συγκριτικά, αναφέρεται ότι η παρουσία 3 g L⁻¹ φουρφουράλης εμφάνισε 14% και 73% παρεμπόδιση στην ανάπτυξη του μύκητα και της ζύμης αντίστοιχα (Delgenes et al., 1996).. Επιπλέον, υπό την προσθήκη 1 g L⁻¹ 5-HMF στο μέσο, η ανάπτυξη του *F. oxysporum* μειώθηκε κατά 9% σε αντίθεση με τον *S. cerevisiae* όπου η ίδια συγκέντρωση παρεμποδιστή μείωσε την ανάπτυξη βιομάζας κατά 65% (Delgenes et al., 1996).

Τέλος, οι φαινολικές ενώσεις που εξετάστηκαν (εκτός του βανιλικού οξέος) επέδρασαν σημαντικά στην βιομάζα του μύκητα σε συγκεντρώσεις μεγαλύτερες των 2 g L⁻¹. Η γουαϊακόλη και η φαινόλη εμφάνισαν τη μεγαλύτερη παρεμποδιστική δράση. Αυτές οι διαφοροποιήσεις συμφωνούν με βιβλιογραφικές πηγές που αναφέρουν ότι η παρεμποδιστική δράση των προϊόντων αποδόμησης της λιγνίνης εξαρτάται σε μεγάλο βαθμό από την χημική τους δομή. Η παρεμποδιστική τους δράση έχει συσχετιστεί και με το συντελεστή διαχωρισμού (Partition coefficient) σε μίγματα οκτανόλης - νερού (log P, υδροφοβικότητα). Σε γενικές γραμμές, ο «βαθμός παρεμποδισμού» αυξάνεται σχεδόν γραμμικά ως συνάρτηση του log των ενώσεων και είναι μεγαλύτερος στις φαινολικές αλδεΐδες και κετόνες

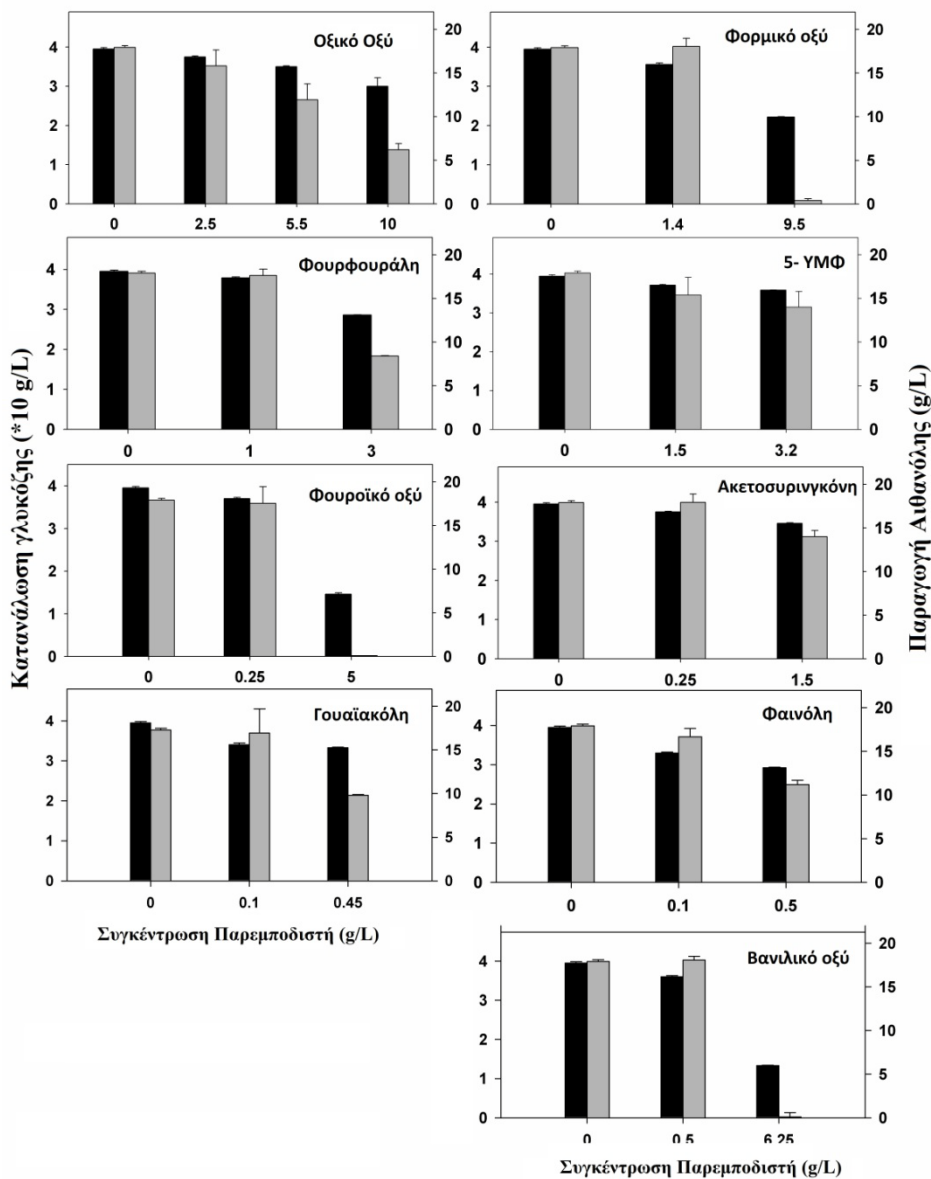
συγκριτικά με τα οργανικά οξέα. Ενώ, την μικρότερη δράση εμφανίζουν οι φαινολικές αλκοόλες (Larsson et al., 2000 ; Klinke et al., 2003 ; Klinke et al., 2004). Τέλος, ο μύκητας *F. oxysporum* φαίνεται να επηρεάζεται περισσότερο από την ζύμη (*S. cerevisiae*) στην παρουσία των παραπάνω ενώσεων (Klinke et al., 2003 ; Klinke et al., 2004).

3.2 Επίδραση παρεμποδιστικών ουσιών στην παραγωγή αιθανόλης (ζύμωση) από το μύκητα *F. oxysporum*

Για να μελετηθεί η επίδραση των παρεμποδιστικών ενώσεων που αναφέρθηκαν στην προηγούμενη παράγραφο, στην ικανότητα παραγωγής αιθανόλης από το μύκητα *F. oxysporum*, πραγματοποιήθηκαν αναερόβιες βυθισμένες καλλιέργειες υπό την προσθήκη των ανωτέρω ουσιών. Η επίδραση των ουσιών αυτών κρίθηκε με βάση την παραγωγή αιθανόλης και την κατανάλωση του υποστρώματος (γλυκόζη 40 g L⁻¹). Η μέγιστη παραγωγή αιθανόλης αλλά και η κατανάλωση της γλυκόζης παρουσιάζονται στο Σχήμα 3.1. Όπως είναι εμφανές και από το σχήμα, η παραγωγή αιθανόλης επηρεάστηκε περισσότερο σε σχέση με την κατανάλωση της γλυκόζης. Αυτό καταδεικνύει ότι η παρουσία των παρεμποδιστών επιδρά κυρίως στη γλυκόλυση. Αν και ο μικροοργανισμός καταφέρνει να προσλάβει τη γλυκόζη, πιθανώς παρεμποδίζεται η δράση εσωκυτταρικών ενζύμων που έχουν να κάνουν με τη μετατροπή του σακχάρου σε αιθανόλη (ένζυμα στο μονοπάτι της γλυκόλυσης).

Πιο συγκεκριμένα, η παρουσία καρβοξυλικών οξέων επέδρασε στην ικανότητα παραγωγής αιθανόλης μόνο όταν αυτές οι ενώσεις χρησιμοποιήθηκαν σε υψηλές συγκεντρώσεις (Σχήμα 3.1). Το οξικό οξύ εμφανίζει παρεμπόδιση (Εξίσωση 2.2) της τάξης του 30% όταν προστίθεται

στο μέσο σε συγκέντρωση 5 g L^{-1} , ενώ η παρεμπόδιση έφτασε σε επίπεδα του 60% με την παρουσία 10 g L^{-1} οξικού οξέος.



Σχήμα 3.1: (■) Παραγωγή αιθανολης και (■) κατανάλωση γλυκόζης (40 g/L) από τον *F. oxysporum* υπό την παρουσία παρεμποδιστικών ενώσεων.

Αντίστοιχα, παρεμπόδιση 60% σημειώθηκε όταν η συγκέντρωσή του μυρμιγκικού οξέος έφτασε τα 9.5 g L^{-1} . Σε όλες τις περιπτώσεις προσθήκης καρβοξυλικών οξέων, δεν παρατηρήθηκε επίδραση στη λανθάνουσα φάση της ζύμωσης. Η εντονότερη επίδραση του φορμικού οξέος μπορεί να αποδοθεί, όπως έχει προαναφερθεί, στη χαμηλότερη σταθερά ιονισμού pK_a . Αυτό μπορεί να οδηγεί σε διαφορές στη διαπερατότητα των οξέων από τις κυτταρικές μεμβράνες ή/και διαφορές στην τοξικότητα της ιονισμένης τους μορφής, όταν αυτά βρεθούν στο εσωτερικό του κυττάρου (Palmqvist et al., 2000).

Αυτό το συμπέρασμα επιβεβαιώνεται και από άλλες μελέτες που έχουν πραγματοποιηθεί και αφορούν στην επίδραση των οργανικών οξέων στην ικανότητα ζυμών να παράγουν αιθανόλη (Soni et al., 1982 ; Larsson et al., 1999 ; Palmqvist et al., 2000).

Ανάμεσα στα παράγωγα φουρανίου που εξετάστηκαν, η 5-HMF εμφάνισε τη μικρότερη επίδραση στην παραγωγή αιθανόλης. Συγκεκριμένα, η απόδοση σε αιθανόλη μειώθηκε κατά 20% με την παρουσία 3.2 g L^{-1} της ουσίας στο μέσο. Αντίθετα, η προσθήκη 3 g L^{-1} φουρφοϋράλης οδήγησε σε μείωση της απόδοσης σε αιθανόλη κατά 50%. Τέλος, απαιτήθηκε η προσθήκη 5 g L^{-1} φουροϊκού οξέος στο μέσο καλλιέργειας για να παρεμποδιστεί ολοκληρωτικά η παραγωγή αιθανόλης από το μύκητα *F. oxysporum*. Αυτά τα αποτελέσματα καταδεικνύουν, όπως αναφέρθηκε και προηγουμένως, πως ο μύκητας έχει την ικανότητα να μεταβολίζει αυτές τις ουσίες σε άλλες λιγότερο τοξικές όταν αυτές εμφανίζονται στο μέσο καλλιέργειας σε «ήπιες» συγκεντρώσεις. Αντίστοιχα αποτελέσματα εμφανίζονται και στην ανθεκτικότητα ζυμών στην παρουσία «ήπιων» συγκεντρώσεων παραγώγων του φουρανίου (Taherzadeh et al., 2000).

Όπως και κατά την αερόβια ανάπτυξη έτσι και στο στάδιο της ζύμωσης οι φαινολικές ενώσεις επιδρούν διαφορετικά στον μεταβολισμό του *F.*

oxysporum. Η φαινόλη και η γουαϊακόλη παρουσιάζουν παρεμπόδιση στην παραγωγή αιθανόλης κατά 35% και 45% αντίστοιχα, όταν οι συγκεντρώσεις τους στο μέσο είναι 0.5 και 0.45 g L⁻¹ αντίστοιχως. Αντιθέτως, το βανιλικό οξύ και η ακετοσυρινγκόνη εμφανίζουν μικρότερη επίδραση στην μεταβολική ικανότητα του *F. oxysporum* υπό αναερόβιες συνθήκες. Το βανιλικό οξύ δεν παρουσίασε καμία επίδραση στην ικανότητα παραγωγής αιθανόλης σε συγκεντρώσεις κάτω του 1 g L⁻¹, ενώ απαιτούνται 6.25 g L⁻¹ για να παρεμποδιστεί πλήρως η παραγωγή αιθανόλης. Αντίστοιχα, η ακετοσυρινγκόνη δεν επηρεάζει τη ζύμωση σε συγκέντρωση 0.25 g L⁻¹, ενώ απαιτούνται 1.5 g L⁻¹ για να παρεμποδιστεί η απόδοση σε αιθανόλη κατά 20%. Εξαιτίας της πολυπλοκότητας της δομής των φαινολικών ενώσεων, οι μηχανισμοί παρεμπόδισης τέτοιων ενώσεων στον μεταβολισμό μυκήτων και ζυμών δεν έχουν διαλευκανθεί πλήρως. Παρ' όλα αυτά, τα παραπάνω αποτελέσματα επιβεβαιώνουν προηγούμενες μελέτες που έδειξαν ότι εκτός από την υδροφοβικότητα, την τοξικότητα των ουσιών αυτών επηρεάζουν τόσο το μοριακό βάρος όσο και η θέση του υποκαταστάτη (πάρα-, όρθο-, μέτα-) (Klinke et al., 2004 ; Almeida et al., 2007).

Τα επίπεδα αντοχής του *F. oxysporum* στην τοξικότητα των ανωτέρω ουσιών μπορούν να συγκριθούν με εκείνα αρκετών στελεχών μικροοργανισμών (ζυμών) που χρησιμοποιούνται σε βιομηχανικές διεργασίες. Ο μύκητας παρουσιάζει μεγαλύτερη αντοχή στη φουρφουράλη και την HMF συγκριτικά με άλλες ζύμες (Lee et al., 1999 ; Klinke et al., 2004 ; Almeida et al., 2007). Χαρακτηριστικά αναφέρεται ότι συγκεντρώσεις 2 g L⁻¹ φουρφουράλης και 3 g L⁻¹ HMF, μείωσαν την απόδοση σε αιθανόλη κατά 90% και 83% αντίστοιχα (Delgenes et al., 1996 ; Lee et al., 1999). Σε αντίθεση με τις προηγούμενες ενώσεις, τα ασθενή οργανικά οξέα εμφανίζουν μεγαλύτερη παρεμποδιστική δράση στον *F. oxysporum* σε σχέση με τον *S. cerevisiae*. Απαιτούνται συγκεντρώσεις

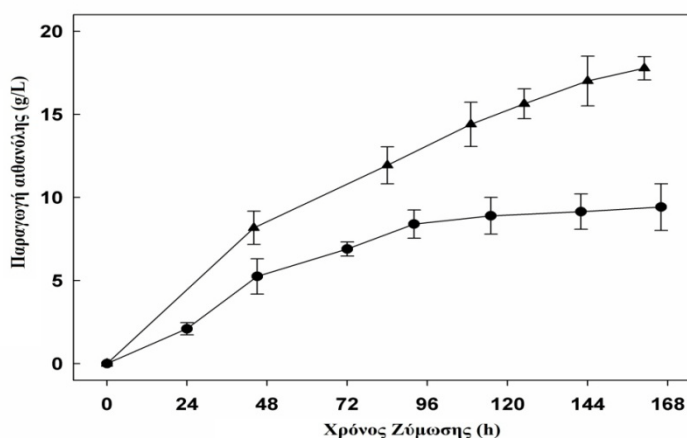
οξικού και φορμικού οξέος της τάξεως των 15 g L^{-1} για να μειώσουν την απόδοση σε αιθανόλη κατά 20% μόνο σε ζυμώσεις της ζύμης *S. cerevisiae* (Larsson et al., 1999).

Τέλος, όσον αφορά στην συμπεριφορά των μικροοργανισμών παρουσία φαινολικών ενώσεων, ούτε ο *F. oxysporum* αλλά ούτε ο *S. cerevisiae* επηρεάζονται αισθητά από την παρουσία ακετοσυρινγκόνης. Αντίθετα, ο *S. cerevisiae* εμφανίζεται περισσότερο ανθεκτικός στην επίδραση του βανιλικού οξέος, όπου απαιτείται συγκέντρωση οξέος 10 g L^{-1} για να μειωθεί η απόδοση σε αιθανόλη κατά 50% (Klinke et al., 2003 ; Klinke et al., 2004).

3.3 Μελέτη συνεργιστικής επίδρασης των παρεμποδιστικών ουσιών στην παραγωγή αιθανόλης

Οι παρεμποδιστικές ενώσεις που αναφέρθηκαν στην προηγούμενη παράγραφο δεν εμφανίζονται μεμονωμένα αλλά όλες μαζί στα υδρολύματα που προκύπτουν από την κατεργασία της λιγνινοκυτταρινούχου βιομάζας. Στη βιβλιογραφία έχουν αναφερθεί συνεργιστικές δράσεις των ουσιών αυτών, ιδίως των φουρφουράλη και HMF (Taherzadeh et al., 2000). Για να μπορέσει να αξιολογηθεί η πιθανή χρήση του *F. oxysporum* για την παραγωγή βιοαιθανόλης από τέτοια υδρολύματα, πραγματοποιήθηκαν αναερόβιες καλλιέργειες του μύκητα υπό την παρουσία όλων των ενώσεων που εξετάστηκαν ξεχωριστά. Οι συγκεντρώσεις που χρησιμοποιήθηκαν (5.5 g L^{-1} οξικό οξύ, 0.25 g L^{-1} ακετοσυρινγκόνη, 1.4 g L^{-1} φορμικό οξύ, 1 g L^{-1} φουρφουράλη, 0.25 g L^{-1} φουροϊκό οξύ, 0.1 g L^{-1} γουαϊακόλη, 0.2 g L^{-1} φαινόλη, 0.5 g L^{-1} βανιλικό οξύ και 3 g L^{-1} 5-υδροξύ-μέθυλο-φουρφουράλη) είναι αντίστοιχες εκείνων που εμφανίζονται σε διάφορες διεργασίες προκατεργασίας (Πίνακας 3.1).

Όπως φαίνεται στο Σχήμα 3.2, όπου παρουσιάζεται το διάγραμμα παραγωγής αιθανόλης σε γλυκόζη 40 g/L, η παρουσία όλων των παρεμποδιστικών ενώσεων στο μέσο καλλιέργειας οδήγησε σε μείωση της μέγιστης παραγωγής αιθανόλης κατά 50%, ενώ η παραγωγικότητα σε αιθανόλη μειώθηκε κατά 35%. Συγκριτικά με τα αποτελέσματα των ζυμώσεων με τον κάθε παρεμποδιστή ξεχωριστά, φαίνεται πως το οξικό οξύ είναι πιθανόν ο καθοριστικός παρεμποδιστικός παράγοντας.



Σχήμα 3.2: Παραγωγή αιθανόλης από τον *F. oxysporum* παρουσία 9 παρεμποδιστικών ενώσεων. Υπόστρωμα γλυκόζη 40 g/L. (▲): Χωρίς παρεμποδιστές, (●) Με προσθήκη παρεμποδιστών.

3.4 Επίδραση παρεμποδιστών στο ενζυμικό σύστημα (κυτταρινολυτικό - ημικυτταρινολυτικό) του *F. oxysporum*

Η δράση του μύκητα *F. oxysporum* βασίζεται εκτός από την ικανότητά του να μεταβολίζει τα ελεύθερα σάκχαρα σε αιθανόλη και στην ικανότητα των ενζύμων που παράγει να υδρολύουν αποδοτικά τα υποστρώματα προς αιθανόλη (Christakopoulos et al., 1991 ; Panagiotou et al., 2003 ; Panagiotou et al., 2005a ; Xiros et al., 2009).

Για να μελετηθεί η επίδραση των παρεμποδιστικών ενώσεων στη δράση του ενζυμικού συστήματος του μύκητα, πραγματοποιήθηκαν υδρολύσεις παρουσία των ανωτέρω παρεμποδιστικών ουσιών. Το εύρος συγκεντρώσεων που μελετήθηκε για τις ενώσεις βασίζεται σε προηγούμενες μελέτες που αφορούν στην επίδραση της παρεμπόδισης τέτοιων ενώσεων στα υδρολυτικά ένζυμα του *Penicillium brasilianum* (Panagiotou and Olsson, 2007) και στον χαρακτηρισμό των ενώσεων που παράγονται κατά την υγρή οξείδωση του άχυρου σίτου (Klinke et al., 2003).

Για την μέτρηση της κυτταρινολυτικής ενεργότητας χρησιμοποιήθηκε το Filter Paper Activity (FPA), η υδρόλυση δηλαδή καθαρής κυτταρίνης με τη μορφή διηθητικού χαρτιού, ενώ για την εκτίμηση της ξυλανολυτικής ενεργότητας εφαρμόστηκε η πρότυπη μέθοδος της ενεργότητας σε υπόστρωμα ξυλάνης. Οι μετρήσεις των ενεργοτήτων πραγματοποιήθηκαν με την προσθήκη του εκάστοτε παρεμποδιστή στο μέσο της αντίδρασης, πριν από την προσθήκη των ενζύμων. Στον Πίνακα 3.3 παρουσιάζονται οι σταθερές παρεμπόδισης (K_i) για τις ουσίες που μελετήθηκαν. Οι σταθερές K_i υπολογίστηκαν από την εξίσωση 2.1, από την οποία προκύπτει πως όσο μικρότερη είναι η τιμή της σταθεράς αυτής τόσο μεγαλύτερη η μείωση στο ρυθμό της αντίδρασης.

Όπως είναι εμφανές και στον Πίνακα 3.3, όλες οι ουσίες που μελετήθηκαν δεν παρουσίασαν σημαντική παρεμπόδιση στην ξυλανολυτική ενεργότητα του ενζυμικού συστήματος, όταν χρησιμοποιήθηκαν στο εύρος συγκεντρώσεων που παράγονται κατά την προκατεργασία των λιγνινοκυτταρινούχων υλικών (Taherzadeh et al., 1997 ; Larsson et al., 1999 ; Thomsen et al., 2009). Εξαίρεση αποτέλεσαν το φουροϊκό οξύ και η φαινόλη, οι οποίες εμφάνισαν παρεμποδιστική δράση στο ενζυμικό σύστημα αλλά μόνο υπό την προσθήκη τους σε πολύ μεγάλες συγκεντρώσεις (πολύ

υψηλότερες από αυτές που εμφανίζονται σε διεργασίες βιομετατροπής της λιγνινοκυτταρίνης σε αιθανόλη).

Πίνακας 3.3: Σταθερές παρεμπόδισης των παρεμποδιστικών ενώσεων στις υδρολυτικές ενεργότητες του *F. oxysporum*.

Παρεμποδιστής	Εύρος συγκεντρώσεων (g L ⁻¹)	K _i Ξυλανάσης (g L ⁻¹)	K _i FPA (g L ⁻¹)
Φουρφουράλη	2 - 20	4.55	2.81
5-HMF	1 - 15	8.45	5.25
2-φουροϊκό οξύ	0.3 - 3	0.79	0.7
Οξικό οξύ	0.1 - 10	χ.π.	χ.π.
Μυρμηκικό οξύ	0.1 - 15	χ.π.	9.5
Φαινόλη	0.5 - 5	3.15	1.13
Γουαϊακόλη	0.45 - 4.5	3.41	3.42
Ακέτοσυρινγκόνη	0.6 - 6	4.23	4.13
Βανιλικό οξύ	1.25 - 12.5	2.51	1.74

* χ.π.: χωρίς παρεμπόδιση

Τα ανωτέρω αποτελέσματα συμφωνούν με αυτά των Panagiotou and Olsson (2007), οι οποίοι μελέτησαν την επίδραση αντίστοιχων ουσιών στην ενζυμική δράση του *P. brasilianum* καθώς και στην ημικυτταρινολυτική δράση του εμπορικού ενζυμικού συστήματος Celluclast 1.5 L FG και Novozym 188 (3:1). Παρατήρησαν ότι μόνο το μυρμηκικό οξύ παρεμπόδισε την ξυλανολυτική δράση σε συγκέντρωση 15 g L⁻¹. Με βάση τα παραπάνω μπορούμε να υποθέσουμε πως μόνο το φουροϊκό οξύ και η φαινόλη μπορεί

να εμφανίσουν παρεμποδιστική δράση στην υδρόλυση της ημικυτταρίνης από τα ένζυμα του *F. oxysporum*.

Σε αντίθεση με την ημικυτταρινολυτική δράση, η κυτταρινολυτική δράση (FPA) των ενζύμων εμφανίστηκε να επηρεάζεται από την παρουσία των παρεμποδιστών (Πίνακας 3.3). Σε όλες τις περιπτώσεις που μελετήθηκαν, οι τιμές K_i ήταν μικρότερες από τις αντίστοιχες για την ημικυτταρινολυτική δράση. Όσον αφορά στα οργανικά οξέα, το φυροϊκό οξύ εμφάνισε παρεμπόδιση στη δράση των ενζύμων, όταν προστέθηκε στο μέσο της αντίδρασης σε συγκεντρώσεις μεγαλύτερες από 3 g L^{-1} . Αντίθετα, το οξικό οξύ δεν εμφάνισε παρεμποδιστική δράση. Επιπροσθέτως, οι φαινολικές ενώσεις που χρησιμοποιήθηκαν παρουσίασαν αρνητική επίδραση στην κυτταρινολυτική δράση (Πίνακας 3.3). Η γουαϊακόλη και η ακετοσυρινγκόνη παρεμπόδισαν την κυτταρινολυτική δράση για συγκεντρώσεις μεγαλύτερες των 3 g L^{-1} και 2.5 g L^{-1} αντίστοιχα. Η φαινόλη και το βανιλικό οξύ είχαν αντίστοιχη επίδραση αλλά για συγκεντρώσεις μεγαλύτερες του 1 g L^{-1} .

Με βάση τα παραπάνω, συμπεραίνεται ότι το ενζυμικό σύστημα του μύκητα *F. oxysporum* παρεμποδίζεται από τις ενώσεις που σχηματίζονται κατά την προκατεργασία της λιγνινοκυτταρίνης, όπως και το εμποδικό ενζυμικό σύστημα Celluclast 1.5 L FG και Novozym 188 (3:1). Ωστόσο, στις περισσότερες περιπτώσεις τα ένζυμα του *F. oxysporum* εμφανίζονται περισσότερο ανθεκτικά από εκείνα του *P. brasilianum* (Panagiotou and Olsson, 2007).

3.5 Συμπεράσματα

Με βάση όλα τα παραπάνω συμπεραίνεται ότι η αερόβια ανάπτυξη του μύκητα *F. oxysporum* δεν παρεμποδίζεται σε μεγάλο βαθμό από τις παρεμποδιστικές ενώσεις, όταν αυτές προστίθενται στο σύστημα σε ήπιες συγκεντρώσεις και στο εύρος που εμφανίζονται σε διεργασίες προκατεργασίας της λιγνινοκυτταρίνης. Οι παρεμποδιστικές ενώσεις που μελετήθηκαν επηρεάζουν την ανάπτυξη βιομάζας από το μύκητα, όταν προστεθούν στο μέσο καλλιέργειας σε αρκετά μεγαλύτερες συγκεντρώσεις. Επιπλέον, το ενζυμικό σύστημα που παράγει ο μύκητας αποδεικνύεται σταθερό και σχετικά ανθεκτικό στην παρουσία ενώσεων όπως τα παράγωγα του φουρανίου, οι φαινολικές ενώσεις και τα καρβοξυλικά οξέα. Όπως και στη φάση ανάπτυξης έτσι και στην υδρόλυση απαιτείται η προσθήκη υψηλών συγκεντρώσεων για να παρουσιαστεί σημαντική παρεμπόδιση. Αντιθέτως, η απόδοση του μύκητα στην παραγωγή αιθανόλης επηρεάζεται από την παρουσία των παρεμποδιστών, ειδικότερα των ασθενών οργανικών οξέων. Όταν οι παρεμποδιστικές ενώσεις προστέθηκαν συγκεντρωτικά στο μέσο καλλιέργειας, κατά την παραγωγή αιθανόλης, η απόδοση σε αιθανόλη μειώθηκε σχεδόν 50%. Αυτό δείχνει ότι η συνεργιστική δράση των ενώσεων δεν πρέπει να παραβλέπεται. Συγκεντρωτικά, από τα παραπάνω αποδεικνύεται ότι ο μύκητας *F. oxysporum* θα μπορούσε να χρησιμοποιηθεί για την αξιοποίηση υδρολυμάτων που παράγονται κατά την προκατεργασία (κυρίως υδροθερμική) της λιγνινοκυτταρίνης. Τα παραπάνω αποτελέσματα δεν μπορούν με βεβαιότητα να οδηγήσουν στο συμπέρασμα της αποδοτικής μετατροπής υδρολυμάτων, πλούσιων σε παρεμποδιστές, από το μύκητα *F. oxysporum*. Αφού αυτά τα υδρολύματα αποτελούν πολύπλοκα συστήματα, όπου οι συνολικές συνεργιστικές δράσεις μπορεί να έχουν εντονότερες επιδράσεις.

4. Επίδραση της αιθανόλης στο μεταβολικό και το ενζυμικό σύστημα του *F. oxysporum*

Παρόλο που έχει γίνει εκτενής βιβλιογραφική αναφορά και μελέτη τόσο της υδρολυτικής ικανότητας του μύκητα *F. oxysporum* όσο και της ικανότητάς του να παράγει αιθανόλη, είναι ελάχιστες οι μελέτες που έχουν πραγματοποιηθεί και αφορούν στην αντοχή και την επίδραση της αιθανόλης στον μεταβολισμό και στο ενζυμικό σύστημα του μύκητα. Παλαιότερες μελέτες αναφέρουν την ανθεκτικότητα του *F. oxysporum* στην αιθανόλη, αλλά βασίζονται μόνο στην ενδογενώς παραγμένη αιθανόλη από τη μύκητα (Suihko, 1983 ; Enari and Suihko, 1983 ; Singh and Kumar, 1991). Πρόσφατα, οι Hennessy et al. (2013) έδειξαν ότι είναι δυνατή η γενετική μετατροπή για τη δημιουργία φαινοτυπικής πολυπλοκότητας στο στελέχος *F. oxysporum* 11C, όσον αφορά στην απόκριση του στελέχους στην παρουσία αιθανόλης. Η ίδια έρευνα κατέδειξε την ανάγκη για περαιτέρω μελέτη της ανθεκτικότητας του μύκητα στην αιθανόλη.

Εδώ γίνεται μια προσπάθεια να μελετηθεί για πρώτη φορά η επίδραση της αιθανόλης τόσο στον μεταβολισμό (αερόβια ανάπτυξη και ζύμωση) όσο και στις λιγνινοκυτταρινολυτικές ενεργότητες του μύκητα *F. oxysporum*.

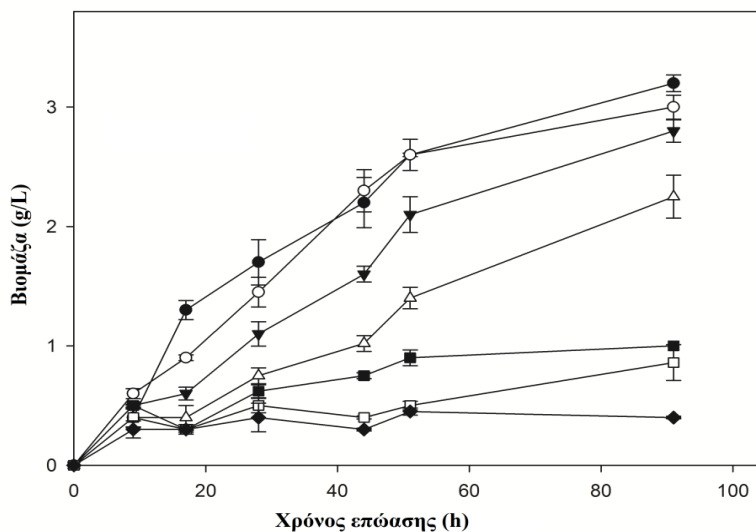
4.1 Αερόβια ανάπτυξη του μύκητα *F.oxysporum* παρουσία αιθανόλης

Για την αξιολόγηση του *F. oxysporum* ως πιθανού μικροοργανισμού για την αξιοποίησή του σε διεργασίες ταυτόχρονης σακχαροποίησης και ζύμωσης (SSF) ή/και ενοποιημένες διεργασίες βιομετατροπής, μελετήθηκε η ικανότητά του να παράγει βιομάζα υπό την παρουσία αιθανόλης στο μέσο ανάπτυξης. Συγκεντρώσεις αιθανόλης από 0 έως 60 g L⁻¹ προστέθηκαν στο μέσο καλλιέργειας πριν από τον εμβολιασμό του μικροοργανισμού. Η

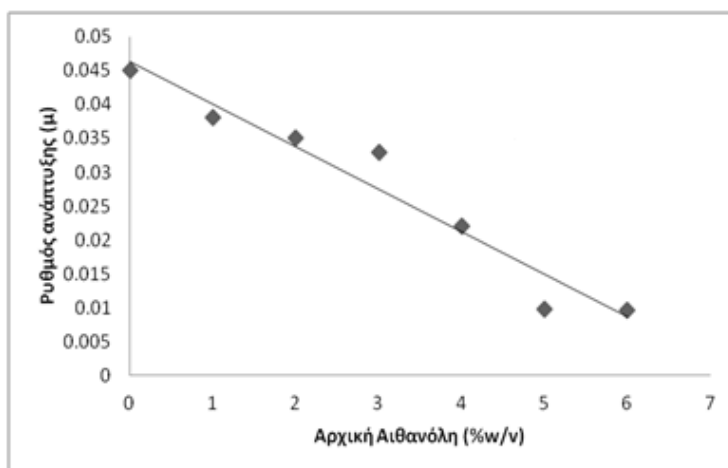
ανάπτυξη και η κατανάλωση υποστρώματος μελετήθηκαν για χρονικό διάστημα 5 ημερών. Ως πηγή άνθρακα χρησιμοποιήθηκαν τα δύο βασικά προϊόντα υδρόλυσης της λιγνινοκυτταρίνης, η γλυκόζη και η ξυλόζη (20 g/L). Η επίδραση της αιθανόλης στην ανάπτυξη με γλυκόζη ως υπόστρωμα ήταν εμφανής ακόμα και 15 ώρες μετά τον εμβολιασμό, ενώ τα αποτελέσματα της αιθανόλης μεγιστοποιήθηκαν στο δεύτερο εικοσιτετράωρο της ανάπτυξης (περίπου 44 ώρες μετά τον εμβολιασμό).

Στο Σχήμα 4.1 παρουσιάζεται η αύξηση της βιομάζας με το χρόνο. Όπως παρατηρείται, η μέγιστη βιομάζα που παράγεται μειώνεται αυξανόμενης της αρχικής ποσότητας αιθανόλης. Η παρουσία 30 g L⁻¹ αιθανόλης οδηγεί σε ποσοστό ανάπτυξης 77% σε σχέση με την καλλιέργεια αναφοράς, ενώ παρουσιάζεται δραματική μείωση της παραγόμενης βιομάζας για αιθανόλη 40 g L⁻¹. Τέλος, δεν φαίνεται να υπάρχει ανάπτυξη του μύκητα για αρχική συγκέντρωση αιθανόλης πάνω από 50 g L⁻¹.

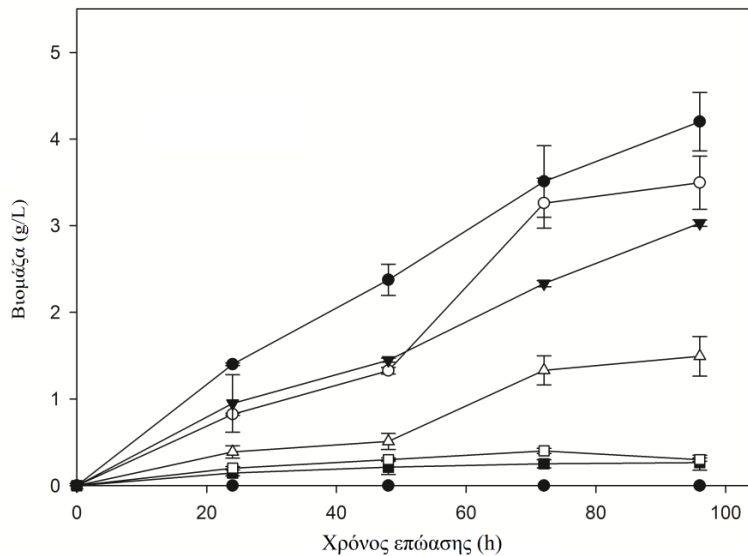
Η παρεμποδιστική δράση της αιθανόλης παρουσιάζεται εντονότερη όταν ως πηγή άνθρακα χρησιμοποιείται η ξυλόζη. Στο Σχήμα 4.3 φαίνεται ότι για την ανάπτυξη σε ξυλόζη, η παραγωγή βιομάζας μειώνεται σημαντικά για αρχική συγκέντρωση αιθανόλης 30 g L⁻¹. Επιπλέον, δεν παρατηρείται καθόλου ανάπτυξη όταν η αρχική αιθανόλη στο μέσο καλλιέργειας ξεπερνά τα 40 g L⁻¹.



Σχήμα 4.1: Επίδραση της αιθανόλης στην αερόβια ανάπτυξη του *F. oxysporum* σε γλυκόζη (20 g/L) - χωρίς αιθανόλη (●), 1% β/ο αρχική αιθανόλη (○), 2% β/ο αρχική αιθανόλη (▼), 3% β/ο αρχική αιθανόλη (Δ), 4% w/ αρχική αιθανόλη (■), 5% β/ο αρχική αιθανόλη (□), 6% β/ο αρχική αιθανόλη (◆).



Σχήμα 4.2: Ειδικός ρυθμός ανάπτυξης του μύκητα παρουσία αιθανόλης και με πηγή άνθρακα τη γλυκόζη (20 g/L).



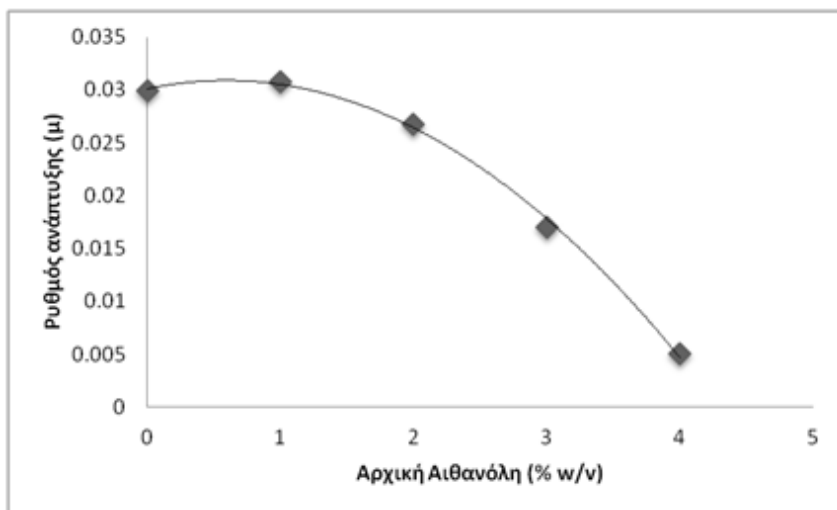
Σχήμα 4.3: Επίδραση της αιθανόλης στην αερόβια ανάπτυξη του *F. oxysporum* σε ξυλόζη (20 g/L) - χωρίς αιθανόλη (●), 1% β/ο αρχική αιθανόλη (○), 2% β/ο αρχική αιθανόλη (▼), 3% β/ο αρχική αιθανόλη (Δ), 4% β/ο αρχική αιθανόλη (■), 5% β/ο αρχική αιθανόλη (□), 6% β/ο αρχική αιθανόλη (◆).

Η παρεμποδιστική δράση της αιθανόλης δεν αποτυπώνεται μόνο στην παραγωγή βιομάζας αλλά και στον ρυθμό ανάπτυξης. Όπως παρουσιάζεται στα Σχήματα 4.2 και 4.4, ο ειδικός ρυθμός ανάπτυξης μειώνεται σημαντικά όσο η συγκέντρωση αιθανόλης στο μίγμα αυξάνεται. Για να μπορέσει να γίνει μια πιο πλήρης περιγραφή της κινητικής της αναστολής της κυτταρικής ανάπτυξης παρουσία αιθανόλης, χρησιμοποιήθηκε το κινητικό μοντέλο που παρουσιάστηκε από τον Luong (1985) (Εξίσωση 4).

$$\frac{\mu_i}{\mu_0} = 1 - \left(\frac{P}{P_m}\right)^\alpha \quad [\text{Εξ. 4}]$$

Όπου: μ_0 και μ_i οι ειδικοί ρυθμοί ανάπτυξης απουσία (μ_0) και παρουσία αιθανόλης (μ_i) στο μέσο καλλιέργειας αντίστοιχα. Ως P_m ορίζεται η κρίσιμη συγκέντρωση αιθανόλης πάνω από την οποία ο μικροοργανισμός δεν

αναπτύσσεται. Η σχέση που συνδέει τον ειδικό ρυθμό ανάπτυξης και την κρίσιμη συγκέντρωση αιθανόλης εκφράζεται από τον «δείκτη αντοχής στην αιθανόλη» «α» (Luong, 1985).



Σχήμα 4.4: Ειδικός ρυθμός ανάπτυξης του μύκητα παρουσία αιθανόλης και πηγή άνθρακα την ξυλόζη (20 g/L).

Με βάση τα παραπάνω πειραματικά αποτελέσματα για την ανάπτυξη του *F. oxysporum* παρουσία αιθανόλης, υπολογίστηκαν οι τιμές P_m και α . Προέκυψαν οι τιμές 7.2% (β/o) και 1.05 για την P_m και τον α αντίστοιχα, όταν χρησιμοποιήθηκε γλυκόζη ως πηγή άνθρακα, ενώ εξάχθηκαν οι τιμές $P_m = 3.8\%$ (β/o) και $\alpha = 2.5$ όταν ο μύκητας αναπτύχθηκε σε ξυλόζη.

Τα αποτελέσματα του μοντέλου συμπίπτουν και με τα πειραματικά δεδομένα που εξήχθησαν παραπάνω. Με τη λύση της γραμμικής εξίσωσης που προκύπτει για τη συσχέτιση του ρυθμού ανάπτυξης με την αρχική συγκέντρωση αιθανόλης, προκύπτει πως ο ρυθμός γίνεται μηδενικός για αρχική συγκέντρωση αιθανόλης 7.35 % β/o , πολύ κοντά στην τιμή 7.2% του μοντέλου. Οι αντίστοιχες τιμές για ανάπτυξη σε ξυλόζη είναι 4.5% και 3.8%.

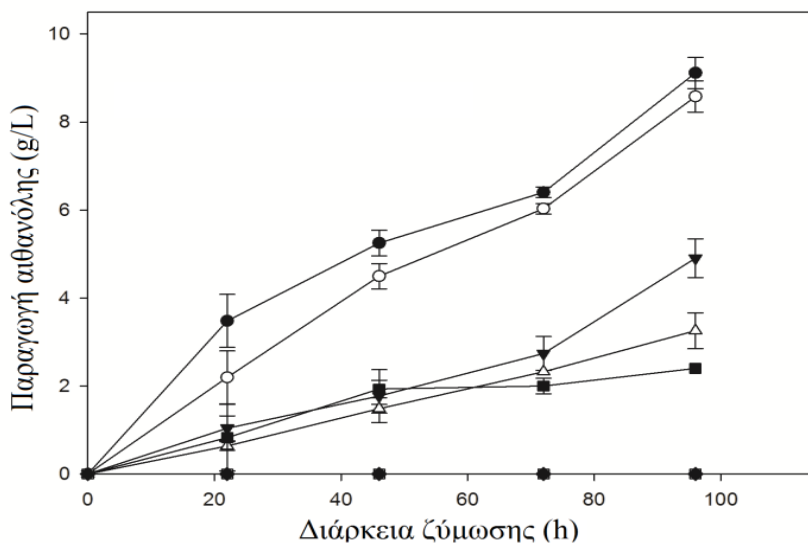
Τέλος, στον Πίνακα 4.1 φαίνεται η επίδραση της αιθανόλης στην λανθάνουσα φάση για την ανάπτυξη του μύκητα. Είναι φανερό ότι ο χρόνος προσαρμογής του μικροοργανισμού αυξάνεται αυξανόμενης της αιθανόλης.

Πίνακας 4.1: Επίδραση αιθανόλης στο ρυθμό ανάπτυξης και τη λανθάνουσα φάση στην αερόβια ανάπτυξη του *F oxysporum*.

Αρχική Αιθανόλη (% β/ο)	0	1	2	3	4	5	6
Ανάπτυξη σε γλυκόζη							
Λανθάνουσα φάση (h)	9	9	17	28	44	--	--
Ανάπτυξη σε ξυλόζη							
Λανθάνουσα φάση (h)	9	9	18	48	--	--	--

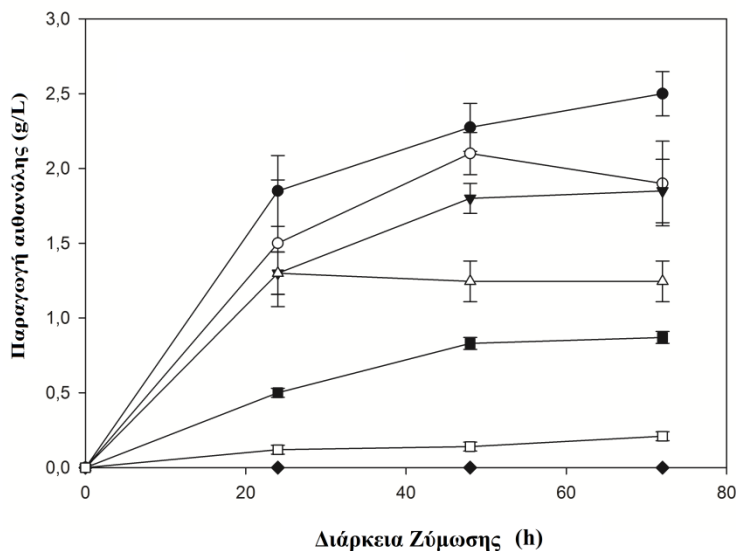
4.2 Παραγωγή αιθανόλης από το μύκητα *F.oxysporum* παρουσία αιθανόλης

Για να γίνει μελέτη της επίδρασης της αιθανόλης στην ικανότητα του *F. oxysporum* να μεταβολίζει τα σάκχαρα σε αιθανόλη, ο μικροοργανισμός αναπτύχθηκε αερόβια σε βυθισμένες καλλιέργειες και στη συνέχεια οι καλλιέργειες μετατράπηκαν σε αναερόβιες με την ταυτόχρονη προσθήκη αιθανόλης στο μέσο. Στην αρχή της ζύμωσης χρησιμοποιήθηκαν συγκεντρώσεις αιθανόλης μέχρι και 6% β/ο. Στα Σχήματα 4.5 και 4.6 παρουσιάζεται η καθαρή παραγωγή αιθανόλης από τον μύκητα με γλυκόζη ή ξυλόζη (20 g/L) ως πηγή άνθρακα αντίστοιχα.



Σχήμα 4.5: Επίδραση της αιθανόλης στην αναερόβια ζύμωση της γλυκόζης (20 g/L) από τον *F. oxysporum* - χωρίς αιθανόλη (●), 1% β/ο αρχική αιθανόλη (○), 2% β/ο αρχική αιθανόλη (▼), 3% β/ο αρχική αιθανόλη (Δ), 4% β/ο αρχική αιθανόλη (■), 5% β/ο αρχική αιθανόλη (□), 6% β/ο αρχική αιθανόλη (◆).

Αξίζει να σημειωθεί ότι η συνολική συγκέντρωση αιθανόλης στην οποία τα κύτταρα ήταν εκτεθειμένα σε αυτή τη φάση, είναι το άθροισμα της αρχικής αιθανόλης και αυτής που παράχθηκε κατά τη ζύμωση. Τα πειραματικά αποτελέσματα με βάση τη γλυκόζη ως πηγή άνθρακα δείχνουν ότι τόσο ο ρυθμός παραγωγής όσο και η τελική συγκέντρωση της παραχθείσας αιθανόλης επηρεάστηκαν από την αρχική προσθήκη της αλκοόλης στο μέσο. Όπως φαίνεται και στο Σχήμα 4.5, η προσθήκη 2%, 3% και 4% β/ο αιθανόλης στο μέσο καλλιέργειας οδήγησε σε μείωση κατά 46%, 65% και 74% αντίστοιχα της καθαρής παραχθείσας αιθανόλης. Επιπλέον, δεν μετρήθηκε παραγωγή αιθανόλης για αρχικές συγκεντρώσεις προστιθέμενης αιθανόλης μεγαλύτερες του 5% β/ο.



Σχήμα 4.6: Επίδραση της αιθανόλης στη αναερόβια ζύμωση της ξυλόζης (20 g/L) από τον *F. oxysporum* - χωρίς αιθανόλη (●), 1% β/ο αρχική αιθανόλη (○), 2% β/ο αρχική αιθανόλη (▼), 3% β/ο αρχική αιθανόλη (Δ), 4% β/ο αρχική αιθανόλη (■), 5% β/ο αρχική αιθανόλη (□), 6% β/ο αρχική αιθανόλη (◆).

Όσον αφορά στη χρησιμοποίηση της ξυλόζης ως πηγή άνθρακα (Σχήμα 4.6), μετρήθηκε μείωση της παραγωγής αιθανόλης κατά 26%, 50% και 68% όταν προστέθηκε 2%, 3% και 4% β/ο αιθανόλη αντίστοιχα στην καλλιέργεια. Τέλος, ούτε και στην περίπτωση της ξυλόζης, όπως και στις γλυκόζης, μετρήθηκε παραγωγή αιθανόλης για αρχικές συγκεντρώσεις μεγαλύτερες του 5% (β/ο).

Τα αποτελέσματα της παρούσας μελέτης δείχνουν ότι η απόκριση του *F. oxysporum* στην παρουσία αιθανόλης μπορεί να συγκριθεί με εκείνη άλλων μικροοργανισμών που χρησιμοποιούνται για την παραγωγή βιοαιθανόλης. Ειδικότερα, εκείνων των μικροοργανισμών που είναι ικανοί να μεταβολίζουν την ξυλόζη σε αιθανόλη. Μελέτες στον *Pichia stipites* έδειξαν ότι δεν παρατηρήθηκε αερόβια ανάπτυξη του μικροοργανισμού για αρχικές

συγκεντρώσεις αιθανόλης μεγαλύτερες του 3.5% β/ο, με χρήση είτε γλυκόζης είτε ξυλόζης ως πηγή άνθρακα (Meyrial et al., 1995 ; Lee et al., 2000). Στην ίδια μελέτη δεν μετρήθηκε παραγωγή αιθανόλης υπό την προσθήκη 3.5% β/ο αρχικής συγκέντρωσης αλκοόλης. Παρομοίως, η ανάπτυξη του *Kloeckera africana* σε Agave (χυμός τεκίλας) και σε συγκεντρώσεις μεγαλύτερες του 2.5% β/ο, συσχετίστηκε με μειωμένη παραγωγή βιομάζας (Diaz-Montano et al., 2010). Η έρευνα των Bajpai and Margaritis (1982) στον μύκητα *Kluyveromyces marxianus* έδειξε ότι η αιθανόλη προκάλεσε παρεμπόδιση στην αερόβια ανάπτυξη και στην ικανότητα παραγωγής αιθανόλης. Στη συγκεκριμένη έρευνα αποδείχθηκε ότι η παρουσία της αιθανόλης επιδρά σημαντικότερα στους ρυθμούς ανάπτυξης και ζύμωσης. Οι αποδόσεις σε κυτταρική βιομάζα και παραγωγή αιθανόλης του συγκεκριμένου μικροοργανισμού δεν επηρεάστηκαν από την παρουσία αιθανόλης. Τα αποτελέσματα της προαναφερθείσας μελέτης έρχονται σε συμφωνία με τα αποτελέσματα της παρούσας διατριβής, όπου παρουσιάζεται μια αρνητική γραμμική συσχέτιση του ειδικού ρυθμού ανάπτυξης και της αρχικής συγκέντρωσης σε αιθανόλη.

Τα αποτελέσματα της παρουσίας αιθανόλης στην βιομάζα του *F. oxysporum* ήταν πιο έντονα όταν χρησιμοποιήθηκε η ξυλόζη ως πηγή άνθρακα. Εν αντιθέσει, η παρεμπόδιση ήταν ισχυρότερη στην παραγωγή αιθανόλης όταν χρησιμοποιήθηκε γλυκόζη ως πηγή άνθρακα. Η διαφορά αυτή μπορεί να εξηγηθεί από το γεγονός ότι με τη χρήση της γλυκόζης ως πηγή άνθρακα στο αναερόβιο στάδιο, προκύπτει μεγαλύτερη συγκέντρωση παραγόμενης αιθανόλης. Παρόλο που η καθαρή παραχθείσα αιθανόλη δεν ξεπερνά τα 9 g L^{-1} πρέπει να ληφθεί υπόψη η συνολική συγκέντρωση αιθανόλης. Επιπροσθέτως, έχει αναφερθεί σε παλαιότερες έρευνες ότι η ενδογενώς παραγόμενη αιθανόλη έχει εντονότερα τοξικά αποτελέσματα από όταν αυτή προστίθεται στο μέσο καλλιέργειας (Casey and Ingledew, 1985 ;

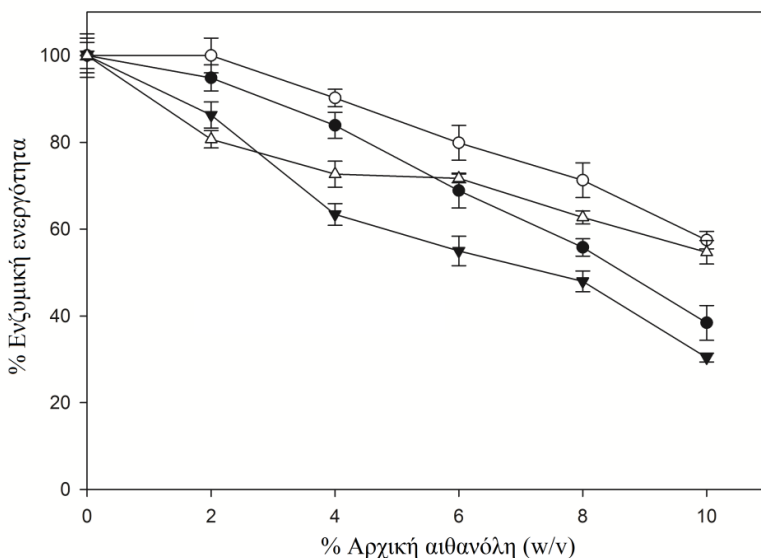
Du Preez et al., 1987). Επιπλέον, μελέτες έχουν δείξει την συσσωρευτική τοξική δράση της αιθανόλης και άλλων παραπροϊόντων της ζύμωσης, όπως τα οργανικά οξέα (Dombek and Ingram, 1986 ; Woo et al., 2014).

4.3 Επίδραση της αιθανόλης στον ενζυμικό σύστημα του *F. oxysporum*

Πέραν της ικανότητάς του να μεταβολίζει τα σάκχαρα σε αιθανόλη, ο *F. oxysporum* εκκρίνει και μια πληθώρα κυτταρινολυτικών και ημικυτταρινολυτικών ενζύμων (Christakopoulos et al., 1991 ; Christakopoulos et al., 1995 ; Christakopoulos et al., 1996 ; Xiros et al., 2009). Αυτά τα ένζυμα μπορούν να αξιοποιηθούν σε διεργασίες ταυτόχρονης σακχαροποίησης και ζύμωσης, μειώνοντας την ανάγκη για εξωγενώς προστιθέμενα εμπορικά ένζυμα και μετριάζοντας έτσι το κόστος της διεργασίας. Για να μελετηθεί η δυνατότητα χρήσης αυτών των ενζύμων θα πρέπει να αξιολογηθεί και η επίδραση της αιθανόλης (του κύριου προϊόντος της ζύμωσης) σε αυτά. Να σημειωθεί πως έχει γίνει ήδη σε προηγούμενο κεφάλαιο μελέτη της επίδρασης διαφόρων παρεμποδιστικών ενώσεων που μπορεί να εμφανιστούν σε λιγνινοκυτταρινούχα υδρολύματα. Στο παρόν τμήμα της μελέτης μετρήθηκαν οι κυτταρινολυτικές (Filter Paper Activity) και ημικυτταρινολυτικές ενεργότητες του συστήματος παρουσία αιθανόλης. Για να αξιολογηθούν τα αποτελέσματα πραγματοποιήθηκαν πειράματα αναφοράς με τη χρήση του εμπορικού ενζυμικού σκευάσματος (Celluclast 1,5L - Novozyme 188, αναλογία: 5/1).

Τα αποτελέσματα παρουσιάζονται συγκεντρωτικά στα Σχήματα 4.7 και 4.8. Οι μετρήσεις ενζυμικών ενεργοτήτων πραγματοποιήθηκαν σε δύο θερμοκρασίες, στους 30 °C και 50 °C. Η πρώτη είναι η θερμοκρασία που πραγματοποιούνται κατά κύριο λόγο οι διεργασίες ταυτόχρονης σακχαροποίησης και ζύμωσης ή οι ενοποιημένες βιοδιεργασίες, ενώ η

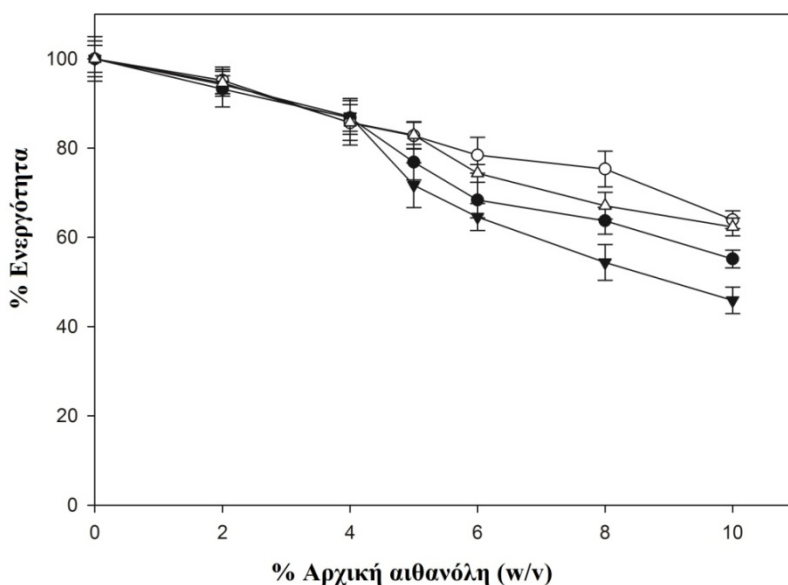
δεύτερη είναι η ορισμένη θερμοκρασία μέτρησης των λιγνινοκυτταρινολυτικών ενεργοτήτων. Αρχικά, στους 30 °C και ειδικότερα για συγκεντρώσεις αιθανόλης έως 2 % β/ο, η κυτταρινολυτική ενεργότητα του συστήματος δεν επηρεάστηκε σε μεγάλο βαθμό (Σχήμα 4.7).



Σχήμα 4.7: Επίδραση της αιθανόλης στις κυτταρινολυτικές ενεργότητες. Σύγκριση των ενζύμων του *F. oxysporum* με το εμπορικό μίγμα Celluclast 1,5L - Novozyme 188. Ένζυμα του *F. oxysporum* στους 50 °C (▼) και στους 30 °C (△) - Εμπορικά ένζυμα στους 50 °C (●) και στους 30 °C (○).

Επιπλέον, παρά την εμφανή μείωση της ενεργότητας σε μεγαλύτερες συγκεντρώσεις αιθανόλης (6% και 8% (β/ο)), η απομένουσα ενεργότητα παραμένει σε αρκετά ικανοποιητικά επίπεδα (72% και 63% της αρχικής αντίστοιχα). Αντιθέτως, όπως θα ήταν αναμενόμενο, παρουσία αιθανόλης είχε εντονότερη επίδραση στην FPA για θερμοκρασία 50 °C. Σε αυτή τη θερμοκρασία η εναπομείνουσα ενεργότητα μετρήθηκε στο 64% και 47% της αρχικής, για συγκεντρώσεις αιθανόλης 6% (β/ο) και 8% (β/ο) αντίστοιχα. Η μέγιστη παρεμποδιστική δράση της αιθανόλης εμφανίστηκε, όπως ήταν

αναμενόμενο, στη μεγαλύτερη αρχική συγκέντρωση αλκοόλης που μελετήθηκε (10% β/ο), όπου το ενζυμικό σύστημα απώλεσε 50% και 70% της ενεργότητας του στους 30 °C και 50 °C αντίστοιχα. Αντίστοιχη τάση στην μείωση της ενεργότητάς τους παρουσία αιθανόλης εμφάνισαν και τα εμπορικά ένζυμα, στις δύο θερμοκρασίες που μελετήθηκαν (Σχήμα 4.7).

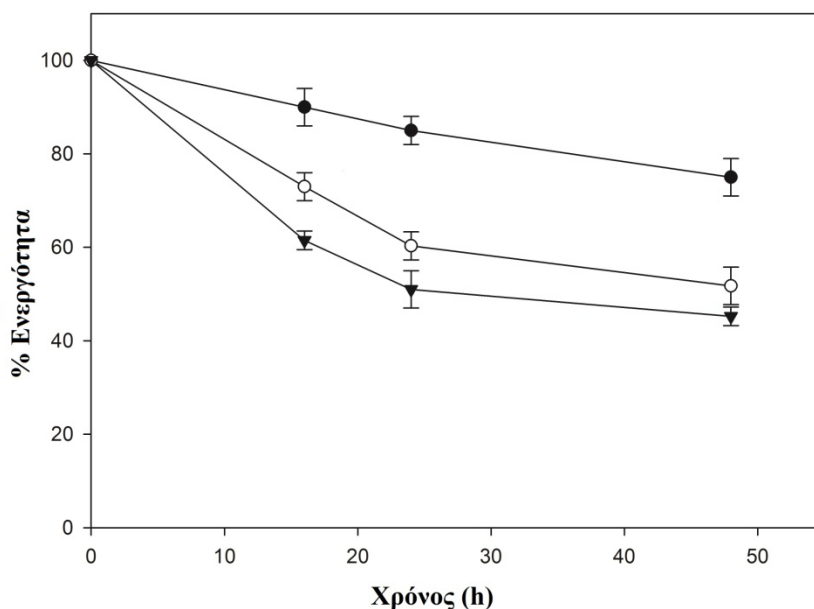


Σχήμα 4.8: Επίδραση της αιθανόλης στις ημικυτταρινολυτικές ενεργότητες. Σύγκριση των ενζύμων του *F. oxysporum* με το εμπορικό μίγμα Celluclast 1,5L - Novozyme 188. Ένζυμα του *F. oxysporum* στους 50 °C (▼) και στους 30°C (Δ) - Εμπορικά ένζυμα στους 50 °C (●) και στους 30 °C (○).

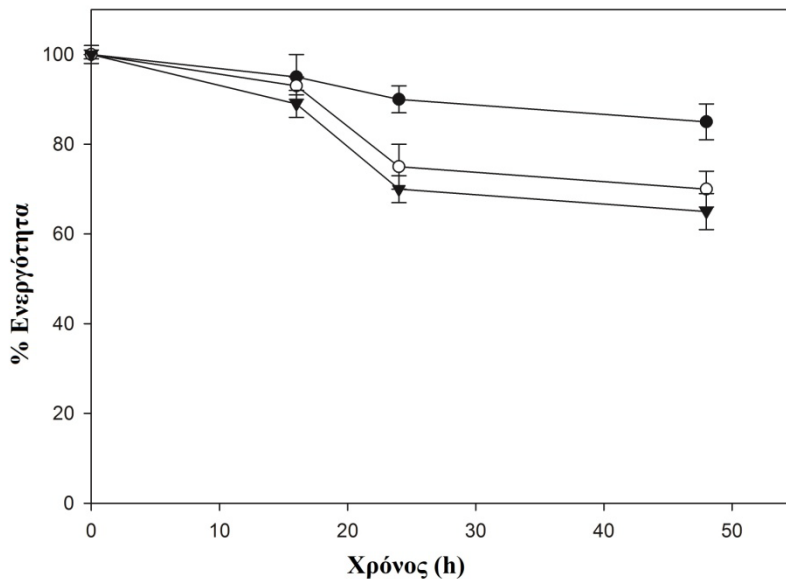
Η παρεμποδιστική δράση της αιθανόλης στην ξυλανολυτική ενεργότητα παρουσιάζεται στο Σχήμα 4.8. Παρόμοια με την FPA οι ημικυτταρινάσες του *F. oxysporum* επηρεάστηκαν περισσότερο στους 50 °C. Αξίζει να σημειωθεί πως για συγκεντρώσεις αιθανόλης έως και 4% β/ο, η επίδραση της αιθανόλης στα ένζυμα του *F. oxysporum* ταυτίζεται με αυτή των εμπορικών ενζύμων. Ενώ, για μεγαλύτερες συγκεντρώσεις τα εμπορικά

ένζυμα διατήρησαν την ενεργότητά τους κατά 5% - 10% περισσότερο από αυτά του *F. oxysporum*.

Ένας άλλος παράγοντας που πρέπει να μελετηθεί και αφορά στην καταλληλότητα των ενζύμων για διεργασίες παραγωγής βιοαιθανόλης, είναι η σταθερότητα τους παρουσία αιθανόλης. Διότι σε τέτοιες διεργασίες τα ενζυμικά συστήματα υπόκεινται σε αυξημένες συγκεντρώσεις αιθανόλης για μεγάλα χρονικά διαστήματα. Συγκριτικά με τις πρότυπες μεθόδους μέτρησης ενζυμικών ενεργοτήτων που εφαρμόστηκαν προηγουμένως (1 ώρα), στις διεργασίες βιομετατροπής η χρονική διάρκεια είναι πολύ μεγαλύτερη. Έτσι, πραγματοποιήθηκαν πειράματα σύγκρισης του ενζυμικού συστήματος του *F. oxysporum* και των εμπορικών ενζύμων στους 30 °C υπό την παρουσία 25 g L⁻¹ και 50 g L⁻¹ αιθανόλης. Τα αποτελέσματα παρουσιάζονται στα Σχήματα 4.9 και 4.10.



Σχήμα 4.9: Επίδραση της αιθανόλης στη σταθερότητα των ενζύμων του *F. oxysporum*. Τα ένζυμα του *F.oxysporum* επωάστηκαν στους 30°C με την προσθήκη 0 g L⁻¹ (●), 25 g L⁻¹ (○) και 50 g L⁻¹ (▼) αιθανόλης.



Σχήμα 4.10: Επίδραση της αιθανόλης στη σταθερότητα των εμπορικών ενζύμων. Τα ένζυμα επώστηκαν στους 30°C με την προσθήκη 0 g L⁻¹ (●), 25 g L⁻¹ (○) και 50 g L⁻¹ (▼) αιθανόλης.

Είναι εμφανές ότι τα εμπορικά ένζυμα εμφανίζουν μεγαλύτερη σταθερότητα σε σχέση με τα ένζυμα του *F. oxysporum*. Το εμπορικό ενζυμικό σύστημα διατήρησε το 70% και 65% της δραστηρότητάς του για χρόνο επώασης 48 ώρες και συγκεντρώσεις αιθανόλης 2.5% και 5% αντίστοιχα. Αντίθετα, για το ίδιο χρονικό διάστημα, τα ένζυμα του μύκητα διατήρησαν το 52% και 45% αντίστοιχα. Όμως, δεν θα πρέπει να παραβλέψουμε το γεγονός ότι στα εμπορικά ένζυμα γίνεται συχνά προσθήκη ουσιών που αυξάνουν τη σταθερότητά τους.

Συγκεντρωτικά, μπορούμε να πούμε ότι το ενζυμικό σύστημα του *F. oxysporum* εμφανίζει ικανοποιητική ανθεκτικότητα στην αιθανόλη. Ειδικότερα, στους 30°C, τη θερμοκρασία των περισσότερων διεργασιών ταυτόχρονης σακχαροποίησης και ζύμωσης, η επίδραση της αιθανόλης στο

ενζυμικό σύστημα ήταν σημαντικά μικρότερη απ' ότι στους 50 °C. Δίνουμε ιδιαίτερη σημασία στους 30 °C, διότι σε αυτή τη θερμοκρασία είναι πιθανό να αξιοποιηθούν βιομηχανικά τα ένζυμα του *F. oxysporum* καθώς επίσης διότι σε αυτή τη θερμοκρασία θα χρησιμοποιηθούν και σε επόμενα πειράματα της παρούσας διατριβής.

Πολλοί λόγοι μπορούν να εξηγήσουν τα παραπάνω αποτελέσματα. Αρκετές έρευνες, που έχουν προηγηθεί, δείχνουν ότι η αιθανόλη μειώνει την δραστηριότητα των κυτταρινασών. Η παρεμπόδισή της είναι θερμοκρασιακά εξαρτώμενη και αυξάνεται αυξανομένης της θερμοκρασίας (Wu and Lee, 1997 ; Jorgensen et al., 2007). Επιπλέον, σε πολλές περιπτώσεις έχει αναφερθεί και η αποσταθεροποιητική δράση της αιθανόλης στα ένζυμα (Ferchak and Pye, 1983 ; Chen and Jin, 2006 ; Jing et al., 2009). Σημειώνεται ότι η αποσταθεροποιητική δράση της αιθανόλης επιταχύνει την αποδόμηση των ενζύμων σε αυξημένες θερμοκρασίες ακόμα και αν σε αυτή τη θερμοκρασία δεν εμφανίζεται αποδόμηση των πρωτεϊνών σε τόσο σύντομο χρονικό διάστημα (στην περίπτωση μας 1 ώρα) (Yoshikawa et al., 2012).

Οι Skovgaard και Jorgensen (2013) αναφέρουν στη μελέτη τους, που αφορά ένα θερμο-ανθεκτικό ενζυμικό παρασκεύασμα, ότι η επίδραση της αιθανόλης στη μείωση της ενζυμικής ενεργότητας αυξανομένης της θερμοκρασίας δεν σχετίζεται τόσο με την παρεμπόδιση των ενζύμων από την αιθανόλη, όσο με την αποδόμηση - αποσταθεροποίηση των ενζύμων.

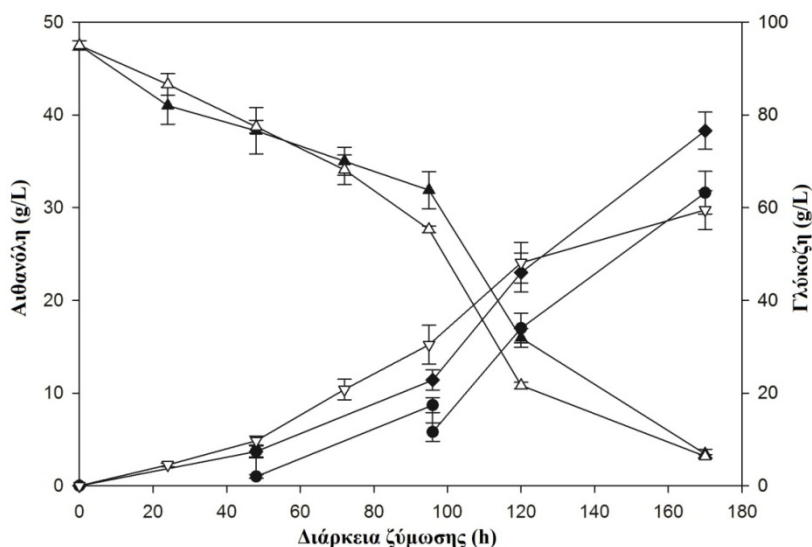
Όπως δείξαμε, η επίδραση της αιθανόλης στο ενζυμικό σύστημα του *F. oxysporum* είναι θερμοκρασιακά εξαρτώμενη. Όμως, όταν η θερμοκρασία του συστήματος παραμένει στους 30 °C, η ενεργότητα των ενζύμων διατηρείται σε υψηλά επίπεδα υπό την παρουσία σημαντικής ποσότητας αιθανόλης. Ακόμα και με την προσθήκη 50 g L⁻¹ αιθανόλης, τα ένζυμα διατήρησαν το 45% της δράσης τους για 48 ώρες. Αυτή η ικανότητα των

ενζύμων του *F. oxysporum* μπορεί να αξιοποιηθεί σε μια ενοποιημένη διεργασία παραγωγής βιοαιθανόλης, όπου ο μύκητας θα μπορέσει να παράγει ενδογενώς σταθερά ένζυμα, μειώνοντας έτσι την ανάγκη για εξωγενή προσθήκη εμπορικών ενζύμων ικανών να συνεχίσουν την σακχαροποίηση καθ' όλη τη διάρκεια της ζύμωσης. Όπως έδειξε και μια άλλη μελέτη, ο *F. oxysporum* χρησιμοποιήθηκε επιτυχώς σε συνδυασμό με τον *S. cerevisiae* για την βιομετατροπή άχυρου σίτου σε αιθανόλη, σε μία διεργασία ταυτόχρονης σακχαροποίησης και ζύμωσης (SSF) (Panagiotou et al., 2011).

4.4 Αφαίρεση της παραγόμενης αιθανόλης από το μέσο καλλιέργειας

Όπως δείξαμε και προηγουμένως (Σχήματα 4.5 και 4.6), η παρουσία αιθανόλης εμφανίζει παρεμποδιστική δράση στην ικανότητα του *F. oxysporum* να μεταβολίζει τα ελεύθερα σάκχαρα σε αιθανόλη. Για να εξεταστεί κατά πόσο αυτή η παρεμπόδιση έχει αντιστρεπτά αποτελέσματα στον μεταβολισμό του μύκητα, η παραγόμενη αιθανόλη αφαιρείται μερικώς και υπό κενό από το μέσο καλλιέργειας κάθε 58 ώρες (όπως περιγράφεται στις μεθόδους). Ζυμώσεις υπό κενό έχουν εφαρμοστεί και στο παρελθόν για να υπερκεράσουν την παρεμποδιστική δράση της αιθανόλης (Lee et al., 1981 ; Nguyen et al., 2011). Στο Σχήμα 4.11 φαίνεται ότι η παραγωγή αιθανόλης από τον *F. oxysporum* αυξήθηκε κατά 22.5% φτάνοντας τα 38.4 g/L (καθαρής παραγωγής), όταν η αιθανόλη αφαιρούνταν από το μέσο ζύμωσης. Αυτό δείχνει ότι ο μύκητας ανακτά (εν μέρει) την μεταβολική του ικανότητα, όταν η περίσσεια αιθανόλης αφαιρείται. Έτσι, επιβεβαιώνεται η υπόθεση πως η επίδραση της αιθανόλης στον μεταβολισμό του μικροοργανισμού έχει αντιστρεπτά χαρακτηριστικά υπό τις συνθήκες του πειράματος. Το αποτέλεσμα αυτό συνάδει με παλαιότερες μελέτες οι οποίες

πραγματούνται την *in situ* αφαίρεση της αιθανόλης. Σε όλες τις περιπτώσεις αναφέρεται αύξηση της παραγωγής σε αιθανόλη έως και 30% (Cysewski and Wilke, 1977 ; Lee et al., 1981 ; Roffler et al., 1984 ; Taylor et al., 2010 ; Abdullah and Ariyanti, 2012).



Σχήμα 4.11: Το αποτέλεσμα της *in situ* αφαίρεσης της αιθανόλης στην ζύμωση. Η παραγόμενη αιθανόλη αφαιρείται από το μέσο καλλιέργειας κάθε 48 ώρες. Αιθανόλη στο μέσο (●), συνολική παραχθείσα αιθανόλη (αιθανόλη στο μέσο και αφαιρεμένη αιθανόλη) (◆), κατανάλωση γλυκόζης (▲), παραγωγή αιθανόλης στο πείραμα αναφοράς (▽), κατανάλωση γλυκόζης στο πείραμα αναφοράς (Δ).

Όπως φαίνεται και στο Σχήμα 4.11, τα ευεργετικά αποτελέσματα της απομάκρυνσης της αιθανόλης από το μέσο εμφανίζονται όταν η συγκέντρωση της αιθανόλης στο μέσο ξεπερνά το 3% β/ο. Όταν η συγκέντρωση της αιθανόλης πλησιάζει αυτή την τιμή, η ζύμωση τείνει να σταματήσει. Αυτό συνάδει με τα ευρήματα της παρούσας μελέτης όσον αφορά στην επίδραση της αιθανόλης στην ικανότητα του *F. oxysporum* να ζυμώνει τα ελεύθερα σάκχαρα.

Τα αποτελέσματα αυτά οδηγούν στο συμπέρασμα ότι αν η συγκέντρωση της αλκοόλης μειωθεί ικανοποιητικά, τα παρεμποδιστικά της αποτελέσματα στον μεταβολισμό των κυττάρων αντιστρέφονται. Αυτό έχει ως αποτέλεσμα να ανακάτται η ζυμωτική ικανότητα από την μύκητα. Τέλος, πρέπει να σημειωθεί πως η ολική συγκέντρωση αιθανόλης που επιτεύχθηκε είναι πολύ κοντά στο 4% β/ο, η οποία θεωρείται η ελάχιστη προαπαιτούμενη συγκέντρωση για μία αποδοτική διεργασία παραγωγής βιοαιθανόλης (Galbe and Zacchi, 2007).

4.5 Συμπεράσματα

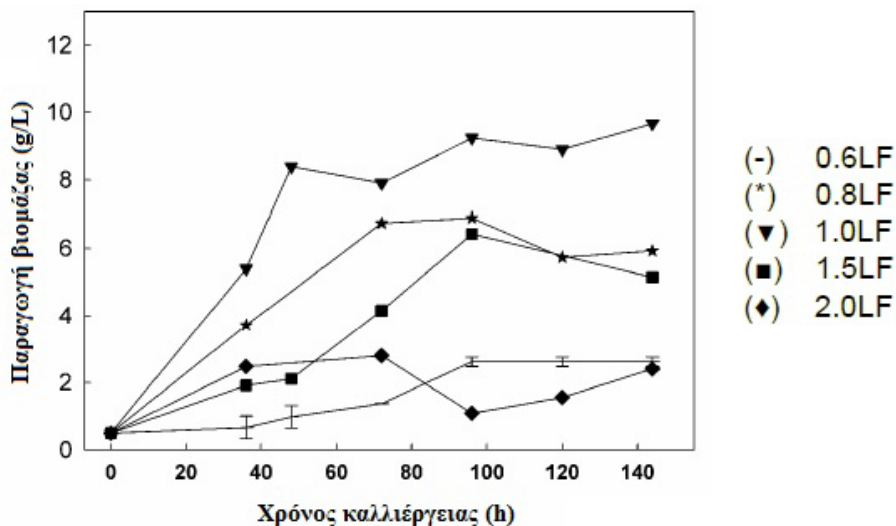
Στο κεφάλαιο αυτό εξετάστηκε η αντοχή και ανθεκτικότητα του *F. oxysporum* (στην ανάπτυξη, ζύμωση και ενζυμική ενεργότητα) στην παρουσία αιθανόλης, με σκοπό να εκτιμηθεί η πιθανότητα αξιοποίησης του μύκητα σε διεργασίες παραγωγής βιοαιθανόλης. Ο *F. oxysporum* θα μπορούσε να αξιοποιηθεί σε αυτές τις διεργασίες τόσο ως προς την ικανότητά του να μεταβολίζει την ξυλόζη σε αιθανόλη, όσο και ως προς την ικανότητά του να παράγει ανθεκτικά ένζυμα. Σύμφωνα με τα παραπάνω αποτελέσματα, ο μύκητας είναι ικανός να αναπτύσσεται και να μεταβολίζει τα σάκχαρα σε αιθανόλη υπό ήπιες συγκεντρώσεις αλκοόλης (λιγότερο από 3% β/ο) στο μέσο καλλιέργειας. Τα ένζυμα που εκκρίνει ο μύκητας θα μπορούσαν να αξιοποιηθούν στο πλαίσιο ενός βιοδιυλιστηρίου, καθώς η ανθεκτικότητά τους στην αιθανόλη είναι αντίστοιχη με αυτή των εμπορικών ενζύμων που χρησιμοποιούνται σήμερα ευρέως σε διεργασίες ζύμωσης υψηλής κλίμακας. Η χρήση του *F. oxysporum* σε μία ενοποιημένη διεργασία παραγωγής αιθανόλης μπορεί να οδηγήσει σε μείωση του κόστους της, επιτυγχάνοντας υψηλότερη απόδοση σε αιθανόλη αλλά και μειώνοντας τις απαιτήσεις σε εμπορικά ένζυμα. Τελικά, με βάση τα παραπάνω αλλά και άλλες μελέτες (Hennessey at al., 2013), μπορεί να εξαχθεί το συμπέρασμα ότι ο μύκητας *F. oxysporum* είναι ικανός να ανταπεξέλθει στην παρουσία αιθανόλης κάτι που τον καθιστά υποψήφιο για περαιτέρω μελέτη σε ολοκληρωμένες διεργασίες παραγωγής βιοαιθανόλης.

5. Αξιοποίηση του Υγρού Κλάσματος που προκύπτει από την προκατεργασία του άχυρου σίτου

Όπως αναφέρεται και στην ενότητα Υλικά και Μέθοδοι, κατά την υδροθερμική προκατεργασία του άχυρου σίτου παράγονται δύο διακριτές φάσεις, το υγρό (Liquid Fraction, LF) και το στερεό (Pre-treated wheat straw, PWS) κλάσμα. Το υγρό κλάσμα (ΥΚ) είναι αποτέλεσμα της έκπλυσης των στερεών μετά την κατεργασία. Η σύσταση αυτού του υγρού περιλαμβάνει κυρίως κατάλοιπα της κατεργασίας και διαλυτοποιημένη ημικυτταρίνη. Λόγω της περιεκτικότητάς του σε ημικυτταρίνη κρίνεται απαραίτητη η μελέτη της πιθανής αξιοποίησής του, είτε ως πηγή άνθρακα για την ανάπτυξη και παραγωγή ενζύμων είτε προς παραγωγή αιθανόλης. Όμως η παρουσία παρεμποδιστικών ουσιών που παράγονται κατά την προκατεργασία δημιουργούν μια πρόκληση ως προς την αξιοποίηση αυτού του ρεύματος της διεργασίας. Στο παρόν κεφάλαιο θα μελετηθεί η ικανότητα του μύκητα *F. oxysporum* να αναπτύσσεται, να παράγει ένζυμα, να υδρολύει και να μετατρέπει σε αιθανόλη το υγρό αυτό κλάσμα της προκατεργασίας.

5.1 Αερόβια ανάπτυξη και παραγωγή ενζύμων από το μύκητα *F. oxysporum* στο Υγρό Κλάσμα

Δεδομένης της σύστασης του υγρού κλάσματος σε ημικυτταρίνη αλλά και παρεμποδιστικές ενώσεις, μελετήθηκε η ικανότητα του *F. oxysporum* να αναπτύσσεται σε αερόβιες βυθισμένες καλλιέργειες με μοναδική πηγή άνθρακα διάφορες συγκεντρώσεις του υγρού κλάσματος. Στο Σχήμα 5.1 παρουσιάζεται η παραγωγή βιομάζας του μύκητα σε καλλιέργειες που περιείχαν διάφορες συγκεντρώσεις του υγρού κλάσματος.



Σχήμα 5.1: Παραγωγή βιομάζας από τον μύκητα *F. oxysporum* με τη χρήση του υγρού κλάσματος της κατεργασίας του άχυρου σίτου ως υπόστρωμα.

Όπως είναι εμφανές η παραγωγή βιομάζας μειώνεται όσο η προσθήκη στο μέσο είναι σε μικρότερη συγκέντρωση από την αρχική του πιθανώς λόγω της μείωσης της προσφερόμενης στο μύκητα πηγής άνθρακα κατά την αραίωση του υλικού. Όπως επίσης και όταν γίνεται προσθήκη συμπυκνωμένου υγρού κλάσματος (1.5 και 2 φορές) παρατηρείται άμεση μείωση της παραγόμενης βιομάζας. Αυτή η μείωση πιθανόν οφείλεται στο ότι με τη συμπύκνωση του υγρού ναί μεν αυξάνεται η συγκέντρωση των διαθέσιμων σακχάρων και της ημικυτταρίνης, αυξάνεται όμως και η συγκέντρωση των παρεμποδιστικών ενώσεων (κυρίως ασθενή οργανικά οξέα) που υπάρχουν στο μίγμα, παρεμποδίζοντας την ανάπτυξη του μύκητα. Τέλος, αξίζει να σημειωθεί πως σε όλες τις προηγούμενες περιπτώσεις δεν παρατηρήθηκε σημαντική παραγωγή ημικυτταρινολυτικών ενζύμων, κυρίως ξυλανάσης. Η ενεργότητα ξυλανάσης σε όλες τις περιπτώσεις μετρήθηκε μικρότερη από 2 U/ mL.

Εφόσον, είναι εμφανές, σύμφωνα με το προηγούμενο πείραμα, πως το υγρό κλάσμα δεν μπορεί να χρησιμοποιηθεί ως πηγή άνθρακα για την ανάπτυξη και παραγωγή ενζύμων από το μύκητα, μελετήθηκε η χρησιμοποίησή του ως πρόσθετο, στην ήδη μελετημένη ανάπτυξη του *F. oxysporum* σε υπόλειμμα βύνης (BG) και σπάδικα αραβόσιτου (CC) (Χίρος et al., 2009). Σε αυτή την περίπτωση, προστίθεται σε διάφορες συγκεντρώσεις του υγρού κλάσματος 40 g L⁻¹ BG/CC σε αναλογία 2/1. Τα αποτελέσματα παρουσιάζονται στον Πίνακα 5.1

Πίνακας 5.1: Μέγιστη βιομάζα (g/L), ρυθμός ανάπτυξης (h⁻¹) και μέγιστη παραγωγή ξυλανάσης (U/mL) που μετρήθηκαν κατά την ανάπτυξη του *F. oxysporum* στο βέλτιστο μέσο καλλιέργειας (Χίρος et al., 2009) υπό την προσθήκη διαφόρων συγκεντρώσεων του ΥΚ.

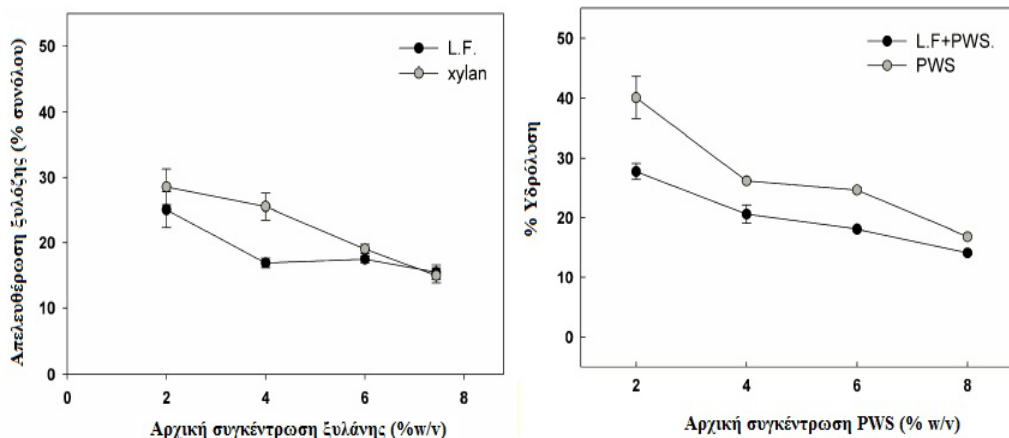
Υγρό κλάσμα	Βιομάζα (g/L)	Ρυθμός ανάπτυξης (h ⁻¹)	Ενεργότητα Ξυλανάσης (U/mL)
0	11.7 ± 0.6	0.083	24.5 ± 0.6
0.25	14.1 ± 1.1	0.077	21.7 ± 1.6
0.5	12.8 ± 0.8	0.091	22.3 ± 1.1
0.75	13.2 ± 0.2	0.089	21.0 ± 0.9
1.0	13.3 ± 0.2	0.087	23.0 ± 1.0
1.25	14.8 ± 0.9	0.097	17.0 ± 0.6
1.5	14.5 ± 0.7	0.096	16.8 ± 0.2
1.75	15.6 ± 0.3	0.092	12.7 ± 1.3
2.0	16.9 ± 0.3	0.097	8.9 ± 0.2

Από τα αποτελέσματα αυτά προκύπτει ότι η παραγωγή βιομάζας αυξάνεται αυξανόμενης της συγκέντρωσης του υγρού κλάσματος που

προστίθεται. Αυτό μπορεί να εξηγηθεί από την παρουσία ελεύθερων σακχάρων και ολιγοσακχαριτών στο διάλυμα του υγρού. Αντιθέτως, η παραγωγή ξυλανάσης μειώνεται και σε αυτήν την περίπτωση, όταν η συγκέντρωση του υγρού κλάσματος στην καλλιέργεια αυξάνεται. Αν και η παραγωγή ενζύμων που μετρήθηκε σε αυτή την περίπτωση είναι σημαντικά αυξημένη σε σχέση με την παραγωγή ενζύμων όταν χρησιμοποιήθηκε μόνο το υγρό κλάσμα ως πηγή άνθρακα, φαίνεται πως η παρουσία του υγρού κλάσματος στο μέσο καλλιέργειας έχει παρεμποδιστική επίδραση στην παραγωγή ενζύμων από το μύκητα *F. oxysporum*. Όπως είναι εμφανές από τον Πίνακα 5.1 η μέγιστη παραγωγή ενζύμων μετρήθηκε στην καλλιέργεια όπου δεν υπήρχε καθόλου προσθήκη του υγρού κλάσματος.

Τέλος, μελετήθηκε η υδρόλυση του υγρού κλάσματος αλλά και η χρήση του ως διαλύτη για την υδρόλυση του προκατεργασμένου άχυρου σίτου από το ενζυμικό σύστημα του μύκητα *F. oxysporum*. Τα αποτελέσματα παρουσιάζονται στο Σχήμα 5.2.

Το υγρό κλάσμα συμπυκνώθηκε κατάλληλα ώστε η συγκέντρωσή του σε ξυλάνη να φτάσει από 2 μέχρι 7.5% β/ο και στη συνέχεια υδrolύθηκε με την προσθήκη ενζύμων του μύκητα *F. oxysporum*. Το ενζυμικό σύστημα του *F. oxysporum* κατάφερε να υδrolύσει ικανοποιητικά την περιεχόμενη στο υγρό κλάσμα ξυλάνη, φτάνοντας σε ποσοστό υδρόλυσης έως και 30%. Αντιθέτως, η προσθήκη του υγρού κλάσματος παρεμποδίζει την υδρόλυση του υδροθερμικά κατεργασμένου άχυρου από το ενζυμικό σύστημα του *F. oxysporum*.



Σχήμα 5.2: Υδρόλυση ξυλάνης του ΥΚ από το ενζυμικό σύστημα του *F. oxysporum* (αριστερά) και ταυτόχρονη υδρόλυση του υγρού και του στερεού κλάσματος της υδροθερμικής κατεργασίας του άχυρου σίτου (δεξιά).

Επίσης, στο Σχήμα 5.2 παρατηρείται ότι όσο αυξάνεται η συγκέντρωση του υποστρώματος μειώνεται και η απελευθέρωση προϊόντος (γλυκόζη ή ξυλόζη). Αυτό οφείλεται στην παρεμποδιστική δράση που εμφανίζουν τα ελεύθερα σάκχαρα στις λιγνινοκυτταρινολυτικές ενεργότητες του *F. oxysporum* (Χίρος et al., 2009). Αυτό όμως δεν αλλάζει το προηγούμενο συμπέρασμα, καθώς αντίστοιχη μείωση εμφανίζεται παρουσία και απουσία του υγρού κλάσματος. Σε σχεδόν όλες τις περιπτώσεις η απόδοση της υδρόλυσης είναι μικρότερη όταν στο μέσο προστεθεί υγρό κλάσμα.

5.2 Αξιοποίηση του Υγρού Κλάσματος για την παραγωγή αιθανόλης από το μύκητα *F. oxysporum*

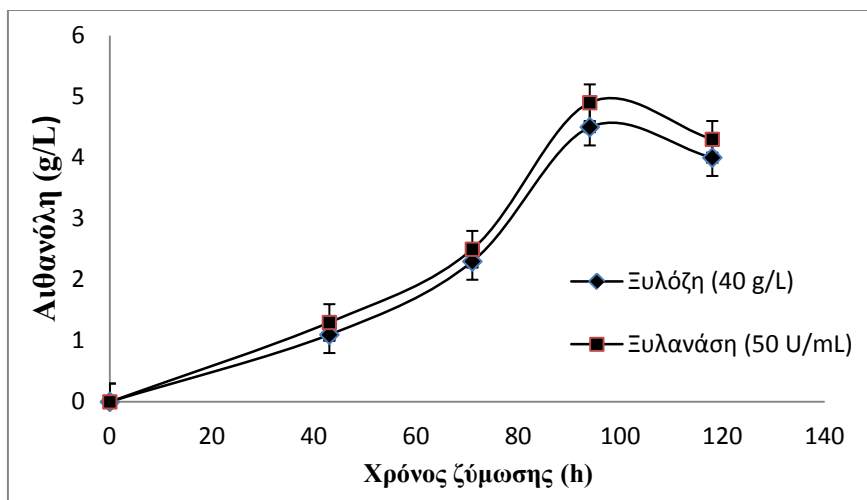
Μετά την προσπάθεια αξιοποίησης του υγρού κλάσματος σε αερόβιες καλλιέργειες αλλά και σε υδρολύσεις από τον *F. oxysporum*, αξιολογείται η χρήση του ως πηγή άνθρακα για την παραγωγή αιθανόλης. Όμως, η χαμηλή αρχική συγκέντρωση ημικυτταρίνης και ελεύθερων σακχάρων στο υγρό δεν

ενδείκνυται για την άμεση αξιοποίησή του. Γι' αυτό το λόγο, το υγρό κλάσμα συμπυκνώθηκε 6, 7, και 8 φορές και χρησιμοποιήθηκε ως πηγή άνθρακα για την παραγωγή βιοαιθανόλης. Στον Πίνακα 5.2 παρουσιάζονται οι συγκεντρώσεις ημικυτταρίνης και ολικών σακχάρων για τις εκάστοτε συμπυκνώσεις του υγρού κλάσματος.

Πίνακας 5.2: Συγκεντρώσεις ολικών σακχάρων και ξυλάνης για το συμπυκνωμένο υγρό κλάσμα.

Συμπυκνώσεις ΥΚ	Ολικά σάκχαρα (g L ⁻¹)	(Ξυλάνη g L ⁻¹)
0	16.45	11.36
x6	98.6	68.16
x7	115.15	79.52
x8	131.6	90.88

Σε όλες τις ανωτέρω περιπτώσεις, το συμπυκνωμένο υγρό κλάσμα εμβολιάστηκε με καλλιέργεια του *F. oxysporum* πλήρως αναπτυγμένη σε θρεπτικό μέσο υπολείμματος βύνης και σπάδικα αραβοσίτου. Σε καμία από τις παραπάνω περιπτώσεις δεν μετρήθηκε παραγωγή αιθανόλης μεγαλύτερη από 5 g L⁻¹. Αυτό οδηγεί στο συμπέρασμα πως ο *F. oxysporum* δεν μπορεί είτε να υδρολύσει την ημικυτταρίνη σε ελεύθερα σάκχαρα, είτε να μεταβολίσει αυτά τα σάκχαρα σε αιθανόλη είτε και τα δυο παραπάνω. Για να ελεγχθεί η παραπάνω υπόθεση πραγματοποιήθηκε το ακόλουθο πείραμα. Σε υγρό κλάσμα, προηγουμένως συμπυκνωμένο κατά 8 φορές, προστέθηκαν 40 g L⁻¹ καθαρής ξυλόζης ή 50 U mL⁻¹ εμπορικού ενζύμου ξυλανάσης (Σχήμα 5.3). Όπως είναι εμφανές και στο σχήμα 5.3, καμία από τις δύο προσθήκες δεν οδήγησε σε ικανοποιητική παραγωγή αιθανόλης από το μύκητα.



Σχήμα 5.3: Προσθήκη ξυλόζης και ξυλανάσης κατά την ζύμωση του συμπυκνωμένου υγρού κλάσματος.

5.3 Προσαρμογή του μύκητα *F. oxysporum* στο Υγρό Κλάσμα

Έχει αναφερθεί στη βιβλιογραφία πως διάφοροι μικροοργανισμοί είναι ικανοί να μεταβολίζουν τα παρεμποδιστικά παράγωγα που παράγονται κατά την προκατεργασία της λιγνινοκυτταρίνης (Lopez et al., 2004 ; Carmona et al., 2009 ; Jonsson et al., 2013). Για να μελετηθεί η πιθανή ικανότητα του *F. oxysporum* να προσαρμοστεί (Keating et al., 2005) στο τοξικό υγρό κλάσμα της μελέτης μας, πραγματοποιήθηκε το ακόλουθο πείραμα. Ο μύκητας αναπτυσσόταν αερόβια στο υγρό κλάσμα, το οποίο ήταν εμπλουτισμένο με όλα τα απαραίτητα για την ανάπτυξη του μικροοργανισμού άλατα και θρεπτικά στοιχεία (Christakopoulos et al., 1989) και η ξυλόζη (20 g L^{-1}) χρησιμοποιούταν ως πηγή άνθρακα. Η κατανάλωση της ξυλόζης και η παραγωγή βιομάζας μετριόταν καθημερινά για να προσδιοριστεί η κυτταρική ανάπτυξη. Στο τέλος της εκθετικής φάσης ανάπτυξης, 10 mL της εκάστοτε καλλιέργειας χρησιμοποιούταν ως εμβόλιο για μια νέα αντίστοιχη καλλιέργεια. Στο τέλος της $5^{\text{ης}}$ και $10^{\text{ης}}$ «γενεάς», μέρος της καλλιέργειας

χρησιμοποιήθηκε για τη ζύμωση ΥΚ εμπλουτισμένου με όλα τα απαραίτητα θρεπτικά και ξυλόζη (40 g L^{-1}). Στον Πίνακα 5.3 παρουσιάζονται τα αποτελέσματα του παραπάνω πειράματος.

Πίνακας 5.3: Προσαρμογή του μύκητα *F. oxysporum* στο υγρό κλάσμα της υδροθερμικής προκατεργασίας του άχυρου σίτου.

Καλλιέργεια	Διάρκεια (μέχρι το τέλος της εκθετικής φάσης) (ημέρες)	Κατανάλωση Ξυλόζης (g L^{-1})	Παραγωγή Βιομάζας (g L^{-1})	Παραγωγή Αιθανόλης (g L^{-1})
1 ^η	4	12.7	5.2	
2 ^η	4	11.4	5.0	
3 ^η	4	11.0	4.7	
4 ^η	5	11.4	3.4	
5 ^η	5	11.8	2.6	OXI
6 ^η	5	12.9	4.8	
7 ^η	5	11.9	3.3	
8 ^η	6	10.5	3.0	
9 ^η	6	12.7	4.1	
10 ^η	7	11.4	5.2	OXI

Από τα αποτελέσματα του πίνακα είναι εμφανές ότι ο μύκητας είναι ικανός να αναπτύσσεται στο ΥΚ, όπως δείχθηκε και σε προηγούμενη παράγραφο. Όμως, η προσαρμογή του δεν είχε τα αναμενόμενα αποτελέσματα ως προς την ικανότητά του να παράγει αιθανόλη. Επίσης, φαίνεται ότι απαιτείται αύξηση του χρόνου για να φτάσει η εκάστοτε καλλιέργεια στην εκθετική φάση ανάπτυξης, κάτι που δείχνει πως από «γενεά» σε «γενεά» η ανθεκτικότητα του μύκητα μειώνεται αντί αν αυξάνεται.

Σε αντίθεση με βιβλιογραφικές αναφορές που αποδεικνύουν ότι συνεχείς κύκλοι ανάπτυξης (ή/και ζύμωσης) σε υδρολύματα που περιέχουν παρεμποδιστικές ενώσεις οδηγούν σε αύξηση της αντοχής, της παραγωγικότητας και της απόδοσης (Parekh et al., 1986 ; Kavanagh and Whittaker, 1994 ; Kiran Sree et al., 2000 ; Kim et al., 2004), στην παρούσα μελέτη δεν επαληθεύτηκε αυτό. Αντιθέτως, επιβεβαιώνονται τα ευρήματα των Keating et al. (2006), σύμφωνα με τα οποία οι συνεχείς κύκλοι ανάπτυξης και ζύμωσης δυο στελεχών της ζύμης *S. cerevisiae* υπό την παρουσία παρεμποδιστικών ενώσεων οδηγούν στη μείωση της απόδοσης και της παραγωγικότητας σε αιθανόλη.

5.4 Αποτοξικοποίηση του Υγρού Κλάσματος για την παραγωγή αιθανόλης από το μύκητα *F. oxysporum*

Όπως φαίνεται και από τα παραπάνω αποτελέσματα η άμεση χρήση του υγρού κλάσματος της προκατεργασίας για την παραγωγή αιθανόλης δεν είναι εφικτή. Σύμφωνα με τη σύσταση του ΥΚ υπάρχει μια πληθώρα παρεμποδιστικών ενέσεων, οι οποίες είναι ικανές να σταματούν τον μεταβολισμό του *F. oxysporum* προς παραγωγή αιθανόλης (Larsson et al., 1999). Οι δυο βασικές στρατηγικές για την ελαχιστοποίηση της παρεμποδιστικής δράσης αυτών των ενώσεων είναι: (1) η αποτοξικοποίηση των υδρολυμάτων με την απομάκρυνση των παρεμποδιστών πριν από τη χρήση του υδρολύματος (Hodge et al., 2009) και (2) η ανάπτυξη στελεχών ανθεκτικών σε αυτές τις ενώσεις (Sato et al., 2014). Η πρώτη προσέγγιση αυξάνει το κόστος της διεργασίας γιατί απαιτεί την προσθήκη ενός σταδίου επεξεργασίας, ενώ η δεύτερη δεν προσφέρει ακόμα τα προσδοκώμενα οφέλη στην ανθεκτικότητα των μικροοργανισμών (Tomek et al., 2015).

Στη βιβλιογραφία έχουν αναφερθεί διάφορες μέθοδοι (Persson et al., 2002 ; Björklund et al., 2002 ; Cantarella et al., 2004 ; Kumar Chandel et al., 2007 ; Palmqvist et al., 2007 ; Alriksson et al., 2011) για την αποτοξικοποίηση των υδρολυμάτων. Αυτές μπορεί να περιλαμβάνουν ουδετεροποίηση του pH, προσθήκη ασβεστίου, επεξεργασία με ενεργό άνθρακα, επεξεργασία με ρητίνες ιοντοεναλλαγής (Björklund et al., 2002 ; Carvalheiro et al., 2005) ή ακόμα και ενζυμική αποτοξικοποίηση με τη χρήση λακασών (Jönsson et al., 1998).

Ο κυριότερος παρεμποδιστής στο υδρόλυμα της παρούσας μελέτης πιθανόν είναι το οξικό οξύ, η συγκέντρωση του οποίου μετρήθηκε σε υψηλά επίπεδα (5 g L^{-1}). Δεδομένου του γεγονότος ότι για να χρησιμοποιηθεί αποδοτικά το ΥΚ απαιτείται συμπύκνωσή του, αυτή η συγκέντρωση του οξέος γίνεται πολύ μεγαλύτερη. Επιπλέον, φάνηκε από τα προηγούμενα όπου γινόταν ρύθμιση του pH πριν από κάθε περίπτωση, ότι η απλή ουδετεροποίηση του διαλύματος και η ρύθμιση του pH δεν είναι αρκετή. Το οξικό ανιόν μπορεί να διαχυθεί στο εσωτερικό του κυττάρου μειώνοντας το pH. Αυτό οδηγεί σε ασύζευκτη μεταφορά ιόντων και υψηλές απαιτήσεις σε ενέργεια (Palmqvist and Hahn-Hageland, 2000). Η ευαισθησία του εκάστοτε μικροοργανισμού στο οξικό οξύ διαφέρει και εξαρτάται από τις συνθήκες της διεργασίας (Van Zyl et al., 1991). Έχει αναφερθεί τοξική και παρεμποδιστική δράση του οξέος ακόμα και σε συγκεντρώσεις της τάξης των 0.25 g L^{-1} (Maiorella et al., 1983). Τα παραπάνω καθιστούν την αφαίρεση των παρεμποδιστικών ενώσεων από το σύστημα απαραίτητη για την αποδοτική βιομετατροπή των σακχάρων του συστήματος σε αιθανόλη (Wickramasinghe and Grzenia, 2007). Στον Πίνακα 5.4 παρουσιάζονται συνοπτικά οι κατεργασίες που εφαρμόστηκαν αρχικά για την αφαίρεση του οξικού οξέος από το υγρό κλάσμα. Από τα αποτελέσματά του είναι εμφανές ότι η υπόθεση πως μόνο το οξικό οξύ είναι ικανό να δημιουργήσει όλα τα

έντονα παρεμποδιστικά αποτελέσματα που εμφανίζονται στο ΥΚ, είναι λανθασμένη. Προφανώς, παρουσιάζεται συνεργιστική δράση περισσότερων ενώσεων.

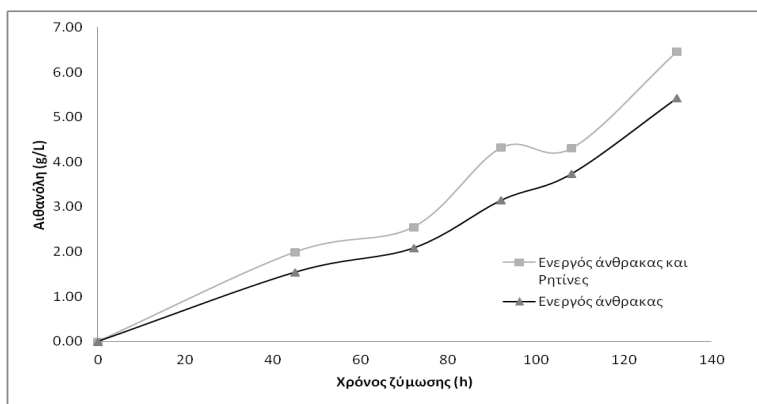
Πίνακας 5.4: Κατεργασίες του ΥΚ για την αφαίρεση του οξικού οξέος και τα αποτελέσματά τους στην παραγωγή αιθανόλης από τον *F. oxysporum*.

Κατεργασία	Αποτέλεσμα	Συμπύκνωση ΥΚ πριν τη ζύμωση	Προσθήκη σακχάρων	Παραγωγή αιθανόλης
OXI	-	x6- x8	OXI	0,5% β/ο
OXI	-	OXI	Γλυκόζη 4 % β/ο	≤ 0,5% β/ο
OXI	-	OXI	Ξυλόζη 4 % β/ο	≤ 0,5% β/ο
Απομάκρυνση οξικού οξέος υπό κενό	Απομάκρυνση 88%	x 8	No	≤ 0,5% β/ο
Κατεργασία με ρητίνη ιοντο-εναλλαγής (Q - sepharose).	Απώλεια σακχάρων 15 %, Όχι απομάκρυνση οξικού οξέος	OXI	Ξυλόζη 4 % β/ο	≤ 0,5% β/ο
Κατεργασία με ρητίνη ιοντο-εναλλαγής (Q - sepharose).	Απώλεια σακχάρων 15 %, Όχι απομάκρυνση οξικού οξέος	OXI	Γλυκόζη 4 % β/ο	≤ 0,5% β/ο

Έχει αναφερθεί στη βιβλιογραφία ότι η επεξεργασία των «τοξικών» υδρολυμάτων με ρητίνες ή/και ενεργό άνθρακα μπορεί να μειώσει την τοξικότητά τους. Οι de Mancilha et al. (2007) μελέτησαν διάφορες εμπορικές ρητίνες για την αποτοξικοποίηση του υδρολύματος από τους παρεμποδιστές που παρήχθησαν στην προκατεργασία στελεχών αραβοσίτου. Η έρευνα αυτή είχε ενθαρρυντικά αποτελέσματα ως προς την ζύμωση του

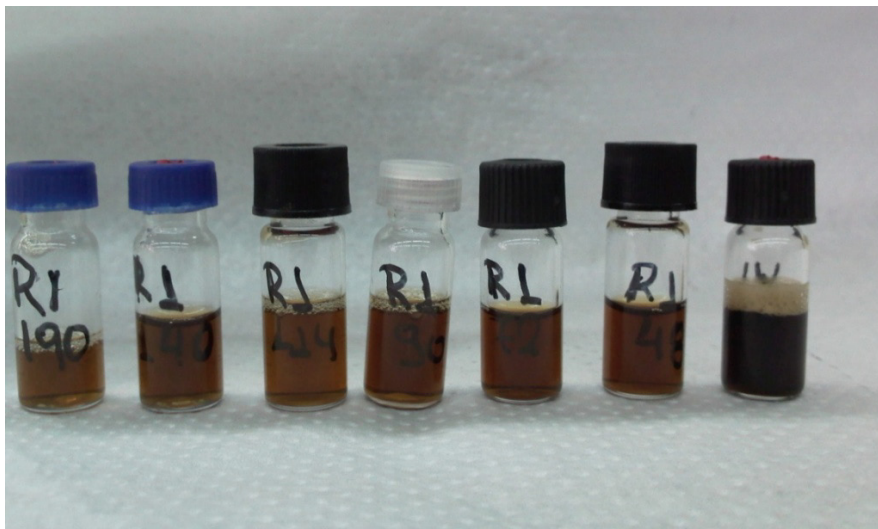
υδρολύματος που έχει υποστεί κατεργασία με ρητίνες. Όμως, δεν επιτεύχθηκε ικανοποιητική απόδοση σε αιθανόλη. Επιπλέον, οι Wickramasinghe and Grzenia (2007) αναφέρουν την περίπτωση όπου η κατεργασία με ενεργό άνθρακα μείωσε τη συγκέντρωση φαινολικών ενώσεων και HMF στο μέσο. Σε μια άλλη μελέτη (Hodge et al., 2009) αναφέρονται παρόμοια αποτελέσματα για τη χρήση του ενεργού άνθρακα.

Για να εξεταστούν τα παραπάνω ενδεχόμενα πραγματοποιήθηκε το παρακάτω πείραμα. Υγρό κλάσμα, συμπυκνωμένο 8 φορές και αφού φυγοκεντρήθηκε για την αφαίρεση των στερεών (κυρίως ημικυτταρίνη) επεξεργάστηκε με ενεργό άνθρακα. Στη συνέχεια πέρασε από ένα σύστημα εμπορικών ρητινών (Purolite A103S και Purolite A860S) όπως περιγράφεται αναλυτικά στις μεθόδους. Τα αποτελέσματα παρουσιάζονται στο Σχήμα 5.4.



Σχήμα 5.4: Παραγωγή αιθανόλης μετά την αποτοξικοποίηση του ΥΚ με ρητίνες ή/και ενεργό άνθρακα.

Κατά την ζύμωση του επεξεργασμένου υδρολύματος παρατηρήθηκε έντονη χρωματική αλλαγή με την πάροδο του χρόνου (Σχήμα 5.5), κάτι που υποδηλώνει πως ο μικροοργανισμός ήταν μεταβολικά ενεργός και πιθανώς αποδομούσε φαινολικές ενώσεις και λιγνίνη, οι οποίες δίνουν το έντονο σκούρο χρώμα στο υγρό.



Σχήμα 5.5: Φωτογραφία αποχρωματισμού του υγρού της ζύμωσης (από τον *F.oxysporum*) του επεξεργασμένου με ρητίνες και ενεργό άνθρακα ΥΚ.

Η χρήση του ανωτέρω συστήματος οδηγεί τελικά σε μια μικρή αύξηση της παραγωγής αιθανόλης από το ΥΚ, αλλά η τελική παραγωγή αιθανόλης δεν δικαιολογεί τη χρήση σε μια βιομηχανική διεργασία. Διότι, πέρα από τη χαμηλή απόδοση σε αιθανόλη πρέπει να ληφθεί υπόψη και το κόστος των ρητινών αλλά και του πάγιου εξοπλισμού για την επεξεργασία του υγρού κλάσματος.

Συνοπτικά, παρόλο που η επεξεργασία με ενεργό άνθρακα είναι μια αποδοτική και οικονομική διεργασία για την απομάκρυνση παρεμποδιστικών ενώσεων (Roberto et al., 1991 ; Parajo et al., 1996 ; Parajo et al., 1997 ; Mussato and Roberto, 2001 ; Canilha et al., 2004 ; Wickramasinghe and Grzenia, 2007 ; Hogde et al., 2009 ; Grzenia et al., 2010), στην περίπτωση της συγκεκριμένης διατριβής δεν εμφάνισε τα αναμενόμενα αποτελέσματα. Επιπροσθέτως, αν και η χρήση ρητινών οδήγησε σε μικρή αύξηση της παραγωγής αιθανόλης, το κόστος αγοράς και εγκατάστασής τους τις καθιστά μη ανταποδοτικές (Björklund et al., 2002 ; Sárvári Horváth et al., 2004 ; Grzenia et al., 2010).

5.5 Συμπεράσματα

Στο κεφάλαιο αυτό εξετάστηκε η πιθανότητα αξιοποίησης του υγρού κλάσματος της υδροθερμικής προκατεργασίας του άχυρου σίτου, σε μία διεργασία παραγωγής βιοαιθανόλης από το μύκητα *F. oxysporum*. Λόγω της περιεκτικότητας του υλικού σε ημικυτταρίνη και της απουσίας κυτταρίνης ή ελεύθερης γλυκόζης, δεν μελετήθηκε η χρήση ζύμης για τη βιομετατροπή του. Σύμφωνα με τα παραπάνω αποτελέσματα, ο μύκητας *F. oxysporum* δεν εκκρίνει τα απαραίτητα ημικυτταρινολυτικά ένζυμα για την υδρόλυση του υποστρώματος σε ικανοποιητικές ποσότητες, αν και μπορεί να αναπτυχθεί και να παράξει κυτταρική βιομάζα στο υγρό κλάσμα. Επιπλέον, όταν το ΥΚ προστίθεται στο βέλτιστο μέσο καλλιέργειας για την ανάπτυξη και παραγωγή ενζύμων από το μύκητα οδηγεί σε παρεμποδιστικά αποτελέσματα ως προς την έκκριση ημικυτταρινολυτικών ενζύμων. Όμοια παρεμποδιστική δράση εμφανίζεται και στην υδρόλυση του στερεού κλάσματος της υδροθερμικής κατεργασίας του άχυρου σίτου, υπό την παρουσία του υγρού κλάσματος.

Όσον αφορά στην παραγωγή αιθανόλης από το ΥΚ προέκυψε ότι δεν είναι δυνατή η αποδοτική αξιοποίησή του, καθώς οι περιεχόμενοι σε αυτό παρεμποδιστές (κυρίως οξικό οξύ) αναστέλλουν τον μεταβολισμό της ξυλόζης από τον *F. oxysporum*. Στις προσπάθειες που πραγματοποιήθηκαν για την προσαρμογή του μικροοργανισμού στο υλικό αυτό αλλά και την αποτοξικοποίησή του, τα αποτελέσματα δείχνουν ότι αν και παρατηρείται σχετική αύξηση στην παραγωγή αιθανόλης από τη ζύμωση του ΥΚ (περίπου 20%, μετά την επεξεργασία με ρητίνες και ενεργό άνθρακα), το κόστος μιας τέτοιας εγκατάστασης σε βιομηχανική κλίμακα δεν καλύπτεται από την τελική απόδοση στην παραγωγή αιθανόλης.

6. Αξιολόγηση του προκατεργασμένου άχυρου σίτου για την παραγωγή βιοαιθανόλης

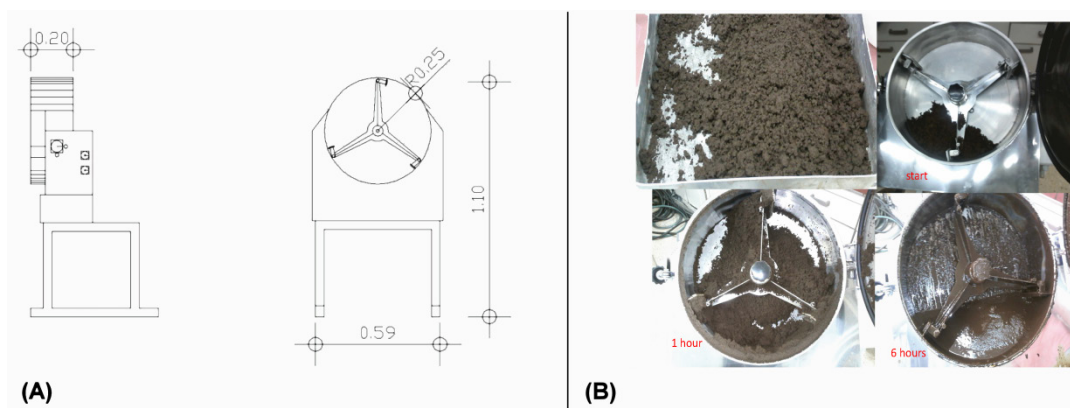
Όπως έχει προαναφερθεί, μετά την υδροθερμική κατεργασία του άχυρου σίτου προκύπτει ένα στερεό κλάσμα πλούσιο σε κυτταρίνη, το προκατεργασμένο άχυρο σίτου (Pre-treated wheat straw, PWS). Για την βιώσιμη αξιοποίησή του σε βιομηχανικές εφαρμογές παραγωγής βιοαιθανόλης απαιτείται η χρήση του σε υψηλές συγκεντρώσεις υποστρώματος. Όμως, η δομή και η φυσιολογία του δημιουργούν δυσκολίες σε αυτή την πορεία καθώς το PWS σε συγκεντρώσεις άνω του 20% ΞΜ (β/β) δημιουργεί έντονα συνεκτικά μίγματα με υψηλό ιξώδες. Έχει ήδη αναλυθεί πως τέτοιου είδους μίγματα δεν είναι εύκολα προσβάσιμα από τα ένζυμα και τους μικροοργανισμούς κατά τη διάρκεια της ταυτόχρονης σακχαροποίησης και ζύμωσης. Για να προσπελαστεί αυτό το εμπόδιο και να αυξηθεί η συνολική απόδοση της διεργασίας απαιτείται μια προκατεργασία ρευστοποίησης.

6.1 Βελτιστοποίηση της ρευστοποίησης

Ο κύριος στόχος της διαδικασίας της ρευστοποίησης είναι η μείωση του ιξώδους του υλικού με σκοπό να αυξηθεί η ικανότητα ανάμιξής του. Με αυτό τον τρόπο το ρευστοποιημένο υλικό γίνεται ευκολότερα προσβάσιμο από τα ένζυμα και τους μικροοργανισμούς κατά τη διαδικασία της ταυτόχρονης σακχαροποίησης και ζύμωσης. Σε αυτό το στάδιο το υλικό μετατρέπεται σε μια ρευστή μάζα που περιέχει ικανοποιητικό ποσό διαλυτοποιημένων σακχάρων και ολιγοσακχαριτών. Αξίζει να αναφερθεί πως σκοπός του σταδίου αυτού δεν είναι η βέλτιστη υδρόλυση του υλικού αλλά μια αρχική προϋδρόλυση.

Ο ειδικός αντιδραστήρας ελεύθερης πτώσης (Σχήμα 6.1A) που περιγράφεται στην ενότητα Υλικά και Μέθοδοι, επιτρέπει την επαρκή ανάμιξη του υλικού και έτσι οδηγεί στη μείωση των απαιτήσεων σε ενέργεια. Για την αξιολόγηση της διεργασίας ρευστοποίησης εξετάστηκαν (1) η αρχική συγκέντρωση υλικού, (2) το ενζυμικό φορτίο και (3) ο χρόνος ρευστοποίησης ως προς τη μείωση του ιξώδους του υλικού και την απόδοση σε σάκχαρα.

Προκατεργασμένο άχυρο σίτου (PWS) αρχικής συγκέντρωσης 20%, 26% και 30% ΞΜ εξετάστηκε σε αυτό το στάδιο. Το ιξώδες του υλικού μειώθηκε λόγω της δράσης των λιγνινοκυτταρινολυτικών ενζύμων, τα οποία υδρόλυσαν μερικώς τις ίνες του υποστρώματος.



Σχήμα 6.1: Αντιδραστήρας ελεύθερης πτώσης για την ρευστοποίηση του άχυρου. Α. Σχέδιο CAD (computer-aided design) του αντιδραστήρα - Β. Η ρευστοποίηση του PWS σε 26% ΞΜ, ενζυμικό φορτίο 5 FPU g⁻¹ ΞΜ (Οι φωτογραφίες τραβήχτηκαν κατά τη διάρκεια της ρευστοποίησης (1 ώρα) και στο τέλος της (6 ώρες)).

Στον Πίνακα 6.1 παρουσιάζονται τα αποτελέσματα μείωσης του ιξώδους για όλα τα ενζυμικά φορτία και τους χρόνους προϋδρόλυσης που εξετάστηκαν. Όπως φαίνεται, η μείωση του ιξώδους είναι εμφανής για όλες τις εξεταζόμενες περιπτώσεις.

Πίνακας 6.1: Το ιξώδες του προιατεργασμένου άχυρου σίτου - Η επίδραση του χρόνου ρευστοποίησης και της αρχικής συγκέντρωσης υποστρώματος στη μεταβολή του ιξώδους.

Χρόνος (h)	ΞΜ (%β/β)	Ένζυμα (FPUunits g ⁻¹ ΞΜ)	Αρχικό Ιξώδες (cP)	Τελικό Ιξώδες (cP)
6	20	3	15112 ± 116	3545 ± 105
		5	15052 ± 108	1136 ± 85
		7	15113 ± 122	754 ± 91
	26	3	15508 ± 181	4123 ± 112
		5	15543 ± 142	1626 ± 93
		7	15446 ± 125	1042 ± 86
	30	3	15821 ± 184	8510 ± 110
		5	15813 ± 175	3123 ± 102
		7	15762 ± 203	2200 ± 105
8	20	3	15091 ± 122	3103 ± 94
		5	15119 ± 125	954 ± 82
		7	15052 ± 113	710 ± 64
	26	3	15541 ± 154	3803 ± 121
		5	15503 ± 162	1205 ± 103
		7	15532 ± 146	904 ± 74
	30	3	15904 ± 210	7854 ± 130
		5	15836 ± 198	3125 ± 112
		7	15784 ± 194	2023 ± 91

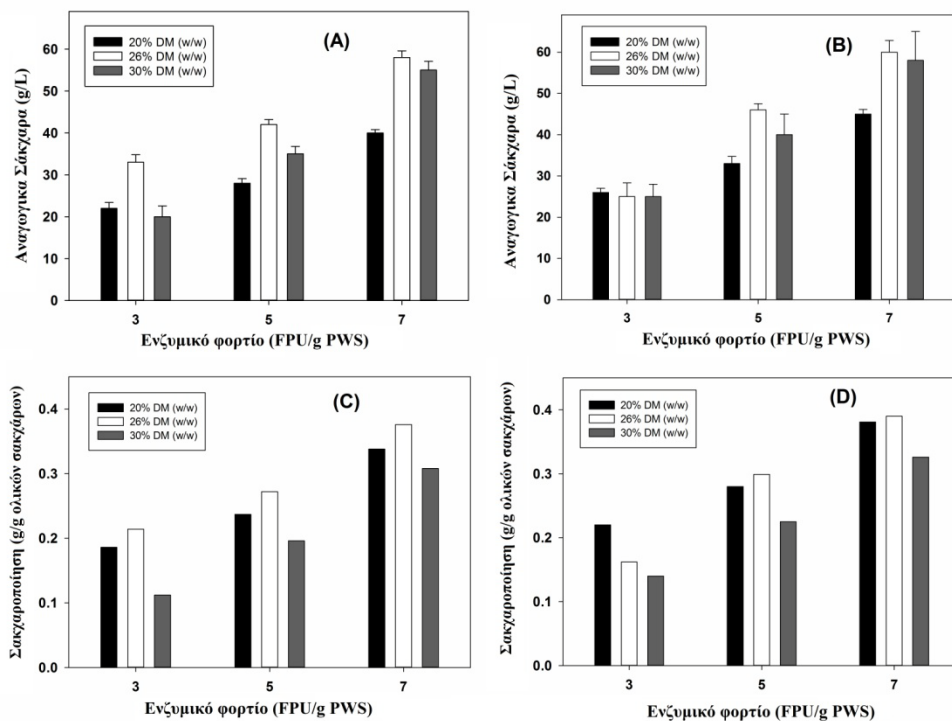
Η αρχική συγκέντρωση του υλικού παίζει σημαντικό ρόλο στον καθορισμό της απόδοσης της ρευστοποίησης. Αυξανόμενης της αρχικής συγκέντρωσης του υποστρώματος παρατηρείται μείωση στο βαθμό ελάττωσης του ιξώδους. Αυτό πιθανώς οφείλεται στη μειωμένη ικανότητα ανάμιξης που συνεπάγεται η αυξημένη συγκέντρωση του υλικού και έχει ως συνέπεια την παρεμπόδιση της δράσης των ενζύμων. Επιπλέον, παρόλο που

τα αδιάλυτα στερεά δεν συσχετίζονται άμεσα με την απόδοση της σακχαροποίησης, έχειδειχθεί ότι η αυξημένη συγκέντρωση του υποστρώματος έχει αρνητική επιρροή στη δράση των ενζύμων εξαιτίας της χαμηλής διαθεσιμότητας σε ελεύθερο νερό που προκαλείται από τα διαλυτά σάκχαρα που ελευθερώνονται (Selig et al., 2012). Η συγκέντρωση του υλικού εμφανίζει ελαφρώς αρνητική επίδραση στη μείωση του ιξώδους, για συγκεντρώσεις έως 26% ΞΜ. Αντιθέτως, όταν η αρχική συγκέντρωση φτάνει το 30%, το αποτέλεσμα είναι πιο έντονο. Όπως φαίνεται στον Πίνακα 6.1, για αρχική συγκέντρωση 30% ΞΜ το τελικό ιξώδες δεν πέφτει κάτω από τα 2000 cP, ανεξαρτήτως του χρόνου προϋδρόλυσης.

Όσον αφορά στο ενζυμικό φορτίο, όπως ήταν αναμενόμενο, η μείωση του ιξώδους αυξάνεται όσο αυξάνεται και το ενζυμικό φορτίο. 5 FPU g⁻¹ ΞΜ είναι αρκετά για να μειώσουν το ιξώδες κάτω από τα 2000 cP για συγκέντρωση υλικού 26% ΞΜ, ενώ απαιτούνται περισσότερα από 7 FPU g⁻¹ ΞΜ για να επιτευχθεί το ίδιο αποτέλεσμα στο 30% ΞΜ. Παρόλο που δεν παρατηρείται μια γραμμική συσχέτιση των αποτελεσμάτων, είναι εμφανές πως το ενζυμικό φορτίο είναι ο καθοριστικός παράγοντας για την επιτυχία της ρευστοποίησης. Στο Σχήμα 6.1B επιδεικνύονται φωτογραφίες της διαδικασίας ρευστοποίησης για 26% ΞΜ με προσθήκη 5 FPU g⁻¹ ΞΜ ενζύμων. Είναι εμφανής η αλλαγή στη μορφή και στο σχήμα του υλικού με την πάροδο του χρόνου της διεργασίας. Αυτό δείχνει το αποτέλεσμα της διαδικασίας ρευστοποίησης.

Το ποσό των σακχάρων που απελευθερώθηκαν κατά τη διαδικασία της ρευστοποίησης επηρεάστηκε επίσης από την αρχική συγκέντρωση και το ενζυμικό φορτίο. Όπως φαίνεται στο Σχήμα 6.2, το ενζυμικό φορτίο είναι ο καθοριστικός παράγοντας για την απελευθέρωση των σακχάρων από το προκατεργασμένο άχυρο σίτου. Όταν η αρχική συγκέντρωση στερεών ξεπέρασε το 26% β/β, το ποσό των διαλυτοποιημένων ελεύθερων σακχάρων

δεν αυξήθηκε κάτι που αντανακλάται επίσης και στο χαμηλό ποσοστό σακχαροποίησης.



Σχήμα 6.2: Ολικά αναγωγικά σάκχαρα (A, B) και απόδοση σακχαροποίησης (C, D) μετά τη ρευστοποίηση. Η ρευστοποίηση πραγματοποιήθηκε στον αντιδραστήρα ελεύθερης πτώσης, σε συγκέντρωση στερεών 20% ΞΜ (μαύρο), 26% ΞΜ (λευκό) και 30% ΞΜ (γκρι). Η διάρκεια της ρευστοποίησης είναι 6 h (A, C) και 8 h (B, D).

Εκτός από τους λόγους που αναφέρθηκαν παραπάνω, η παρεμπόδιση των ενζύμων από τα προϊόντα της υδρόλυσης είναι ένας ακόμη λόγος για τα χαμηλά ποσοστά σακχαροποίησης. Για συγκέντρωση στερεών 30% ΞΜ, η συγκέντρωση των απελευθερωμένων σακχάρων έφτασε τα 60 g L^{-1} . Όπως έχουν δείξει προηγούμενες μελέτες σχετικά με το ίδιο ενζυμικό σκεύασμα που χρησιμοποιείται και στην παρούσα μελέτη, συγκέντρωση γλυκόζης

πάνω από 50 g L⁻¹ παρεμποδίζει σημαντικά τα κυτταρινολυτικά ένζυμα (Andric et al., 2010).

Τέλος, η αύξηση του χρόνου ρευστοποίησης από 6 σε 8 ώρες δεν οδήγησε σε αξιόλογη αύξηση των απελευθερωμένων σακχάρων, ούτε είχε ουσιαστική επίδραση στο ιξώδες.

Από τις τρεις παραμέτρους της διαδικασίας που εξετάστηκαν, η αρχική συγκέντρωση υποστρώματος και το ενζυμικό φορτίο έδειξαν να έχουν σημαντική επίδραση στο τελικό ιξώδες και τη σακχαροποίηση του υλικού. Αντίθετα, οι 6 ώρες προϋδρόλυσης φαίνονται να είναι ικανοποιητικές. Επίσης, η βέλτιστη αρχική συγκέντρωση 26% ΞΜ δεν φαίνεται να συσχετίζεται με το ποσό του ενζυμικού φορτίου. Για όλες τις περιπτώσεις που εξετάστηκαν βρέθηκε ότι το ενζυμικό φορτίο των 3 FPU g⁻¹ ΞΜ δεν είναι αρκετό για την ικανοποιητική μείωση του ιξώδους και την απόδοση σε σάκχαρα ακόμα και μετά από 8 ώρες προϋδρόλυσης. Αντίθετα, με την χρησιμοποίηση 5 FPU g⁻¹ ΞΜ φαίνεται να μπορεί να επιτευχθεί ικανοποιητική μείωση του ιξώδους και απελευθέρωση σακχάρων. Σε όλες τις περιπτώσεις, βρέθηκε ότι υπάρχει μια ανάλογη αύξηση των απελευθερωμένων σακχάρων με την αύξηση του ενζυμικού φορτίου. Αυτό όμως ισχύει για χαμηλά ενζυμικά φορτία, καθώς έχει δειχθεί στη βιβλιογραφία (Xiros et al., 2009 ; Viikari et al., 2012) πως ενζυμικά φορτία πάνω από 20 FPU g⁻¹ ΞΜ δεν οδηγούν σε γραμμική αύξηση των σακχάρων. Όμως, η χρήση της βέλτιστης δοσολογίας των ενζύμων είναι μια διελκυστίδα ανάμεσα στο ποσοστό σακχαροποίησης και στο κόστος της διεργασίας, καθώς το κόστος των ενζύμων είναι από τους καθοριστικότερους παράγοντες του κόστους της ολικής διεργασίας (Viikari et al., 2012).

6.2 Επίδραση του ενζυμικού συστήματος του *F. oxysporum* στη ζύμωση του ρευστοποιημένου αχύρου από τον *S. cerevisiae*

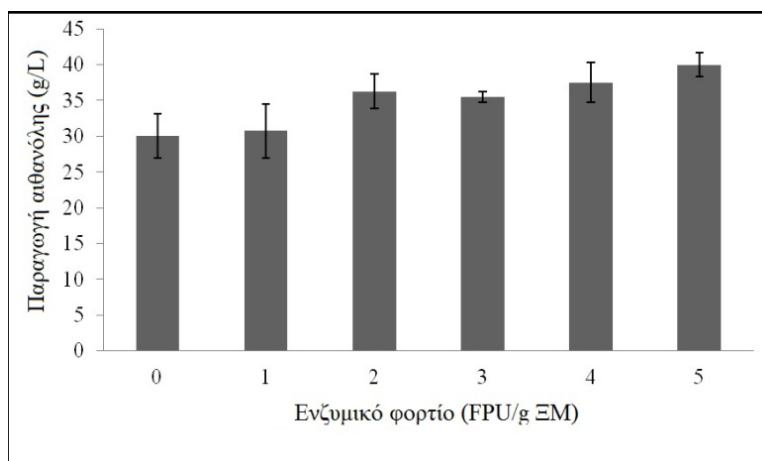
Μετά την επιτυχή ρευστοποίηση του αχύρου εξετάζεται η ζύμωσή του για την παραγωγή βιοαιθανόλης. Όπως αναφέρεται και στην προηγούμενη παράγραφο, σκοπός του σταδίου αυτού ήταν η ρευστοποίηση και μείωση του ιξώδους του υλικού κάτι που πραγματοποιήθηκε με επιτυχία. Όμως, φάνηκε και προηγουμένως πως η υδρόλυση του υλικού δεν έχει ολοκληρωθεί στο προηγούμενο στάδιο. Παρόλο που το PWS είναι πλούσιο σε κυτταρίνη περιέχει και ένα ποσοστό ημικυτταρίνης. Μετά την ρευστοποίηση μόνο το 37% των ολικών υδατανθράκων υδρολύθηκε, κάτι που σημαίνει πως το υπόλοιπο 63% μένει να αξιοποιηθεί. Αυτό το αποτέλεσμα συνάδει με αποτελέσματα άλλων βιβλιογραφικών μελετών, σχετικών με την ρευστοποίηση του άχυρου, όπου μόνο το 32% και 49% της κυτταρίνης και ημικυτταρίνης αντίστοιχα μετατράπηκε σε διαλυτά σάκχαρα μετά από 24 ώρες προϋδρόλυσης (Jorgensen et al., 2007). Η ίδια μελέτη αναφέρει ότι η συγκέντρωση της ξυλόζης παρέμεινε σταθερή σε όλη τη διάρκεια της ταυτόχρονης σακχαροποίησης και ζύμωσης, κάτι που δείχνει ότι η ημικυτταρίνη δεν υδρολύθηκε περαιτέρω σε αυτό το στάδιο. Για να μπορέσει να αξιοποιηθεί το PWS με έναν πιο αποδοτικό τρόπο απαιτείται ένα ενζυμικό σύστημα ικανό να υδρολύει την κυτταρίνη και την ημικυτταρίνη. Έτσι θα μπορέσει να αυξηθεί και η ολική απόδοση της διεργασίας, όχι μόνο από την μετατροπή της ξυλόζης σε αιθανόλη αλλά και γιατί η παρουσία της ξυλάνης παρεμποδίζει την υδρόλυση της κυτταρίνης (Viikari et al., 2012). Ο ρυθμός της ενζυμικής υδρόλυσης της κυτταρίνης βρέθηκε ότι επηρεάζεται αρνητικά ακόμα και υπό την παρουσία υπολειμμάτων ξυλάνης στα προκατεργασμένα λιγνινοκυτταρινούχα υλικά (Viikari et al., 2012). Οι Zhang et al. (2011), χρησιμοποιώντας

προκατεργασμένο άχυρο σίτου ως πρώτη ύλη, ανακάλυψαν ότι η προσθήκη ξυλανασών οδηγεί σε συνεργιστική δράση με της κυτταρινάσες για την επιτυχή υδρόλυση της πρώτης ύλης. Σύμφωνα με την παραπάνω μελέτη, οι ξυλανάσες απαιτούνται για την επιτυχή έκθεση των μικροϊνιδίων της κυτταρίνης τα οποία είναι συνήθως καλυμμένα από ημικυτταρίνη (Zhang et al., 2011).

Το ενζυμικό σύστημα που εκκρίνεται από τον μύκητα *F. oxysporum* είναι πλούσιο σε κυτταρινάσες αλλά και ημικυτταρινάσες, που μπορούν να ενισχύσουν την υδρόλυση του υλικού κατά το στάδιο της ταυτόχρονης σακχαροποίησης και ζύμωσης (Christakopoulos et al., 1991 ; Christakopoulos et al., 1995 ; Christakopoulos et al., 1996 ; Panagiotou et al., 2003 ; Panagiotou et al., 2005a ; Xiros et al., 2009). Η αναλογία ξυλανάσης στο ενζυμικό εκχύλισμα αντιστοιχεί σε 65 Units ανά 1 FPU ολικής κυτταρινολυτικής ενεργότητας. Επιπλέον, το ενζυμικό μίγμα του *F. oxysporum* περιέχει πολλά βοηθητικά ένζυμα τα οποία είναι απαραίτητα για την αποδόμηση των ολιγοσακχαριτών σε μονομερή σάκχαρα (Viikari et al., 2012). Τέλος, τα ένζυμα αυτά είναι περισσότερο ενεργά στην θερμοκρασία της ζύμωσης (30°C) συγκριτικά με τα εμπορικά ένζυμα που χρησιμοποιούνται στην προϋδρόλυση, ως συνέπεια της χαμηλότερης βέλτιστης θερμοκρασίας δράσης τους (40 °C) (Xiros et al., 2009). Επίσης, όπως αποδείχθηκε και σε προηγούμενο κεφάλαιο της παρούσας εργασίας, τα ένζυμα του *F. oxysporum* επηρεάζονται εξίσου με τα εμπορικά ένζυμα από την αιθανόλη σε θερμοκρασία 30 °C.

Έτσι, σε αυτό το στάδιο εξετάζεται η δυνατότητα προσθήκης των ενζύμων του μύκητα *F. oxysporum* με σκοπό να συνδράμουν τα ήδη υπάρχοντα ένζυμα από το στάδιο της προϋδρόλυσης. Στα προηγούμενα κεφάλαια της παρούσας διατριβής αλλά και σε άλλες βιβλιογραφικές πηγές (Panagiotou et al., 2005 ; Xiros et al., 2009 ; Panagiotou et al., 2011) έχει

δειχθεί ότι το ενζυμικό σύστημα του *F. oxysporum* είναι ικανό να υδρολύει τα λιγνικοκυτταρινούχα υλικά και ειδικά το άχυρο σίτου, ακόμα και στη θερμοκρασία της ζύμωσης (30 °C).



Σχήμα 6.3: Επίδραση των ενζύμων του *F. oxysporum* στη ζύμωση του ρευστοποιημένου (5 FPU g⁻¹ ΞΜ, 6 ώρες, 26% ΞΜ) αχύρου από τον *S. cerevisiae*.

Για να εξεταστεί η συνεισφορά των ενζύμων, ενζυμικό φορτίο 0 έως 5 FPU g⁻¹ ΞΜ μαζί με 5 mg g⁻¹ ΞΜ ξηρής ζύμης αρτοποιίας προστέθηκε στην αρχή της ταυτόχρονης σακχαροποίησης και ζύμωσης του ρευστοποιημένου αχύρου σε συγκέντρωση 26% ΞΜ. Βρέθηκε ότι η προσθήκη των ενζύμων έχει θετική επίδραση στην απόδοση της ζύμωσης. Τα αποτελέσματα παρουσιάζονται στο Σχήμα 6.3. Η προσθήκη 5 FPU g⁻¹ ΞΜ ενζυμικού φορτίου οδήγησε στην αύξηση της απόδοσης σε αιθανόλη κατά 33%. Αντίστοιχα θετική επίδραση στην απόδοση της ζύμωσης είχε και η προσθήκη μικρότερου ενζυμικού φορτίου, όπου βλέπουμε ότι με την προσθήκη 1, 2, 3 και 4 FPU g⁻¹ ΞΜ η απόδοση της ζύμωσης αυξήθηκε κατά 2.5%, 10%, 18%, και 25% αντίστοιχα.

6.3 Μελέτη της ταυτόχρονης σακχαροποίησης και ζύμωσης του ρευστοποιημένου αχύρου με συν-καλλιέργεια *F. oxysporum* και *S. cerevisiae*

Πολλές βιβλιογραφικές αναφορές μελετούν την παρεμποδιστική δράση των ελεύθερων σακχάρων (κυρίως της γλυκόζης) στις κυτταρινάσες διαφόρων μικροοργανισμών, μεταξύ των οποίων οι *F. oxysporum* και *T. reesei* (Enari and Suihko, 1983 ; Ferchak and Pye 1983 ; Alfani et al., 2000 ; Xiros et al., 2009 ; Andric et al., 2010 ; Viikari et al., 2012 ; Koppam et al., 2014). Αν και τα προσφάτως αναπτυγμένα εμπορικά ενζυμικά συστήματα δεν φαίνεται να παρεμποδίζονται το ίδιο από τα τελικά προϊόντα της υδρόλυσης (Xiros and Olsson, 2014), δεν είναι ακόμα ευρέως διαδεδομένα. Για πολύ καιρό η ταυτόχρονη σακχαροποίηση και ζύμωση είναι η προτιμώμενη διεργασία παραγωγής βιοαιθανόλης, λόγω της δυνατότητας που παρέχει να μειώνεται η ανωτέρω παρεμπόδιση μέσω του άμεσου μεταβολισμού των παραγόμενων σακχάρων. Η απομάκρυνση των σακχάρων διασφαλίζει ότι τα ένζυμα θα συνεχίζουν την υδρόλυση καθ' όλη τη διάρκεια της ζύμωσης.

Ο *S. cerevisiae* μπορεί να μεταβολίσει τη γλυκόζη με πολύ γρήγορο ρυθμό, διασφαλίζοντας τη μειωμένη παρεμποδιστική της δράση. Όμως, καθώς τα φυσικά στελέχη του μικροοργανισμού αυτού δεν μπορούν να μεταβολίσουν την ξυλόζη, δημιουργείται η ανάγκη για την παρουσία ενός μεταβολικού συστήματος που θα μπορεί να μετατρέπει την ξυλόζη σε αιθανόλη, αφαιρώντας την παρεμποδιστική της δράση αλλά κυρίως αυξάνοντας την απόδοση της διεργασίας σε αιθανόλη.

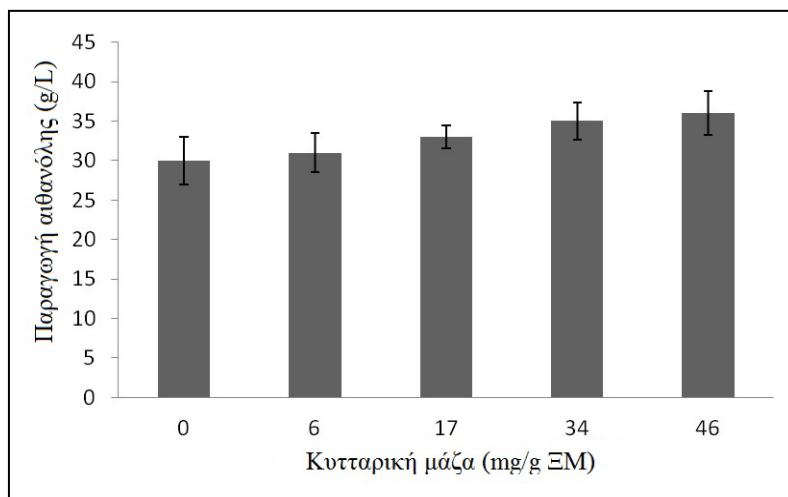
Για αυτό το λόγο έχουν αναπτυχθεί δυο διακριτές στρατηγικές. Η πρώτη αφορά στη δημιουργία γενετικά τροποποιημένων μικροοργανισμών (κυρίως *S. cerevisiae*) που μπορούν να μεταβολίσουν τη γλυκόζη και την ξυλόζη

(Olsson and Hahn-Hagerdal, 1996 ; Dien et al., 2000 ; Zaldivar et al., 2001 ; Van Leeuwenhoek, 2006 ; Parawira et al., 2011 ; Demeke et al., 2013). Η δεύτερη προσέγγιση, που υιοθετείται και στην παρούσα διατριβή, αφορά στη ζύμωση με την χρήση δυο μικροοργανισμών, του *S. cerevisiae* και ενός μικροοργανισμού που μπορεί να ενισχύσει τη ζύμωση μεταβολίζοντας και την ξυλόζη (εδώ *F. oxysporum*). Τέτοια συστήματα έχουν μελετηθεί και στη βιβλιογραφία και δείχνουν ότι οι συν-καλλιέργειες μυκήτων και ζύμης οδηγούν σε καλύτερη αξιοποίηση της πρώτης ύλης (Mamma et al., 1996 ; Olsson and Hahn-Hagerdal, 1996 ; Panagiotou et al., 2005b ; Eiteman et al., 2008 ; Chandel et al., 2011 ; Tang et al., 2011 ; Dogaris et al., 2012 ; Erdei et al., 2013).

Σε αυτή την θεωρητική βάση και προκειμένου να εξεταστεί η δυνατότητα του *F. oxysporum* να «βοηθήσει» τον *S. cerevisiae* στη ζύμωση του ρευστοποιημένου PWS σχεδιάστηκε το ακόλουθο πείραμα. Έτσι, κύτταρα του *F. oxysporum* που είχαν προηγουμένως αναπτυχθεί σε μίγμα γλυκόζης και ξυλόζης (1/1) ως πηγή άνθρακα, προστέθηκαν στην αρχή της ζύμωσης μαζί με 5 mg g⁻¹ EM *S. cerevisiae*. Χρησιμοποιήθηκαν έως και 46 mg κυττάρων του *F. oxysporum* g⁻¹ EM. Τα αποτελέσματα παρουσιάζονται στο Σχήμα 6.4, όπου είναι εμφανές πως με την προσθήκη του μύκητα στη μέγιστη συγκέντρωση επιτυγχάνεται βελτίωση της ζύμωσης κατά 16.5%.

Αυτό το αποτέλεσμα δείχνει πως μόνο η προσθήκη κυττάρων του μύκητα δεν είναι αρκετή για να δώσει αξιόλογη βελτίωση της ζύμωσης. Η βελτίωση που προέκυψε από την προσθήκη των κυττάρων του *F. oxysporum* ήταν μικρότερη από αυτή που προέκυψε με την προσθήκη ενζύμων του μύκητα και εμφανίστηκε με την προσθήκη υψηλής συγκέντρωσης κυττάρων. Αυτό μπορεί να εξηγηθεί από την μικρή ποσότητα των απαραίτητων ημικυτταρινολυτικών ενζύμων στο εμπορικό ενζυμικό σκεύασμα που χρησιμοποιήθηκε στην προϋδρόλυση και δεν οδήγησε στην ικανοποιητική

μετατροπή της ημικυτταρίνης. Για να ελεγχθεί αυτή η υπόθεση σχεδιάστηκε το πείραμα της παρακάτω παραγράφου όπου γίνεται συνδυασμένη προσθήκη κυττάρων και ενζύμων του μύκητα *F. oxysporum*.

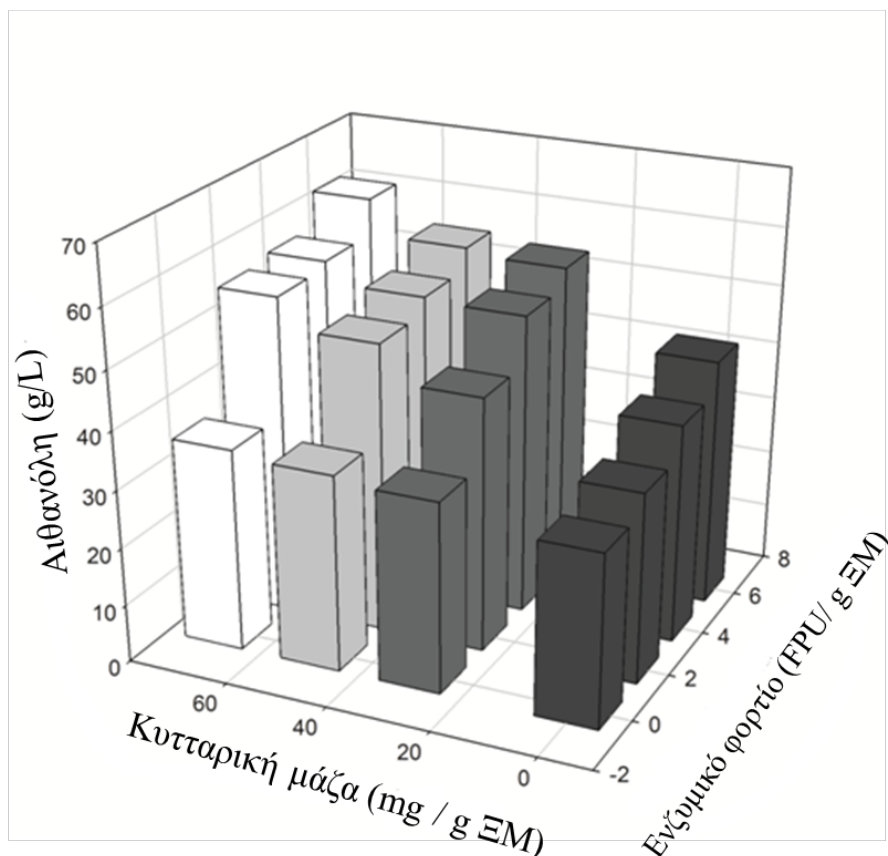


Σχήμα 6.4: Επίδραση της κυτταρικής μάζας του *F. oxysporum* στη ζύμωση του ρευστοποιημένου (5 FPU g⁻¹ ΞΜ, 6 ώρες, 26% ΞΜ) αχύρου μαζί με τον *S. cerevisiae*.

6.4 Συνδυασμένη επίδραση του συστήματος του *F. oxysporum* σε μικτή καλλιέργεια με τον *S. cerevisiae*

Με βάση τα προηγούμενα αποτελέσματα, σε αυτό το στάδιο γίνεται μελέτη της προσθήκης συνδυασμού ενζύμων και κυττάρων του μύκητα *F. oxysporum* (Σχήμα 6.5). Τα ένζυμα, όπως φάνηκε και προηγουμένως, ενισχύουν τη σακχαροποίηση ενώ τα κύτταρα του μικροοργανισμού συνεισφέρουν είτε στην παραγωγή αιθανόλης είτε στην παραγωγή νέων ενζύμων. Η προσθήκη ενζύμων και κυττάρων του *F. oxysporum* στη διεργασία οδήγησε σε αύξηση της παραγωγής αιθανόλης. Συγκεκριμένα, για τη μέγιστη προσθήκη ενζύμων και κυττάρων μετρήθηκε τελική

συγκέντρωση αιθανόλης 62 g L^{-1} , η οποία αντιστοιχεί σε 0.44 g αιθανόλης g^{-1} κυτταρίνης και ημικυτταρίνης που υπάρχουν στο υλικό. Με βάση την ολική ποσότητα υδατανθράκων στο υλικό, αυτό αντιστοιχεί σε μετατροπή σχεδόν του 80% της κυτταρίνης και ημικυτταρίνης σε αιθανόλη.

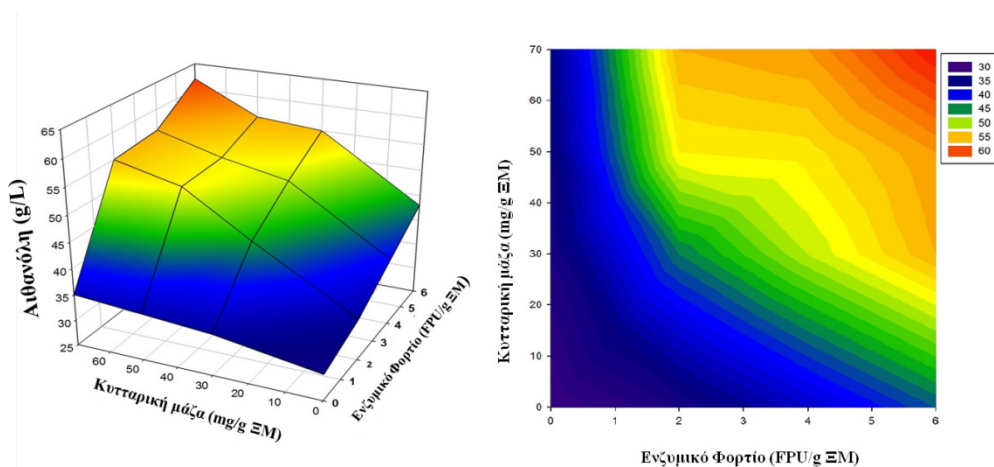


Σχήμα 6.5: Επίδραση της συνδυασμένης προσθήκης ενζύμων και κυτταρικής μάζας του μύκητα *F. oxysporum* στην παραγωγή αιθανόλης από το ρευστοποιημένο ($5 \text{ FPU g}^{-1} \text{ EM}$, 6 ώρες, 26% EM) άχυρο.

Στο Σχήμα 6.6 παρουσιάζεται η τρισδιάστατη απεικόνιση και η ισοϋψής καμπύλη, δείχνοντας ότι όταν τα ένζυμα και τα κύτταρα του *F. oxysporum* προστεθούν μαζί στο σύστημα έχουν θετική απόκριση στην παραγωγή αιθανόλης. Σε αυτό το σημείο αξίζει να σημειωθεί πως αν και η προσθήκη του συστήματος του μύκητα οδήγησε σε αύξηση της καθαρής παραγωγής

αιθανόλης, δεν μείωσε το χρόνο επίτευξης του αποτελέσματος. Αυτό συνάδει με ήδη γνωστά ερευνητικά δεδομένα που αποδεικνύουν την αργή μεταβολική δράση του μύκητα *F. oxysporum* (Mamma et al., 1996 ; Panagiotou et al., 2005b ; Xiros et al., 2009 ; Panagiotou et al., 2011).

Συγκριτικά, άλλα βιβλιογραφικά δεδομένα (Olofsson et al., 2010) που χρησιμοποιούν το άχυρο σίτου ως πρώτη ύλη για την παραγωγή αιθανόλης σε διεργασία ημι-διαλείποντος έργου αναφέρουν απόδοση στην παραγωγή αιθανόλης της τάξεως των 0.35 g g^{-1} .



Σχήμα 6.6: Επίδραση της συνδυασμένης προσθήκης ενζύμων και κυτταρικής μάζας του μύκητα *F. oxysporum* στην παραγωγή αιθανόλης από το ρευστοποιημένο ($5 \text{ FPU g}^{-1} \text{ EM}$, 6 ώρες, 26% EM) άχυρο - Τριδιάστατη απεικόνιση και ισούψης καμπύλη.

Σε προηγούμενη παράγραφο αναφέρθηκε ότι η προσθήκη μόνο κυττάρων του μύκητα δεν έχει αξιόλογο αποτέλεσμα στην παραγωγή αιθανόλης, όταν δεν γίνεται προσθήκη ενζύμων κατά τη ζύμωση. Αυτό μπορεί να εξηγηθεί δεδομένου ότι ο μύκητας έχει πολύ αργό ρυθμό κατανάλωσης της γλυκόζης προς παραγωγή αιθανόλης, συγκριτικά με τη ζύμη που συνυπάρχει στην καλλιέργεια. Έτσι, η συνεισφορά του μύκητα περιορίζεται στον μεταβολισμό της απελευθερωμένης ξυλόζης και στη μικρή παραγωγή νέων

ενζύμων. Εδώ, είναι σημαντικό να αναφερθεί πως η διεργασία της ταυτόχρονης σακχαροποίησης και ζύμωσης πραγματοποιείται σε συνθήκες μικρο-αερόβιας κατάστασης, δηλαδή υπάρχει περιορισμένη παρουσία οξυγόνου στο σύστημα. Αυτό επιτρέπει στα κύτταρα την πιθανή παραγωγή μικρής ποσότητας νέων ενζύμων. Έτσι, μπορεί να θεωρηθεί πως η θετική επίδραση στην παραγωγή αιθανόλης που παρουσιάζεται με την συνδυασμένη προσθήκη ενζύμων και κυττάρων οφείλεται στην απελευθέρωση και κατανάλωση της ξυλόζης από το σύστημα του *F. oxysporum*.

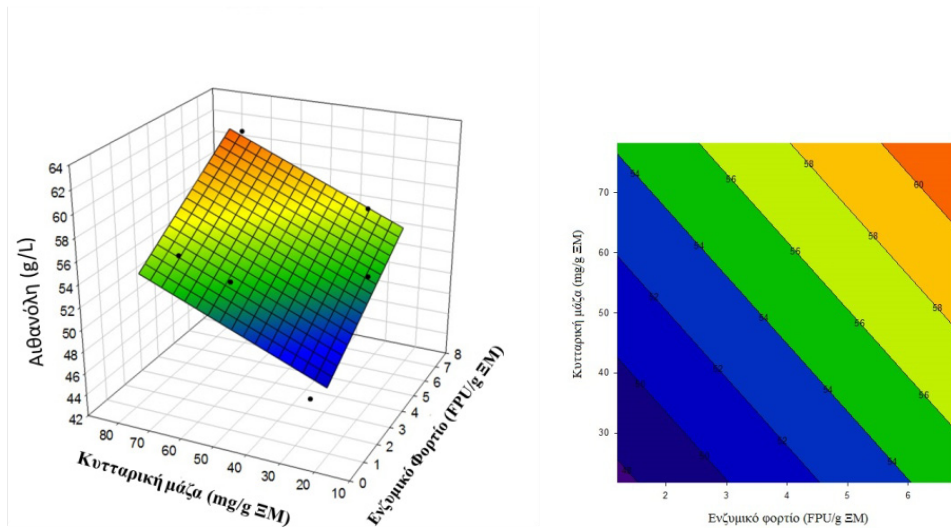
Τέλος, για να παρουσιαστεί μια ακριβέστερη απόδοση της επίδρασης των ενζύμων και των κυττάρων του μύκητα στη διεργασία, σχεδιάστηκε ο παρακάτω παραγοντικός πειραματικός σχεδιασμός (Πινάκας 6.2). Με βάση αυτόν το σχεδιασμό έγινε προσπάθεια να αναπτυχθεί το μαθηματικό μοντέλο που περιγράφει τη σχέση της προσθήκης ενζύμων και κυττάρων με την τελική παραγωγή αιθανόλης. Από τα δεδομένα προέκυψε ότι η γραμμική σχέση (Σχήμα 6.7) συνδέει τόσο την παρουσία ενζύμων όσο και κυττάρων στο σύστημα. Η Εξίσωση 6 που προκύπτει από το τροποποιημένο μοντέλο για γραμμική συσχέτιση είναι η ακόλουθη:

$$\text{EtOH (g/L)} = 43,35 + 1,33 \cdot \text{FPU/g } \Xi\text{M} + 0,12 \cdot \text{C}_{\text{κυττάρων}} \text{ (mg/g } \Xi\text{M)} \quad [\text{Εξ. 6}]$$

Τα παραπάνω πειραματικά αποτελέσματα αναδεικνύουν τη χρησιμότητα της συνδυασμένης ικανότητας του μύκητα *F. oxysporum* να παράγει και να εκκρίνει λιγνινοκυτταρινολυτικά ένζυμα για την υδρόλυση και να μεταβολίζει τα παραγόμενα σάκχαρα σε αιθανόλη.

Πίνακας 6.2: Παραγοντικός πειραματικός σχεδιασμός για την επίδραση της κυτταρικής μάζας και του ενζυμικού συστήματος του *F. oxysporum* στην παραγωγή αιθανόλης από μικτή καλλιέργεια του μύκητα με τη ζύμη *S. cerevisiae*.

Συνθήκη	Κωδικοποιημένα επίπεδα		Παράγοντα επίπεδα		Αιθανόλη (g/L)
	(X1= FPU/g ΞΜ, X2=Κύτταρα mg/g ΞΜ)		(X1= FPU/g ΞΜ, X2=Κύτταρα mg/g ΞΜ)		
	X1	X2	X1	X2	P
1	-1	-1	2	30	44,8
2	1	-1	6	30	57,2
3	-1	1	2	70	55,3
4	1	1	6	70	62,4
5	0	0	4	50	52,2
6	0	0	4	50	53,3
7	-1.414	0	1,2	50	55,0
8	1.414	0	6,8	50	56,1
9	0	-1.414	4	21,8	53,7
10	0	1.414	4	78,2	55,9
11	0	0	4	50	52,7



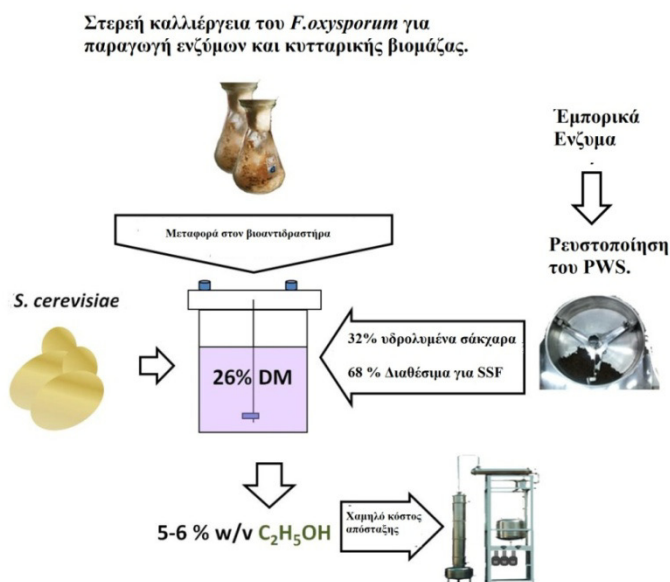
Σχήμα 6.7: Επιφάνεια απόκρισης και ισοϋψής καμπύλη της επίδρασης της κυτταρικής μάζας και του ενζυμικού φορτίου του μύκητα *F. oxysporum* στην παραγωγή αιθανόλης από μικτή καλλιέργεια του μύκητα με τη ζύμη *S. cerevisiae*.

6.5 Ταυτόχρονη σακχαροποίηση και ζύμωση του ρευστοποιημένου αχύρου με μικτή καλλιέργεια *F. oxysporum* και *S. cerevisiae*

Τα αποτελέσματα των προηγούμενων παραγράφων αναδεικνύουν την δυνατότητα της αξιοποίησης του μύκητα *F. oxysporum* σε μια ολοκληρωμένη διεργασία παραγωγής βιοαιθανόλης. Όμως, η προσέγγιση που χρησιμοποιήθηκε στα προηγούμενα οδηγεί στην ανάγκη για πρόσθετη κατεργασία των καλλιεργειών του μύκητα πριν από την αξιοποίησή τους. Τα ένζυμα πρέπει να παραχθούν σε ξεχωριστό αντιδραστήρα απ' ό,τι τα κύτταρα και απαιτείται ο διαχωρισμός τους από τη στερεή φάση και μετέπειτα η συμπύκνωσή τους. Αντίστοιχα, τα κύτταρα πρέπει να παραχθούν με τη χρήση καθαρών πηγών άνθρακα (γλυκόζη - ξυλόζη), να συλλεχθούν και να φυγοκεντρηθούν πριν τη χρήση τους. Όλες αυτές οι διαδικασίες οδηγούν σε αύξηση του λειτουργικού κόστους και του κόστους εγκατάστασης μιας

διεργασίας σε βιομηχανικό επίπεδο. Για να είναι εφικτή η αξιοποίηση των παραπάνω αποτελεσμάτων θα ήταν ουσιώδες κάποιες από τις παραπάνω διεργασίες και η απαίτηση καθαρών πηγών σακχάρων να εξαλειφθούν.

Λαμβάνοντας υπόψη τα παραπάνω σχεδιάστηκε μια διεργασία (Σχήμα 6.8) όπου αξιοποιούνται όλες οι ιδιότητες του μύκητα *F. oxysporum* σε μικτή καλλιέργεια με τον *S. cerevisiae*.



Σχήμα 6.8: Ενοποιημένη διεργασία Ταυτόχρονης Σακχαροποίησης και Ζύμωσης του PWS σε μικτή καλλιέργεια *S. cerevisiae* και *F. oxysporum*.

Έτσι, αντί για τη χρήση καθαρών ενζύμων και κυττάρων, στο PWS προστέθηκαν στην αρχή της ζύμωσης βυθισμένη ή στερεή καλλιέργεια του μύκητα μαζί με την ζύμη. Αυτό μειώνει την ανάγκη για επεξεργασία των καλλιεργείων. Επίσης, σε αυτή την περίπτωση τα ένζυμα και τα κύτταρα του μύκητα παράγονται σε ένα στάδιο. Ο συνδυασμός των καλλιεργείων του μύκητα με τον υψηλό βαθμό απόδοσης της ζύμης στην παραγωγή αιθανόλης απέδωσαν ιδιαίτερα σημαντικά αποτελέσματα.

Λαμβάνοντας υπόψη την παραγωγή ενζυμικών ενεργοτήτων του μύκητα, τόσο αυτών που αναφέρονται στη βιβλιογραφία (Xiros et al., 2008a ; Xiros et al., 2009) όσο και αυτών που μετρήθηκαν στην παρούσα μελέτη και με απώτερο σκοπό τη διατήρηση σταθερού ενζυμικού φορτίου, 7 FPU εμπορικών ενζύμων χρησιμοποιήθηκαν κατά το στάδιο της προϋδρόλυσης. Οι δυο προσεγγίσεις (βυθισμένη - στερεή καλλιέργεια) συγκρίθηκαν και αξιολογήθηκαν με βάση την τελική παραγωγή σε αιθανόλη.

Η στερεή καλλιέργεια του *F. oxysporum* επιτρέπει την παραγωγή υψηλότερης συγκέντρωσης ενζύμων και κυτταρικής βιομάζας (Xiros et al., 2008a). Αυτό είχε σαν αποτέλεσμα να οδηγούμαστε σε σημαντικά μεγαλύτερη προσθήκη ενζύμων και κυτταρικής μάζας με τη χρήση της στερεής καλλιέργειας (Πίνακας 6.3).

Πίνακας 6.3: Επίδραση προσθήκης καλλιεργειών του *F. oxysporum* στη ζύμωση του PWS.

ΞΜ (%)	Είδος καλλιέργειας	Προσθήκη στο SSF		Παραγωγή αιθανόλης (144 h)		
		Ένζυμα (FPU/g ΞΜ)	Βιομάζα (mg/g ΞΜ)	Αιθανόλη % (β/β)	% αύξηση	% θεωρητικού
26	Βυθισμένη	0.70	15.9	5.2	+11	67
26	Στερεή	1.23	154	5.8	+19	75

Όταν χρησιμοποιήθηκε βυθισμένη καλλιέργεια του μύκητα, 0,7 FPU g⁻¹ ΞΜ και 16 mg g⁻¹ ΞΜ ήταν η μεγαλύτερη ποσότητα ενζύμων και κυτταρικής μάζας αντίστοιχα που μπόρεσε να εισαχθεί στο σύστημα. Αντίθετα, στην

περίπτωση της στερεής καλλιέργειας 1.23 FPU g⁻¹ ΞΜ ενζύμων και 154 mg g⁻¹ ΞΜ βιομάζας ήταν δυνατό να μεταφερθούν στο σύστημα.

Και στις δύο περιπτώσεις μετρήθηκε αύξηση της παραγωγής αιθανόλης. Για 26% β/β ΞΜ και μετά από 144 ώρες ζύμωσης, μετρήθηκε 11% και 19% αύξηση στη συγκέντρωση της αιθανόλης στο μίγμα για την βυθισμένη και την υγρή καλλιέργεια αντίστοιχα. Η σύγκριση έγινε με τα αποτελέσματα της ζύμωσης του ίδιου υλικού από τον *S. cerevisiae*, χωρίς την προσθήκη καλλιέργειας του *F. oxysporum*. Η συγκέντρωση αιθανόλης που μετρήθηκε στην περίπτωση προσθήκης στερεής καλλιέργειας του μύκητα (58 g kg⁻¹) αντιστοιχεί σε 0.41 g αιθανόλης g⁻¹ συνολικής κυτταρίνης και ημικυτταρίνης και είναι από τις μεγαλύτερες που έχουν αναφερθεί στη βιβλιογραφία για ζυμώσεις άχυρου σίτου με τη χρήση αντίστοιχων ενζυμικών σκευασμάτων (Jorgensen et al., 2007 ; Larsen et al., 2008 ; Tomas-Pejo et al., 2008 ; Panagiotou et al., 2011 ; Viikari et al., 2012 ; Cannella and Jorgensen, 2013).

Εδώ πρέπει να αναφερθεί ό π για την εξαγωγή της από δο σης λήφθηκε υπόψη μόνο η συγκέντρωση του PWS σε κυτταρίνη και ημικυτταρίνη. Θεωρώντας πως το μεγαλύτερο ποσοστό των υδατανθράκων που υπήρχαν στις πηγές άνθρακα των καλλιεργειών του *F. oxysporum* καταναλώθηκαν κατά την αερόβια φάση ανάπτυξης και παραγωγής ενζύμων. Όμως, σε κάθε περίπτωση και αν οι υπολογισμοί γίνουν με δεδομένο ότι δεν έχει καταναλωθεί καθόλου κυτταρίνη και ημικυτταρίνη κατά τη φάση ανάπτυξης (ακραίο σενάριο), ο συντελεστής απόδοσης γίνεται 0.37 g αιθανόλης g⁻¹ ολικής κυτταρίνης και ημικυτταρίνης σε όλες τις πηγές άνθρακα.

Στον Πίνακα 6.4 γίνεται σύγκριση της παρούσας μελέτης με αντίστοιχες βιβλιογραφικές μελέτες.

Πίνακας 6.4: Σύγκριση διεργασιών παραγωγής αιθανόλης από υδροθερμικά κατεργασμένο και ρευστοποιημένο άχυρο σίτου.

% ΞΜ	Ρευστοποίηση (h)	Ενζυμικό φορτίο στη ρευστοποίηση (FPU g ⁻¹ ΞΜ)	Προσθήκη ενζύμων στη ζύμωση (FPU g ⁻¹ ΞΜ)	Αιθανόλη (g/kg)	% Μέγιστου θεωρητικού	Αναφορά
26	7	7 CN	1.23 (<i>F. oxysporum</i>)	58	75*	Παρούσα μελέτη
25	24	7 CN	όχι	33	46**	Jorgensen et al., 2007
35	8	7 CN	όχι	48	47**	Jorgensen et al., 2007
20	24	7.5 CN	όχι	38	65**	Cannella and Jorgensen, 2013
30	24	7.5 CN	όχι	34	38**	Cannella and Jorgensen, 2013
20	24	7.5 Ctec2	όχι	55	84**	Cannella and Jorgensen, 2013
30	24	7.5 Ctec 2	όχι	50	62**	Cannella and Jorgensen, 2013

* CN: Celluclast 1.5L και Novozyme188 ; Ctec2: Cellic Ctec2 ; ** Βάσει της ολικής κυτταρίνης και ημικυτταρίνης ; *** Βάσει της ολικής κυτταρίνης

Οι Jorgensen et al. (2007) εισάγοντας μια όμοια διεργασία ρευστοποίησης και με τη χρήση ενζυμικού φορτίου $7 \text{ FPU g}^{-1} \text{ ΞΜ}$ αναφέρουν μέγιστη συγκέντρωση αιθανόλης 33 g kg^{-1} σε 25% ΞΜ και 48 g kg^{-1} σε 35% ΞΜ. Παρομοίως, οι Cannella and Jorgensen (2013) πέτυχαν συγκέντρωση αιθανόλης 55 g kg^{-1} σε 30% ΞΜ, χρησιμοποιώντας και αυτοί μια διεργασία ταυτόχρονης σακχαροποίησης και ζύμωσης με ένα σταδιο ρευστοποίησης διάρκειας 24 ωρών και τη χρήση ενός πιο εξελιγμένου ενζυμικού σκευάσματος (Cellic Ctec 2 ; $7.5 \text{ FPU g}^{-1} \text{ ΞΜ}$).

Η συγκριτική μελέτη όλων των ανωτέρω αποτελεσμάτων δείχνει ότι ο χρόνος ρευστοποίησης δεν είναι τόσο καθοριστικός παράγοντας όσο το είδος και το φορτίο των ενζύμων που χρησιμοποιούνται στην ρευστοποίηση και την ταυτόχρονη σακχαροποίηση και ζύμωση. Αντιθέτως, η απόδοση της σακχαροποίησης μειώνεται αισθητά για συγκεντρώσεις στερεών άνω του 30% ΞΜ σχεδόν σε όλες τις περιπτώσεις. Έτσι, η παρουσία ενός πολύ-ενζυμικού συστήματος όπως αυτό του *F. oxysporum* είναι σημαντικός παράγοντας στη βιομετατροπή της λιγνινοκυτταρίνης σε αιθανόλη.

6.6 Συμπεράσματα

Στο κεφάλαιο αυτό μελετήθηκε η αξιοποίηση του στερεού κλάσματος της προκατεργασίας του άχυρου σίτου (προκατεργασμένο άχυρο σίτου), για την παραγωγή βιοαιθανόλης σε υψηλές συγκεντρώσεις υποστρώματος. Φάνηκε ότι λόγω της φυσιολογίας και της δομής του υλικού, η εισαγωγή ενός σταδίου προϋδρόλυσης - ρευστοποίησης πριν την ταυτόχρονη σακχαροποίηση και ζύμωση είναι απαραίτητη. Έτσι, ο σχεδιασμός και η κατασκευή ενός αντιδραστήρα ρευστοποίησης, βασισμένου στην ανάμιξη με ελεύθερη πτώση, έδωσε τη λύση στο πρόβλημα λειτουργίας σε μεγάλες συγκεντρώσεις υποστρώματος. Με τη χρήση αυτού του ρευστοποιητή έγινε δυνατή η σημαντική μείωση του ιξώδους του μίγματος κάνοντάς το εύκολα διαχειρίσιμο στα επόμενα στάδια. Επιπλέον, από τα πειραματικά μας δεδομένα φάνηκε πως ο σημαντικότερος παράγοντας για την επιτυχία της ρευστοποίησης είναι το ενζυμικό φορτίο και το είδος των ενζύμων, παρά ο χρόνος διάρκειας του σταδίου ρευστοποίησης. Καθώς με ικανοποιητικό (αλλά όχι υπερβολικό) ενζυμικό φορτίο η ρευστοποίηση πραγματοποιείται ακόμα και μετά από 6 ώρες. Τέλος, μπορεί να εξαχθεί το συμπέρασμα πως η διαδικασία ρευστοποίησης σε υψηλή συγκέντρωση υλικού φαίνεται να έχει ένα ανώτερο όριο συγκέντρωσης, καθώς για συγκέντρωση ΞΜ 30% η απόδοση της διεργασίας αρχίζει να μειώνεται.

Εν συνεχεία, μελετήθηκε η ζύμωση του ρευστοποιημένου υλικού προς παραγωγή αιθανόλης σε μικτές κυρίως καλλιέργειες της ζύμης *S. cerevisiae* και του μύκητα *F. oxysporum*. Εξετάστηκε η συμβολή του ενζυμικού συστήματος που εκκρίνεται από το μύκητα, η συμβολή της κυτταρικής βιομάζας του μύκητα καθώς και η συνδυασμένη επίδρασή τους (Πινάκας 6.5). Από τα πειραματικά δεδομένα εξάγεται το συμπέρασμα πως είναι

καθοριστική η συμβολή της προσθήκης των ενζύμων του μύκητα κατά τη ζύμωση.

Η σακχαροποίηση του υλικού δεν έχει ολοκληρωθεί στο προηγούμενο στάδιο, οπότε η παρουσία ενζύμων δραστικών στις συνθήκες της ζύμωσης είναι απαραίτητη. Αν και η προσθήκη κυτταρικής μάζας του μύκητα δεν φάνηκε να είναι εξίσου σημαντική με αυτή των ενζύμων, δεν μπορεί να θεωρηθεί αμελητέα. Τέλος, προτείνεται μια ολοκληρωμένη διεργασία παραγωγής βιοαιθανόλης με την αξιοποίηση στερεής καλλιέργειας του μύκητα. Η προσέγγιση αυτή μειώνει την απαίτηση της διεργασίας σε εξωγενώς παραγμένα εμπορικά ένζυμα (να σημειωθεί πως το κόστος των ενζύμων είναι ιδιαίτερα υψηλό). Με την προσθήκη ολόκληρης της καλλιέργειας του *F. oxysporum* δεν είναι απαραίτητη η κατεργασία των ενζύμων ή/και της κυτταρικής του μάζας πριν την εισαγωγή τους στην διεργασία. Αυτό αφαιρεί λειτουργικό κόστος και απλοποιεί τη διεργασία.

Πίνακας 6.5: Συνοπτική παρουσίαση πειραμάτων για την μελέτη της συμβολής του κυτταριού και ενζυμικού συστήματος του μύκητα *F. oxysporum*.

Μελέτη	Ρευστοποίηση	Προσθήκες στη ζύμωση					Μέγιστη παραχθείσα αιθανόλη (g kg ⁻¹)	Απόδοση g αιθανόλης / g κυτταρίνης και ημικυτταρίνης
		<i>S. cerevisiae</i>	Ένζυμα <i>F.oxysporum</i> *	Κυτταρική μάζα <i>F. oxysporum</i> **	Καλλιέργεια <i>F. oxysporum</i> ***			
Ζύμωση με <i>S. cerevisiae</i> (πείραμα αναφοράς)	6 ώρες, 50 °C, 5 FPU g ⁻¹ ¹ ΞΜ εμπορικά ένζυμα	Ναι	Όχι	Όχι	Όχι	30	0,22	
Προσθήκη ενζύμων <i>F. oxysporum</i>	6 ώρες, 50 °C, 5 FPU g ⁻¹ ¹ ΞΜ εμπορικά ένζυμα	Ναι	Ναι	Όχι	Όχι	38	0,27	
Προσθήκη κυτταρικής μάζας <i>F. oxysporum</i>	6 ώρες, 50 °C, 5 FPU g ⁻¹ ¹ ΞΜ εμπορικά ένζυμα	Ναι	Όχι	Ναι	Όχι	34	0,24	
Προσθήκη ενζύμων και κυττάρων <i>F. oxysporum</i>	6 ώρες, 50 °C, 5 FPU g ⁻¹ ¹ ΞΜ εμπορικά ένζυμα	Ναι	Ναι	Ναι	Όχι	62	0,44	
Προσθήκη καλλιεργείων <i>F. oxysporum</i>	6 ώρες, 50 °C, 7 FPU g ⁻¹ ¹ ΞΜ εμπορικά ένζυμα	Ναι	Όχι	Όχι	Ναι (ένζυμα και κυτταρική μάζα)	58	0,41	

* έως 6 FPU g⁻¹ ΞΜ ; ** έως 70 mg g⁻¹ ΞΜ ; *** Χωρίς επεξεργασία

7. Αξιολόγηση επίδρασης του συστήματος του *F. oxysporum* στην παραγωγή αιθανόλης από πλούσιο σε ημικυτταρίνη προκατεργασμένο άχυρο σίτου

Στα προηγούμενα κεφάλαια εξετάστηκε η αξιοποίηση των δύο ρευμάτων που προκύπτουν από την υδροθερμική προκατεργασία του άχυρου σίτου. Φάνηκε ότι το πλούσιο σε ημικυτταρίνη υγρό κλάσμα δεν είναι δυνατό να αξιοποιηθεί για την παραγωγή βιοαιθανόλης με τη χρήση του μύκητα *F. oxysporum*. Η περιεκτικότητά του σε παρεμποδιστικές ενώσεις καταστύουν το υλικό αυτό τοξικό για τον μικροοργανισμό. Αντίθετα, το πλούσιο σε κυτταρίνη στερεό κλάσμα (PWS) είναι δυνατό να αξιοποιηθεί σε μια διεργασία ταυτόχρονης σακχαροποίησης και ζύμωσης για την παραγωγή αιθανόλης από μικτές καλλιέργειες του μύκητα *F. oxysporum* και της ζύμης *S. cerevisiae*, υπό υψηλή συγκέντρωση υποστρώματος.

Επίσης, δείξαμε πως η πρόσμιξη του υγρού με το στερεό κλάσμα μειώνει την υδρόλυση της κυτταρίνης που περιέχεται στο PWS καθώς και ότι ο μύκητας *F. oxysporum* δεν είναι δυνατό να ζυμώσει ακόμα και εξωγενώς προστιθέμενα σάκχαρα στο υγρό κλάσμα.

Σε αυτό το κεφάλαιο θα αξιολογηθεί, με βάση και τα προηγούμενα αποτελέσματα, η δυνατότητα παραγωγής αιθανόλης από πλούσιο σε ημικυτταρίνη άχυρο σίτου (High Hemicellulose PWS, HHPWS), προκατεργασμένο υπό διαφορετικές συνθήκες. Το υλικό αυτό υπέστη μια πιο ήπια κατεργασία σε σχέση με το άχυρο των προηγούμενων κεφαλαίων (περιγράφεται αναλυτικά στην ενότητα Υλικά και Μέθοδοι). Επιπλέον, μετά την προκατεργασία στο υλικό δεν έγινε έκπλυση και διαχωρισμός της υγρής με τη στερεή φάση, αλλά οι δύο φάσεις διατηρήθηκαν ως ένα μίγμα.

7.1 Ρευστοποίηση και ζύμωση πλούσιου σε ημικυτταρίνη προκατεργασμένου άχυρου σίτου

Η ρευστοποίηση του πλούσιου σε ημικυτταρίνη προκατεργασμένου άχυρου σίτου πραγματοποιήθηκε στις βέλτιστες συνθήκες που προέκυψαν από τα προηγούμενα πειράματα. Δηλαδή, με τη χρήση 5 FPU g⁻¹ ΞΜ εμπορικού ενζυμικού σκευάσματος Celluclast 1,5L - Novozyme 188 (5/1), στους 50 °C για 6 ώρες. Η ρευστοποίηση έγινε σε δύο συγκεντρώσεις υλικού 25% και 30% (ΞΜ). Τα αποτελέσματα της ρευστοποίησης και τα απελευθερωμένα σάκχαρα παρουσιάζονται στα Σχήματα 7.1, 7.2 και στον Πίνακα 7.1 αντίστοιχα.

Όπως είναι εμφανές από τα Σχήματα 7.1 και 7.2 και σε συμφωνία με τα αποτελέσματα του προηγούμενου κεφαλαίου, η βέλτιστη συγκέντρωση για τη ρευστοποίηση είναι περίπου 25% ΞΜ. Είναι εμφανές πως η διαδικασία παρεμποδίζεται από το υπόστρωμα και δεν δίνει ικανοποιητικά αποτελέσματα για συγκέντρωση 30% ΞΜ. Αυτό επιβεβαιώνεται και από τα διαλυτά σάκχαρα, όπου φαίνεται πως με την αύξηση της συγκέντρωσης υποστρώματος δεν προκύπτει αντίστοιχη αύξηση στην υδρόλυση.

Τα παραπάνω αποτελέσματα έρχονται να επιβεβαιώσουν βιβλιογραφικές αναφορές που δηλώνουν πως η παρουσία ημικυτταρίνης στο υλικό εμποδίζει την επιτυχή υδρόλυση της κυτταρίνης και μειώνει την απόδοση της σακχαροποίησης (Olsson and Hahn-Hagerdal, 1996 ; Chandel et al., 2011 ; Viikari et al., 2012 ; Cannella and Jorgensen, 2013 ; Garcia-Aparicio et al., 2013).



Σχήμα 7.1: Ρευστοποίηση HHPWS σε 30% ΞΜ.



Σχήμα 7.2: Ρευστοποίηση HHPWS σε 25% ΞΜ.

Πίνακας 7.1: Παραγωγή σακχάρων κατά την προϋδρόλυση του άχυρου σίτου υψηλής ημικυτταρίνης.

	25% ΞΜ	Απόδοση (g/g)	30% ΞΜ	Απόδοση (g/g)
Ολικά Σάκχαρα (g/L)	35 (± 3)	0.23	38 (±3)	0.21
Γλυκόζη (g/L)	20 (±2)	0.2	24(±2)	0.21
Ξυλόζη (g/L)	7 (±2)	0.13	9(±2)	0.14

Στη συνέχεια, εξετάζεται το ενδεχόμενο της προσθήκης του συστήματος του μύκητα *F. oxysporum* στη ζύμωση του ρευστοποιημένου υλικού. Σε

αυτή την περίπτωση, ο μύκητας μπορεί να συνδράμει είτε στη συνέχιση της υδρόλυσης, που όπως φάνηκε δεν έφτασε σε ικανοποιητικά επίπεδα στο προηγούμενο στάδιο, είτε στη μετατροπή της ξυλόζης σε αιθανόλη. Επίσης, εξετάστηκε και η προσθήκη επιπλέον εμπορικών ενζύμων κατά τη ζύμωση, επειδή η σακχαροποίηση στο προηγούμενο στάδιο απέχει από τα επιθυμητά επίπεδα.

Έτσι, 50 mg g⁻¹ ΞΜ κύτταρα του *F. oxysporum* και 5 FPU g⁻¹ ΞΜ ένζυμα προστέθηκαν μαζί με τον *S. cerevisiae* στην αρχή της ζύμωσης. Πραγματοποιήθηκαν επίσης τα ακόλουθα πειράματα αναφοράς: (a) προσθήκη *S. cerevisiae* και εμπορικών ενζύμων, (b) *S. cerevisiae* χωρίς καμία επιπλέον προσθήκη στη ζύμωση, (c) *S. cerevisiae* και κυτταρική μάζα *F. oxysporum* και (d) *S. cerevisiae* και ένζυμα *F. oxysporum*. Τα αποτελέσματα παρουσιάζονται στον Πίνακα 7.2. Από τα πειραματικά αποτελέσματα προκύπτει ότι το ενζυμικό σύστημα του *F. oxysporum* μπορεί να αντικαταστήσει την προσθήκη επιπλέον εμπορικών ενζύμων που απαιτείται κατά τη διάρκεια της ζύμωσης. Επιπλέον, όταν δεν έγινε καμία προσθήκη ενζύμων στη ζύμωση φάνηκε πως το συνδυασμένο αποτέλεσμα των δύο μικροοργανισμών οδηγεί σε ελαφριά αύξηση της παραγόμενης αιθανόλης (7%). Αυτή η μικρή αύξηση εξηγείται και τη μικρή απελευθέρωση ξυλόζης που μετρήθηκε. Τέλος, η προσθήκη του συστήματος του *F. oxysporum* στη ζύμωση αύξησε την παραγωγή αιθανόλης κατά 77%, σε σχέση με την διεργασία όπου μόνο ο *S. cerevisiae* προστέθηκε στη ζύμωση.

Το άχυρο που χρησιμοποιήθηκε σε αυτό το τμήμα της μελέτης είναι πλούσιο σε ημικυτταρίνη και συνεπώς κατάλληλο για να αξιολογηθεί η δυνατότητα του *F. oxysporum* να υδρολύει την λιγνινοκυτταρίνη αλλά και να ζυμώνει την παραγόμενη ξυλόζη σε αιθανόλη. Ειδικότερα, η μικτή μικροβιακή καλλιέργεια με την προσθήκη του συστήματος του *F.*

oxysporum οδήγησε σε απόδοση 138 g αιθανόλης ανά kg προκατεργασμένου υλικού.

Πίνακας 7.2: Αξιολόγηση του συστήματος του *F. oxysporum* για την παραγωγή αιθανόλης από το HHPWS.

	SSCF	Ένζυμα <i>F.oxysporum</i>	Κυτταρική μάζα <i>F.oxysporum</i>	Εμπορικά ένζυμα	Ζύμωση ρευστοποιημένου άχυρου
% ΞΜ	25	25	25	25	25
Εμπορικά ένζυμα στη Ρευστοποίηση (FPU/g ΞΜ)	5	5	5	5	5
Προσθήκες στη ζύμωση					
Εμπορικά ένζυμα (FPU/g ΞΜ)	Όχι	Όχι	Όχι	5	Όχι
Ένζυμα <i>F. oxysporum</i> (FPU/g ΞΜ)	5	5	Όχι	Όχι	Όχι
Βιομάζα <i>F. oxysporum</i> (mg/g ΞΜ)	50	Όχι	50	Όχι	Όχι
<i>S. cerevisiae</i> (mg/g ΞΜ)	5	5	5	5	5
Αιθανόλη (g/kg)	34.7 ± 0.1	29.2 ± 0.8	21.1 ± 1.0	31.2 ± 0.9	19.6 ± 0.8

* SSCF: Simultaneous Saccharification and Co-Fermentation

Τα αποτελέσματα που παρουσιάζονται στον Πίνακα 7.2 δείχνουν ότι ο μύκητας *F. oxysporum* είναι δυνατό να μελετηθεί περαιτέρω ως προς την αξιοποίησή του για την παραγωγή αιθανόλης από πλούσια σε ημικυτταρίνη υλικά και σε μικτές καλλιέργειες με τον *S. cerevisiae*.

Τα παραπάνω αποτελέσματα έρχονται σε συμφωνία με προηγούμενη μελέτη (Panagiotou et al., 2011), η οποία δείχνει ότι το πολυενζυμικό και μικροβιακό σύστημα του *F. oxysporum* είχε θετική επίδραση στην παραγωγή αιθανόλης σε μικτή καλλιέργεια με τον *S. cerevisiae*. Επίσης, οι Moreno et al. (2013) αναφέρουν παραγωγή αιθανόλης 25 g L^{-1} σε συγκέντρωση στερεών 20% ΞΜ, που αντιστοιχεί σε 125 g αιθανόλης ανά κιλό προκατεργασμένου υλικού. Ενώ, σε μια άλλη μελέτη (Jorgensen et al., 2007) αναφέρεται παραγωγή αιθανόλης της τάξεως των 130 g/kg , με την εφαρμογή μιας παρόμοιας διεργασίας ρευστοποίησης και ζύμωσης σε ένα υλικό υψηλής περιεκτικότητας σε ημικυτταρίνη. Στην παρούσα μελέτη, η ρευστοποίηση διήρκησε 6 ώρες με 5 FPU g^{-1} ΞΜ ενζυμικού φορτίου και την προσθήκη επιπλέον 5 FPU g^{-1} ΞΜ ενζύμων κατά τη ζύμωση. Συγκριτικά, το ενζυμικό φορτίο στις άλλες δύο αντίστοιχες διεργασίες των Moreno et al. (2013) και των Jorgensen et al. (2007) ήταν 15 FPU g^{-1} ΞΜ και 7 FPU g^{-1} ΞΜ αντίστοιχα. Επίσης, οι χρόνοι ρευστοποίησης διαφέρουν. Στην παρούσα εργασία το στάδιο ρευστοποίησης διήρκησε 6 ώρες ακολουθούμενο από την ταυτόχρονη σακχαροποίηση και ζύμωση. Ενώ, οι Moreno et al. (2013) και Jorgensen et al. (2007) διεξήγαγαν 144 ώρες Ταυτόχρονης σακχαροποίησης και Μικτής Ζύμωσης (SSCF) και 24 ώρες ρευστοποίησης και 48 ώρες ταυτόχρονης σακχαροποίησης και ζύμωσης, αντίστοιχα.

Η πολυπλοκότητα των λιγνινοκυτταρινούχων συστημάτων και των διεργασιών ταυτόχρονης σακχαροποίησης και ζύμωσης με μικτή

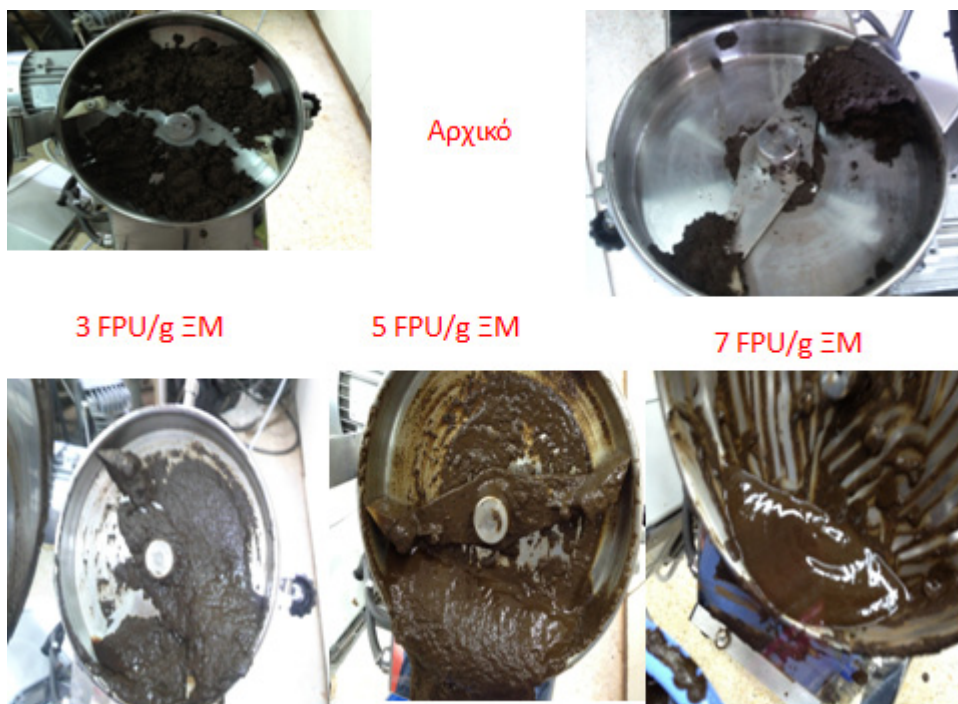
καλλιέργεια μικροοργανισμών μπορεί να δικαιολογήσει τις διαφορές που παρουσιάζονται μεταξύ των ερευνών (Viikari et al., 2012). Οι παράγοντες που επηρεάζουν τέτοιες διεργασίες είναι πολλοί όπως η περιεκτικότητα σε θρεπτικά, η παρουσία παρεμποδιστών, το ιξώδες κ.α. (Korppam et al., 2014). Επιπλέον, οι διαφορές στα υλικά και στην προκατεργασία (ο συντελεστής SF στο άχυρο της παρούσας εργασίας υπολογίστηκε σε 3.58, όσο και στους Jorgensen et al. (2007), ενώ οι Moreno et al. (2013) αναφέρουν συντελεστή SF ίσο με 3.34) κάνουν δύσκολη τη σύγκριση ανάμεσα στις διάφορες περιπτώσεις. Επίσης, αξίζει να σημειωθεί ότι όπως δείξαμε και σε προηγούμενο κεφάλαιο, η παρουσία παρεμποδιστικών ενώσεων (κυρίως οξικού οξέος, 4 g L^{-1}) στο προκατεργασμένο υλικό του παρόντος κεφαλαίου επιδρά αρνητικά στη μεταβολική δραστηριότητα του μύκητα *F. oxysporum*. Έτσι, δεν είναι απλό να εξαχθεί ένα γενικό συμπέρασμα ως προς τη δυνατότητα αξιοποίησης του *F. oxysporum* σε διεργασίες παραγωγής αιθανόλης από υλικά πλούσια σε ημικυτταρίνη.

Με βάση τα παραπάνω μπορούμε να ισχυριστούμε πως η προσθήκη του ενζυμικού και μεταβολικού συστήματος του μύκητα *F. oxysporum* μπορεί να οδηγήσει σε σημαντική αύξηση της παραγωγής αιθανόλης από το υψηλής συγκέντρωσης ημικυτταρίνης προκατεργασμένο άχυρο σίτου. Η αξιοποίηση των ενζύμων του μύκητα μπορεί να οδηγήσει σε μείωση της απαίτησης για εμπορικά ένζυμα. Αντιθέτως, η απόδοση σε αιθανόλη των παραπάνω αποτελεσμάτων (31% του μέγιστου θεωρητικού με βάση τη σύσταση σε κυτταρίνη και ημικυτταρίνη) αναδεικνύει την ανάγκη για περαιτέρω μελέτη της σακχαροποίησης του υλικού αυτού.

7.2 Αξιολόγηση ενός πειραματικού μίγματος θερμοενζύμων για την ρευστοποίηση του πλούσιου σε ημικυτταρίνη προκατεργασμένου άχυρου σίτου

Όπως προέκυψε παραπάνω, αν και το HHPWS ρευστοποιήθηκε ικανοποιητικά με τη χρήση του εμπορικού ενζυμικού σκευάσματος Celluclast 1.5L - Novozyme 188, η απόδοση σε σάκχαρα δεν ήταν ικανοποιητική. Επιπροσθέτως, η ικανοποιητική απόδοση στην απελευθέρωση σακχάρων δεν έγινε δυνατή ούτε με την προσθήκη επιπλέον ενζύμων κατά τη ζύμωση. Για αυτούς τους λόγους, σε αυτό το κομμάτι της διατριβής θα γίνει η αξιολόγηση ενός πρότυπου ενζυμικού σκευάσματος που αναπτύχθηκε από το πανεπιστήμιο του Ελσίνκι. Το ενζυμικό αυτό σκεύασμα (Thermomix) αποτελείται από ένα μίγμα θερμοενζύμων (βέλτιστη θερμοκρασία δράσης 55 °C) ικανών να υδρολύσουν την κυτταρίνη και την ημικυτταρίνη.

Αρχικά, πραγματοποιήθηκε ρευστοποίηση του άχυρου με τη χρήση 3, 5, και 7 FPU g⁻¹ ΞΜ ενζυμικού φορτίου, στη βέλτιστη θερμοκρασία δράσης των ενζύμων και για συγκέντρωση στερεών 25% β/β ΞΜ. Στο Σχήμα 7.3 παρουσιάζονται τα αποτελέσματα της ρευστοποίησης του υλικού.



Σχήμα 7.3: Ρευστοποίηση του ΗΗΡΡWS με το πιλοτικό σύστημα θερμοενζύμων.

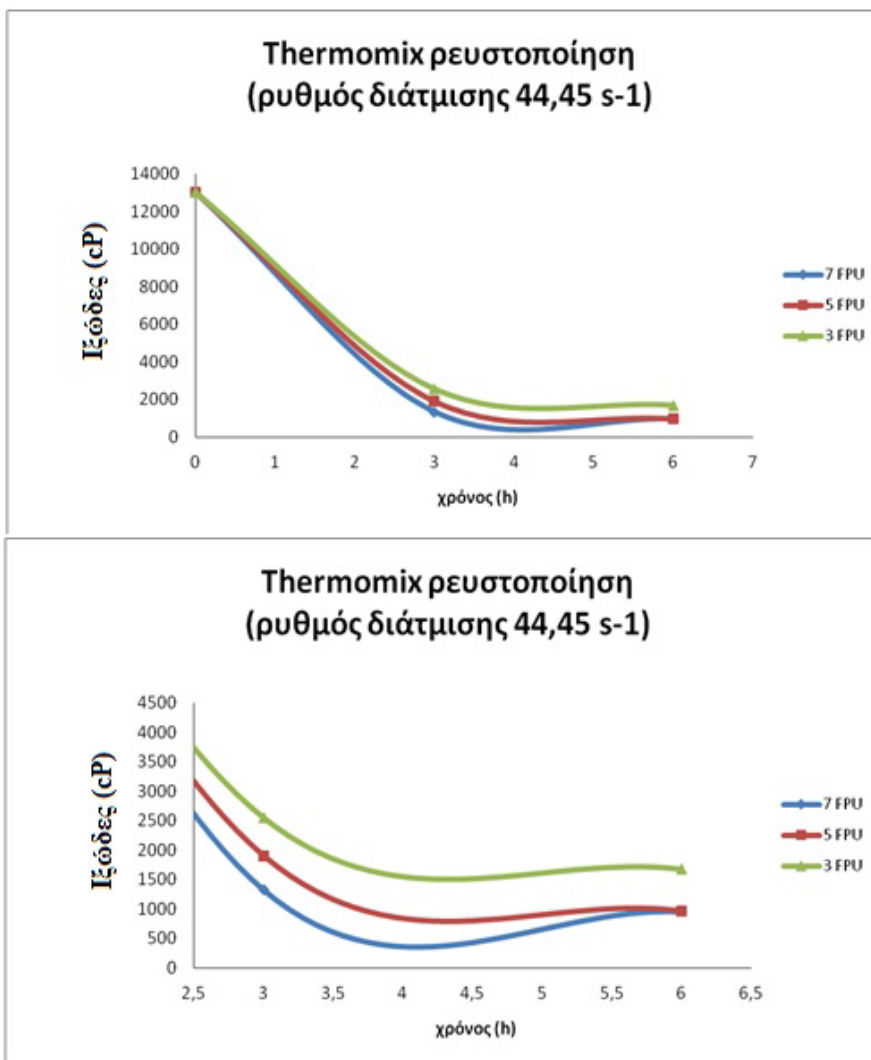
Όπως γίνεται εύκολα αντιληπτό και σε αυτή την περίπτωση, τα 3 FPU g⁻¹ EM δεν δίνουν ικανοποιητική ρευστοποίηση, ενώ με τη χρήση 5 FPU g⁻¹ EM φαίνεται να φτάνουμε στο επιθυμητό αποτέλεσμα. Τελικά, η χρήση 7 FPU g⁻¹ EM οδηγεί σε πλήρη ρευστοποίηση του υλικού.

Τα αποτελέσματα αυτά αντικατοπτρίζονται και στο ιξώδες του υλικού, όπου μετρήθηκε έντονη μείωση σε σχέση με το αρχικό. Η διαφορά στην τιμή του ιξώδους ανάμεσα στα τρία ενζυμικά φορτία που μελετήθηκαν είναι εμφανής ακόμα και μετά από 3 ώρες ρευστοποίησης (Σχήμα 7.4).

Τέλος, στον Πίνακα 7.3 παρουσιάζεται η συγκέντρωση των ελεύθερων σακχάρων μετά τη ρευστοποίηση του ΗΗΡΡWS με τη χρήση των θερμοενζύμων.

Πίνακας 7.3: Συγκέντρωση σακχάρων στον ρευστοποιημένο (με το ενζυμικό σύστημα Thermomix) υψηλής περιεκτικότητας ημικυτταρίνης προκατεργασμένο άχυρο σίτου.

Ενζυμικό φορτίο (mg g⁻¹ ΞΜ)	7	5	3
Συνολικά σάκχαρα (g/L)	167.8	167.8	167.8
Υδρολυμένα σάκχαρα (g/L)	76.3 ± 2.1	59.1 ± 1.5	25.5 ± 1.2
Ποσοστό υδρολυμένων σακχάρων %	45.4	35.2	15.2
Υδρολυμένη γλυκόζη (g/L)	42.4 ± 1.3	27.6 ± 0.8	16.1 ± 0.7
Υδρολυμένη ξυλόζη (g/L)	9.1 ± 0.7	5.9 ± 0.4	3.5 ± 0.5



Σχήμα 7.4: Μεταβολή ιξώδους κατά την ρευστοποίηση του ΗΗΡWΣ από το ενζυμικό μίγμα Thermomix.

Εν συνεχεία και λαμβάνοντας υπόψη τα παραπάνω αποτελέσματα επιλέχθηκε να χρησιμοποιηθεί σε πειράματα ζύμωσης το υδρολυμένο υλικό με ενζυμικό φορτίο 7 mg g⁻¹ ΞΜ (αντιστοιχούν σε 4.5 FPU g⁻¹ ΞΜ) και με τη χρήση του ενζυμικού και μικροβιακού συστήματος του μύκητα *F. oxysporum*. Τα αποτελέσματα των ζυμώσεων παρουσιάζονται στον Πίνακα 7.4.

Πίνακας 7.4: Αξιολόγηση του συστήματος του *F. oxysporum* για την παραγωγή αιθανόλης από το HHPWS, μετά τη ρευστοποίησή του με το ενζυμικό σκεύασμα Thermomix.

	SSCF*	Ένζυμα <i>F.oxysporum</i>	Κυτταρική μάζα <i>F.oxysporum</i>	Εμπορικά ένζυμα	Ζύμωση ρευστοποιημένου αχύρου
% ΞΜ	25	25	25	25	25
Ρευστοποίηση Thermomix (mg/g ΞΜ)	5	5	5	5	5
Προσθήκες στη ζύμωση					
Εμπορικά ένζυμα (FPU/g ΞΜ)	Όχι	Όχι	Όχι	5	Όχι
Ένζυμα <i>F. oxysporum</i> (FPU/g ΞΜ)	5	5	Όχι	Όχι	Όχι
Βιομάζα <i>F. oxysporum</i> (mg/g ΞΜ)	50	Όχι	50	Όχι	Όχι
<i>S. cerevisiae</i> (mg/g ΞΜ)	5	5	5	5	5
Αιθανόλη (g/kg)	35.4 ± 0.9	32.9 ± 0.6	23.2 ± 1.1	33.4 ± 1.1	21.1 ± 0.4

* SSCF: Simultaneous Saccharification and Co-Fermentation

Από τα παραπάνω αποτελέσματα φαίνεται πως το ενζυμικό σκεύασμα των θερμοενζύμων βελτιώνει την σακχαροποίηση του υλικού κατά στο στάδιο της ρευστοποίησης. Όμως, η δράση τους φαίνεται να μην συνεχίζεται κατά τη διάρκεια της ζύμωσης, πιθανόν λόγω του γεγονότος ότι η βέλτιστη θερμοκρασία δράσης του απέχει από την θερμοκρασία της ζύμωσης. Είναι εμφανές πως με την προσθήκη είτε εμπορικών είτε ενζύμων του *F. oxysporum*, παρουσιάζεται κατά τη ζύμωση έντονη αύξηση της απόδοσης σε αιθανόλη άνω του 50%. Σε αυτή τη μειωμένη δράση του μίγματος Thermomix προφανώς οφείλεται και το γεγονός ότι η προσθήκη των δύο διαφορετικών ενζυμικών μιγμάτων αντιστοιχεί σε παρόμοια αποτελέσματα. Είναι ενθαρρυντικό το γεγονός πως και σε αυτή την περίπτωση το ενζυμικό σύστημα του *F. oxysporum* μπορεί να αντικαταστήσει πλήρως τα εμπορικά ένζυμα. Τέλος, η προσθήκη και του μεταβολικού συστήματος του μύκητα οδήγησε σε αύξηση στην παραγωγή αιθανόλης κατά 6% περίπου. επιβεβαιώνοντας τα συμπεράσματα προηγούμενων κεφαλαίων σχετικά με τη δυνατότητά του να «βοηθήσει» τη ζύμη στην παραγωγή αιθανόλης.

Επίσης, αξιοσημείωτο είναι το γεγονός πως σε όλες τις παραπάνω περιπτώσεις μετράται πολύ μικρή συγκέντρωση διαλυτής ξυλόζης στο μίγμα μετά τη ρευστοποίηση. Η απόδοση σε ελεύθερη ξυλόζη με βάση το ποσοστό ημικυτταρίνης στο άχυρο κινείται σε επίπεδα του 20 - 25 %. Μία πιθανή αιτιολογία για αυτό το αποτέλεσμα μπορεί να είναι η μη αποδοτική δράση του ενζύμου β-ξυλοζιδάση στο σκεύασμα. Από τα δεδομένα της ερευνητικής ομάδας που το ανέπτυξε φαίνεται ότι δεν έχει γίνει επιπλέον προσθήκη αυτού του ενζύμου στο σύστημα, ενώ τη δράση απελευθέρωσης της ξυλόζης από τους ξυλο-ολιγοσακχαρίτες αναλαμβάνουν άλλα ξυλανολυτικά ένζυμα που υπάρχουν στο μίγμα.

7.3 Συμπεράσματα

Σε αυτό το κεφάλαιο, με βάση τα αποτελέσματα των προηγούμενων κεφαλαίων, μελετήθηκε η δυνατότητα παραγωγής αιθανόλης από ένα πλούσιο σε ημικυτταρίνη υδροθερμικά προκατεργασμένο άχυρο σίτου. Φάνηκε πως είναι απαραίτητο ένα στάδιο ρευστοποίησης - σακχαροποίησης πριν από τη διεργασία παραγωγής αιθανόλης. Και σε αυτή την περίπτωση του υλικού με μεγαλύτερη συγκέντρωση ημικυτταρίνης πραγματοποιείται ικανοποιητική ρευστοποίηση του υλικού μειώνοντας το ιξώδες του, όμως η σακχαροποίηση κατά το στάδιο της προϋδρόλυσης δεν φτάνει σε ικανοποιητικά επίπεδα. Έτσι, κρίνεται αναγκαία η προσθήκη επιπλέον ενζυμικού φορτίου κατά τη ζύμωση. Λόγω της υψηλής συγκέντρωσης του υλικού σε πεντόζες αλλά και του ποσοστού των υδατανθράκων που έχουν μείνει ανεπηρέαστοι κατά την ρευστοποίηση, η προσθήκη κυτταρικής μάζας αλλά και ενζυμικού φορτίου από το ενζυμικό σύστημα του μύκητα *F. oxysporum* οδήγησε σε αύξηση της παραγόμενης αιθανόλης σε μικτές καλλιέργειες με τη ζύμη *S. cerevisiae*. Όμως, η χαμηλή απόδοση σε αιθανόλη που επιτεύχθηκε αναδεικνύει την ανάγκη για περαιτέρω μελέτη της σακχαροποίησης και ζύμωσης του υλικού αυτού.

Εν συνεχεία, μελετήθηκε η χρήση ενός πιλοτικού ενζυμικού σκευάσματος για τη ρευστοποίηση του παραπάνω υλικού. Δείχτηκε ότι το ενζυμικό σκεύασμα θερμο-ενζύμων που χρησιμοποιήθηκε είναι ικανό να ρευστοποιήσει σε πολύ μεγάλο βαθμό το υλικό, μειώνοντας γρήγορα το ιξώδες του. Όμως, δεν μετρήθηκε ικανοποιητική απόδοση στη σακχαροποίηση της ημικυτταρίνης, πιθανόν λόγω της έλλειψης του ενζύμου β -ξυλοζιδάση στο σκεύασμα. Κάτι που καθρεφτίζεται και στην τελική απόδοση σε αιθανόλη.

Συμπεράσματα και μελλοντικές προοπτικές

Συμπεράσματα

Στην παρούσα διατριβή μελετήθηκε η δυνατότητα αξιοποίησης του υδροθερμικά κατεργασμένου άχυρου σίτου για την παραγωγή βιοαιθανόλης, σε μικτές καλλιέργειες του μύκητα *F. oxysporum* και της ζύμης *S. cerevisiae*. Το σιτάρι είναι ένα από τα πλέον διαδεδομένα φυτά παγκοσμίως, η καλλιέργειά του καλύπτει τις διατροφικές ανάγκες μεγάλου ποσοστού του πληθυσμού σε όλες τις ηπείρους και το γεωργικό υπόλειμμά του (άχυρο) είναι ένα εύκολα προσβάσιμο και πλούσιο σε υδατάνθρακες υλικό.

Αρχικά, μελετήθηκε η δυνατότητα του μύκητα να χρησιμοποιηθεί σε τέτοιες διεργασίες. Αν και είχε δειχθεί πολλές φορές στη βιβλιογραφία η ικανότητα του μύκητα να υδρολύει την κυτταρίνη και την ημικυτταρίνη και να μεταβολίζει τα παραγόμενα σάκχαρα σε αιθανόλη, δεν είχε γίνει καμία προ πάθεια μελέτης της αντοχής και της ανθεκτικότητάς του στις παρεμποδιστικές ενώσεις που παράγονται κατά την θερμική κατεργασία της λιγνινοκυτταρίνης. Επίσης, δεν είχε μελετηθεί η επίδραση που έχει η ίδια η αιθανόλη στον μεταβολισμό και τη δράση του ενζυμικού συστήματος του μύκητα.

Συμπεραίνεται ότι η αερόβια ανάπτυξη του μύκητα *F. oxysporum* δεν παρεμποδίζεται σε μεγάλο βαθμό από τις παρεμποδιστικές ενώσεις, όταν αυτές προστίθενται στο σύστημα σε ήπιες συγκεντρώσεις και στο εύρος που εμφανίζονται σε διεργασίες προκατεργασίας της λιγνινοκυτταρίνης. Οι παρεμποδιστικές ενώσεις που μελετήθηκαν επηρεάζουν την παραγωγή βιομάζας από το μύκητα, όταν προστεθούν στο μέσο καλλιέργειας σε αρκετά μεγαλύτερες συγκεντρώσεις. Επιπλέον, το ενζυμικό σύστημα που παράγει ο μύκητας αποδεικνύεται σταθερό και σχετικά ανθεκτικό στην

παρουσία ενώσεων όπως τα παράγωγα του φουρανίου, οι φαινολικές ενώσεις και τα καρβοξυλικά οξέα. Όπως στη φάση ανάπτυξης έτσι και στην δράση των ενζύμων του μύκητα απαιτείται η προσθήκη υψηλών συγκεντρώσεων των παρεμποδιστικών ενώσεων για να παρουσιαστεί σημαντική παρεμπόδιση. Αντιθέτως, η απόδοση του μύκητα στην παραγωγή αιθανόλης επηρεάζεται από την παρουσία των παρεμποδιστών, ειδικότερα των ασθενών οργανικών οξέων. Επίσης, όταν οι παρεμποδιστικές ενώσεις προστέθηκαν συγκεντρωτικά στο μέσο καλλιέργειας κατά την παραγωγή αιθανόλης, η απόδοση σε αιθανόλη μειώθηκε κατά 50% περίπου. Αυτό δείχνει ότι η ουσίες αυτές εμφανίζουν συνεργιστική δράση ως προς την παρεμπόδιση. Συγκεντρωτικά, αποδεικνύεται από τα παραπάνω ότι ο μύκητας *F. oxysporum* θα μπορούσε πιθανώς να χρησιμοποιηθεί για την αξιοποίηση υδρολυμάτων που παράγονται κατά την υδροθερμική προκατεργασία της λιγνινοκυτταρίνης.

Επίσης, σύμφωνα με τα αποτελέσματα της παρούσας διατριβής, ο μύκητας είναι ικανός να αναπτύσσεται και να μεταβολίζει τα σάκχαρα σε αιθανόλη υπό ήπιες συγκεντρώσεις αλκοόλης (λιγότερο από 3% β/ο) στο μέσο καλλιέργειας. Τα ένζυμα που εκκρίνει ο μύκητας θα μπορούσαν να αξιοποιηθούν στο πλαίσιο ενός βιοδιωλιστήριου καθώς η ανθεκτικότητά τους σε αιθανόλη είναι αντίστοιχη με αυτή των εμπορικών ενζύμων που χρησιμοποιούνται σήμερα ευρέως σε διεργασίες ζύμωσης υψηλής κλίμακας. Η χρήση του *F. oxysporum* σε μία ενοποιημένη διεργασία παραγωγής αιθανόλης μπορεί να οδηγήσει σε μείωση του κόστους της, επιτυγχάνοντας υψηλότερη απόδοση σε αιθανόλη αλλά και μειώνοντας τις απαιτήσεις σε εμπορικά ένζυμα. Τελικά, με βάση τα παραπάνω αλλά και άλλες μελέτες (Hennesey et al., 2013) μπορεί να εξαχθεί το συμπέρασμα ότι ο μύκητας *F. oxysporum* είναι ικανός να ανταπεξέλθει στην παρουσία αιθανόλης, κάτι που

τον καθιστά πιθανό μικροοργανισμό για περαιτέρω μελέτη σε ολοκληρωμένες διεργασίες παραγωγής βιοαιθανόλης.

Στη συνέχεια και στη βάση των παραπάνω συμπερασμάτων μελετήθηκε η ικανότητα του μύκητα να μεταβολίζει το πλούσιο σε ημικυτταρίνη αλλά και παρεμποδιστικές ενώσεις υγρό κλάσμα που προκύπτει από την υδροθερμική κατεργασία του άχυρου. Λόγω της περιεκτικότητας του υλικού σε ημικυτταρίνη και της απουσίας σε αυτό κυτταρίνης ή ελεύθερης γλυκόζης δεν μελετήθηκε η χρήση ζύμης για τη βιομετατροπή του. Σύμφωνα με τα παραπάνω αποτελέσματα, αν και ο μύκητας *F. oxysporum* μπορεί να αναπτυχθεί και να παράξει κυτταρική βιομάζα στο υγρό κλάσμα, δεν εκκρίνει τα απαραίτητα ημικυτταρινολυτικά ένζυμα για την υδρόλυση του υποστρώματος σε ικανοποιητικές ποσότητες. Επιπλέον, το υγρό κλάσμα οδηγεί σε παρεμποδιστικά αποτελέσματα ως προς την έκκριση ημικυτταρινολυτικών ενζύμων. Όμοια παρεμποδιστική δράση εμφανίζεται και στην υδρόλυση του στερεού κλάσματος της υδροθερμικής κατεργασίας του άχυρου σίτου, υπό την παρουσία του υγρού κλάσματος.

Δείχτηκε επίσης ότι δεν είναι δυνατή η αποδοτική αξιοποίησή του υγρού κλάσματος καθώς οι περιεχόμενοι σε αυτό παρεμποδιστές (κυρίως οξικό οξύ) αναστέλλουν τον μεταβολισμό της ξυλόζης από τον *F. oxysporum*. Στις προσπάθειες που πραγματοποιήθηκαν για την προσαρμογή του μικροοργανισμού στο υλικό αυτό αλλά και την αποτοξικοποίησή του, τα αποτελέσματα δείχνουν ότι αν και παρατηρείται σχετική αύξηση στην παραγωγή αιθανόλης από το ΥΚ (περίπου 20%, μετά την επεξεργασία με ρητίνες και ενεργό άνθρακα) το κόστος μιας τέτοιας εγκατάστασης σε βιομηχανική κλίμακα δεν καλύπτεται από την τελική απόδοση στην παραγωγή αιθανόλης.

Εφόσον δεν είναι εφικτή με βάση τα ανωτέρω η δυνατότητα αξιοποίησης του ΥΚ προς παραγωγή αιθανόλης, η μελέτη επικεντρώθηκε στην

αξιοποίηση του πλούσιου σε κυτταρίνη στερεού κλάσματος της προκατεργασίας του άχυρου. Λόγω της φυσιολογίας και της δομής του υλικού η εισαγωγή ενός σταδίου προϋδρόλυσης – ρευστοποίησης, πριν την ταυτόχρονη σακχαροποίηση και ζύμωση, είναι απαραίτητη. Έτσι, ο σχεδιασμός και η κατασκευή ενός αντιδραστήρα ρευστοποίησης βασισμένου στην ανάμιξη με ελεύθερη πτώση έδωσε τη λύση στο πρόβλημα λειτουργίας σε μεγάλες συγκεντρώσεις υποστρώματος. Με τη χρήση αυτού του ρευστοποιητή έγινε δυνατή η σημαντική μείωση του ιξώδους του μίγματος, κάνοντάς το εύκολα διαχειρίσιμο στο επόμενο στάδια. Ο σημαντικότερος παράγοντας για την επιτυχία της ρευστοποίησης είναι το ενζυμικό φορτίο και το είδος των ενζύμων, παρά ο χρόνος διάρκειας του σταδίου ρευστοποίησης. Αφού με ικανοποιητικό (αλλά όχι υπερβολικό) ενζυμικό φορτίο η ρευστοποίηση πραγματοποιείται ακόμα και μετά από 6 ώρες. Τέλος, η διαδικασία ρευστοποίησης σε υψηλή συγκέντρωση υλικού φαίνεται να έχει ένα ανώτατο όριο συγκέντρωσης, καθώς για συγκέντρωση 30% ΞΜ η απόδοση της διεργασίας αρχίζει να μειώνεται.

Εν συνεχεία, το ρευστοποιημένο υλικό ζυμώθηκε αναερόβια προς παραγωγή αιθανόλης σε μικτές κυρίως καλλιέργειες της ζύμης *S. cerevisiae* και του μύκητα *F. oxysporum*. Εξετάστηκε η συμβολή του ενζυμικού συστήματος που εκκρίνεται από το μύκητα, η συμβολή της κυτταρικής βιομάζας του μύκητα καθώς και η συνδυασμένη επίδρασή τους (Πίνακας 6.5). Από τα πειραματικά δεδομένα εξάγεται το συμπέρασμα πως είναι καθοριστική η συμβολή της προσθήκης των ενζύμων του μύκητα κατά τη ζύμωση.

Η σακχαροποίηση του υλικού δεν έχει ολοκληρωθεί στο προηγούμενο στάδιο οπότε η παρουσία ενζύμων δραστηκών στις συνθήκες της ζύμωσης είναι απαραίτητη. Αν και η προσθήκη κυτταρικής μάζας του μύκητα δεν φάνηκε να είναι εξίσου σημαντική με αυτή των ενζύμων, δεν μπορεί να

θεωρηθεί αμελητέα. Τέλος, προτείνεται μια ολοκληρωμένη διεργασία παραγωγής βιοαιθανόλης με την αξιοποίηση στερεής καλλιέργειας του μύκητα. Η προσέγγιση αυτή μειώνει την απαίτηση της διεργασίας σε εξωγενώς παραγμένα εμπορικά ένζυμα (να σημειωθεί πως το κόστος των ενζύμων είναι ιδιαίτερα υψηλό). Με την προσθήκη ολόκληρης της καλλιέργειας του *F. oxysporum* δεν είναι απαραίτητη η κατεργασία των ενζύμων ή/και της κυτταρικής μάζας του μύκητα πριν την εισαγωγή τους στη διεργασία. Αυτό αφαιρεί λειτουργικό κόστος και απλοποιεί τη διεργασία.

Στο τελικό στάδιο της μελέτης και δεδομένου ότι μπορεί να επιτευχθεί ικανοποιητική μετατροπή του υδροθερμικά κατεργασμένου και ρευστοποιημένου άχυρου προς αιθανόλη από το σύστημα του μύκητα *F. oxysporum* και της ζύμης *S. cerevisiae*. Ότι το υγρό κλάσμα της προκατεργασίας του άχυρου δεν είναι δυνατό να αξιοποιηθεί. Έγινε μια τελευταία προσπάθεια για την αξιοποίηση ενός πλουσίου σε ημικυτταρίνη υλικού. Όχι όμως ενός υλικού που είναι συνέπεια της ανάμιξης των παραπάνω, αλλά ενός προκατεργασμένου υπό διαφορετικές συνθήκες υλικού. Φάνηκε πως είναι απαραίτητο ένα στάδιο ρευστοποίησης - σακχαροποίησης πριν από τη διεργασία παραγωγής αιθανόλης. Και σε αυτή την περίπτωση του υλικού με μεγαλύτερη συγκέντρωση ημικυτταρίνης πραγματοποιείται ικανοποιητική ρευστοποίηση του υλικού μειώνοντας το ιξώδες του, όμως η σακχαροποίηση κατά το στάδιο της προϋδρόλωσης δεν φτάνει σε ικανοποιητικά επίπεδα. Έτσι, κρίνεται αναγκαία η προσθήκη επιπλέον ενζυμικού φορτίου κατά τη ζύμωση. Λόγω της υψηλής συγκέντρωσης του υλικού σε πεντόζες αλλά και του ποσοστού των υδατανθράκων που έχουν μείνει ανεπηρέαστοι κατά την ρευστοποίηση, η προσθήκη κυτταρικής μάζας αλλά και ενζυμικού φορτίου από το ενζυμικό σύστημα του μύκητα *F. oxysporum* οδήγησε σε αύξηση της παραγόμενης

αιθανόλης σε μικτές καλλιέργειες με τη ζύμη *S. cerevisiae*. Όμως, η χαμηλή απόδοση σε αιθανόλη που επιτεύχθηκε αναδεικνύει την ανάγκη για περαιτέρω μελέτη της σακχαροποίησης και ζύμωσης του υλικού αυτού.

Στη συνέχεια μελετήθηκε η χρήση ενός πιλοτικού ενζυμικού σκευάσματος για τη ρευστοποίηση του παραπάνω υλικού. Δείχτηκε ότι το ενζυμικό σκεύασμα θερμοενζύμων που χρησιμοποιήθηκε είναι ικανό να ρευστοποιήσει σε πολύ μεγάλο βαθμό το υλικό, μειώνοντας γρήγορα το ιξώδες του. Όμως, δεν μετρήθηκε ικανοποιητική απόδοση στη σακχαροποίηση της ημικυτταρίνης, πιθανόν λόγω της έλλειψης του ενζύμου β -ξυλοζιδάση στο σκεύασμα. Κάτι που καθρεφτίζεται και στην τελική απόδοση σε αιθανόλη.

Συγκεντρωτικά, από τα αποτελέσματα της παρούσας διατριβής γίνεται κατανοητό πως ο μύκητας *F. oxysporum* έχει όλα τα απαραίτητα στοιχεία που τον καθιστούν κατάλληλο μικροοργανισμό για διεργασίες ταυτόχρονης σακχαροποίησης και ζύμωσης με μικτή καλλιέργεια μύκητα και ζύμης. Επίσης, επιτεύχθηκε ο σχεδιασμός μιας ολοκληρωμένης διεργασίας (ρευστοποίησης, υδρόλυσης και ζύμωσης) παραγωγής βιοαιθανόλης από το υδροθερμικά κατεργασμένο άχυρο σίτου.

Μελλοντικές προοπτικές

Στην παρούσα διατριβή μελετήθηκε η επίδραση των παρεμποδιστικών ενώσεων της υδροθερμικής κατεργασίας και της αιθανόλης στον μεταβολισμό του μύκητα *F. oxysporum*. Παρότι ο μύκητας αποδείχθηκε ικανοποιητικά ανθεκτικός στην προκαταρκτική μελέτη που έγινε, αξίζει να γίνει αντικείμενο περαιτέρω μελέτης ως προς την βελτιστοποίηση της ανθεκτικότητάς του κυρίως στην παρουσία αιθανόλης.

Επιπλέον, περαιτέρω μελέτη απαιτείται και όσον αφορά στο υγρό κλάσμα της κατεργασίας του άχυρου σίτου. Στην παρούσα διατριβή δεν μπόρεσε να γίνει ικανοποιητική αξιοποίησή του ούτε ως πηγή άνθρακα για την ανάπτυξη και παραγωγή ενζύμων του μύκητα αλλά ούτε και ως πρώτη ύλη για την παραγωγή αιθανόλης. Είναι πιθανόν η χρήση ενός άλλου ανθεκτικότερου μικροοργανισμού να οδηγήσει στη βέλτιστη αξιοποίησή του. Επίσης, χάρη στην περιεκτικότητά του σε λιγνίνη και φαινολικές ενώσεις μπορεί να χρησιμοποιηθεί ως βάση για την παραγωγή υψηλής προστιθέμενης αξίας φαινολικών ενώσεων.

Όσον αφορά στη διαδικασία ρευστοποίησης του άχυρου, η δημιουργία του βαρυτικού αναμκτήρα οδήγησε στην αποδοτική ρευστοποίηση του υλικού. Όμως, θα ήταν άξια μελέτης και σχεδιασμού η δημιουργία ενός αντιδραστήρα βασισμένου στην παραπάνω τεχνική ανάμιξης, στον οποίο θα μπορεί να γίνεται και η ρευστοποίηση αλλά και η ζύμωση του υλικού. Για αυτό το σκοπό απαιτείται ένας αεροστεγώς κλεισμένος θάλαμος, η δυνατότητα *in situ* αποστείρωσής του και ένα καλύτερο ηλεκτρονικό σύστημα ελέγχου και καταγραφής.

Τέλος, η μελέτη της ζύμωσης του άχυρου με μικτή καλλιέργεια μύκητα και ζύμης έδειξε ότι κυρίως το ενζυμικό σύστημα του *F. oxysporum* αλλά και η κυτταρική βιομάζα του μπορούν να συμβάλλουν στη βελτίωση της απόδοσης σε αιθανόλη. Θα ήταν άξιο να ερευνηθεί παραπάνω και ίσως στο πλαίσιο μιας ενοποιημένης βιοδιεργασίας, η συμβολή του *F. oxysporum* στη ρευστοποίηση και σακχαροποίηση του υλικού σε θερμοκρασίες κοντά σε αυτές της ζύμωσης (30-40 °C).

Βιβλιογραφία

- Abdullah, Ariyanti, D., 2012. Enhancing Ethanol Production by Fermentation using *Saccharomyces cerevisiae* under Vacuum Condition in Batch Operation. Int. Journal of Renewable Energy Development, 1, 6-9.
- Alexandre, H., Ansanay-Galeote, V., Dequin, S., Blondin, B., 2001. Global gene expression during short-term ethanol stress in *Saccharomyces cerevisiae*. FEBS Lett., 498, 98-103.
- Alriksson, B., Sjöde, A., Nilvebrant, N.O., Jönsson, L.J., 2006. Optimal conditions for alkaline detoxification of dilute-acid lignocellulose hydrolysates. Appl. Biochem. Biotechnol., 129-132, 599-611.
- Alriksson, B., Sjöde, A., Sárvári, Horváth, I., Nilvebrant, N.O., Jönsson, L.J., 2005. Ammonium hydroxide detoxification of spruce acid hydrolysates. Appl. Biochem. Biotechnol., 121-124, 911-922.
- Alriksson, B., Cavka, A., Jönsson, L.J., 2011. Improving the fermentability of enzymatic hydrolysates of lignocellulose through chemical in-situ detoxification with reducing agents. Bioresour. Technol., 102, 1254-1263.
- Alfani, F., Gallifuoco, A., Saporoci, A., Spera, A., Cantarella, M., 2000. Comparison of SHF and SSF processes for the bioconversion of steam-exploded wheat straw. J. Ind. Microbiol. Biotechnol., 25, 184-192.
- Almeida, J.R., Modig, T, Petersson, A., Hahn-Hägerdal, B., Lidén, G., Gorwa-Grauslund, M.F., 2007. Increased tolerance and conversion of inhibitors in lignocellulosic hydrolysates by *Saccharomyces cerevisiae*. J. Chem. Technol. Biotechnol., 82, 340-349.
- Andric, P., Meyer, A.S., Jensen, P.A., Dam-Johansen, K., 2010. Effect and Modeling of Glucose Inhibition and *In Situ* Glucose Removal During

- Enzymatic Hydrolysis of Pretreated Wheat Straw. *Appl. Biochem. Biotechnol.*, 160, 280-97.
- Bailey, M.J., Biely, P., Poutanen, K., 1992. Interlaboratory testing of methods for assay of xylanase activity. *J. Biotechnol.*, 23, 257-270.
- Balat, M.J., Balat, H., Oz, C., 2008. Progress in bioethanol processing. *Prog. Energy Combust Sci.*, 34(5), 551-573.
- Balat, M., 2005. Current alternative engine fuels. *Energy Sources*, 27, 569-77.
- Balat, M., 2007. Global bio-fuel processing and production trends. *Energy Explor. Exploit.*, 25, 195-218.
- Ballesteros, M., Oliva, J.M., Negro, M.J., Manzanares, P., Ballesteros, I., 2004. Ethanol from lignocellulosic materials by a simultaneous saccharification and fermentation process (SFS) with *Kluyveromyces marxianus* CECT 10875. *Process Biochemistry*, 39(12), 1843-1848.
- Bayraktar, H., 2005. Experimental and theoretical investigation of using gasoline–ethanol blends in spark-ignition engines. *Renewable Energy*, 30, 1733-1747.
- Beaven, M.J., Charpentier, C., Rose, A.H., 1982. Production and Tolerance of Ethanol in Relation to Phospholipid Fatty-acyl Composition in *Saccharomyces cerevisiae* NCYC 431. *Microbiology*, 128, 1447-1455, doi: 10.1099/00221287-128-7-1447.
- Birch, R.M., Walker, G.M., 2000. Influence of magnesium ions on heat shock and ethanol stress responses of *Saccharomyces cerevisiae*. *Enz. Microb. Technol.*, 26(9-10), 678-687.
- Björklund, L., Larsson, S., Jönsson, L.J., Reimann, A., Nilvebrant, N.O., 2002. Treatment with lignin residue - a novel method for detoxification of lignocellulose hydrolysates. *Appl. Biochem. Biotechnol.*, 98-100, 563-575.

- Brandberg, T., Franzen, C.J., Gustafsson, L., 2004. The fermentation performance of nine strains of *Saccharomyces cerevisiae* in batch and fed-batch cultures in dilute-acid wood hydrolysate. *J. Biosci. Bioeng.*, 98, 122-125.
- Cannella, D., Jorgensen., H., 2013. Do new cellulolytic enzyme preparations affect the industrial strategies for high solids lignocellulosic ethanol production? *Biotechnol. Bioeng.*, 111(1), 56-68.
- Canilha, L., de Almeida e Silva, J.B., Solenzal, A.I.N., 2004. Eucalyptus hydrolysate detoxification with activated charcoal adsorption or ion-exchange resins for xylitol production. *Process Biochem.*, 39, 1909-1912.
- Cantarella, M., Cantarella, L., Gallifuoco, A., Spera, A., Alfani, F., 2004. Comparison of different detoxification methods for steam-exploded poplar wood as a substrate for the bioproduction of ethanol in SHF and SSF. *Proc. Biochem.*, 39, 1533-1542.
- Cardona, C.A., Sánchez, O.J., 2007. Fuel ethanol production: Process design trends and integration opportunities. *Bioresour. Technol.*, 98(12), 2415-2457.
- Carmona, M., Zamarro, M.T., Blazquez, B., Durante-Rodriguez, G., Juarez, J.F., Valderrama, J.A., Barraga, M.J., Garcia, J.L., Diaz, E., 2009. Anaerobic catabolism of aromatic compounds: a genetic and genomic view. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.*, 73, 71-133.
- Carvalho, F., Duarte, L.C., Lopes, S., Parajó, J.C., Pereira, H.H., Gírio, F.M., 2005. Evaluation of the detoxification of brewery's spent grain hydrolysate for xylitol production by *Debaryomyces hansenii* CCM1 941. *Proc. Biochem.*, 40, 1215-23.
- Carvalho, F., Duarte, L.C., Gírio, F.M., 2008. Hemicellulose biorefineries: A review on biomass pretreatments. *J. Sci. Ind. Research.*, 67(11),

849-864.

- Casey, G.P., Ingledeu, W.M., 1985. Reevaluation of alcohol synthesis and tolerance in brewer's yeast. *ASBC J.*, 43, 75-83.
- Chandel, A.K., Chan, E.S., Rudravaram, R., Narasu, M.L., Rao, L.W., Ravindra, P., 2007. Economics and environmental impact of bioethanol production technologies: an appraisal. *Biotechnol. Molecular Biology Review*, 2(1), 14-32.
- Chandel, A.K., Singh, O.V., Narasu, M.L., Rao, L.V., 2011. Bioconversion of *Saccharum spontaneum* (wild sugarcane) hemicellulosic hydrolysate into ethanol by mono and co-cultures of *Pichia stipitis* NCIM3498 and thermotolerant *Saccharomyces cerevisiae*-VS 3. *New Biotechnol.*, 28(6), 593-9.
- Chandler, M., Stanley, G.A., Rogers, P., Chambers, P., 2004. A genomic approach to defining the ethanol stress response in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Ann. Microbiol.*, 54, 427-454.
- Christakopoulos, P., Macris, B.J., Kekos, D., 1989. Direct fermentation of cellulose to ethanol by *Fusarium oxysporum*. *Enzym. Microb. Technol.*, 11, 236-239.
- Christakopoulos, P., Koullas, D.P., Kekos, D., Macris, B.J., 1991. Direct ethanol conversion of pretreated straw by *Fusarium oxysporum*. *Bioresour. Technol.*, 35(3), 297-300.
- Christakopoulos, P., Kekos, D., Kolisis, F.N., Macris, B.J., 1995. Controlling simultaneous production of endoglucanase and beta-glucosidase by *Fusarium oxysporum* in submerged culture. *Biotechnol. Lett.*, 17(8), 883-888.
- Christakopoulos, P., Mamma, D., Kekos, D., Macris, B., Claeysens, M., 1996. Production and partial characterization of xylanase from *Fusarium oxysporum*. *Bioresour. Technol.*, 58(2), 115-119.

- Cysewski, G.R., Wilke, C.R., 1977. Rapid ethanol fermentations using vacuum and cell recycle. *Biotechnol. Bioeng.*, 19, 1125-1143.
- Delgenes, J.P., Moletta, R., Navarro, J.M., 1996. Effects of lignocellulose degradation products on ethanol fermentations of glucose and xylose by *Saccharomyces cerevisiae*, *Zymomonas mobilis*, *Pichia stipitis*, and *Candida shehatae*. *Enzyme Microb. Technol.*, 19, 220-225.
- Delgenes, J.P., Penaud, V., Moletta, R., 2002. Pretreatments for the enhancement of anaerobic digestion of solid wastes. Chapter 8, *Biomethanization of the Organic Fraction of Municipal Solid Wastes*, IWA Publishing, 201-208.
- Demeke, M.M., Dietz, H., Li, Y., Foulquie-Moreno, M.R., Mutturi, S., Deprez, S., Den Abt, T., Bonini, B.M., Liden, G., Dumortier, F., Verplaetse, A., Boles, E., Thevelein, J.M., 2013. Development of a D-xylose fermenting and inhibitor tolerant industrial *Saccharomyces cerevisiae* strain with high performance in lignocellulose hydrolysates using metabolic and evolutionary engineering. *Biotechnol. Biofuels*, 6, 89.
- Demirbas, A., 1991. Catalytic conversion of residual lignocellulosic materials to an acetone-soluble oil. *Fuel Sci. Technol. Int.*, 9, 425-435.
- Demirbas, A., 1998. Determination of combustion heat of fuels by using non-calorimetric experimental data. *Energy Edu. Sci. Technol.*, 1, pp. 7-12.
- Demirbas, A., 2007. Progress and recent trends in biofuels. *Prog. Energy Combust. Sci.*, 33, 1-18.
- Diaz-Montano, D.M., Favela-Torres, E., Cordova, J., 2010. Improvement of growth, fermentative efficiency and ethanol tolerance of *Kloeckera africana* during the fermentation of Agave tequilana juice by addition

- of yeast extract. *J. Sci. Food Agric.*, 90(2), 321-328.
- Dogaris, I., Vakondios, G., Kalogeris, E., Mamma, D., Kekos, D., 2009. Induction of cellulases and hemicellulases from *Neurospora crassa* under solid-state cultivation for bioconversion of sorghum bagasse into ethanol. *Ind. Crops prod.*, 29(2-3), 404-411.
- Dogaris, I., Gkounta, O., Mamma, D., Kekos, D., 2012. Bioconversion of dilute-acid pretreated sorghum bagasse to ethanol by *Neurospora crassa*. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 95(2), pp. 541-550.
- Dombek, K.M., Ingram, L.O., 1986. Determination of the intracellular concentration of ethanol in *Saccharomyces cerevisiae* during fermentation. *Appl. Environ. Microbiol.*, 51, 197-200.
- Du Preez, J.C., Bosch, M., Prior, B.A., 1987. Temperature profiles of growth and ethanol tolerance of the xylose-fermenting yeasts *Candida shehatae* and *Pichia stipites*. *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 25, 521-525.
- Eiteman, M.A., Lee, S.A., Altman, E., 2008. A co-fermentation strategy to consume sugar mixtures effectively. *J. Biol. Engin.*, 2, 3.
- Enari, T.M., Suihko, M.L., 1983. Ethanol production by fermentation of pentoses and hexoses from cellulosic materials. *Crit. Rev. Biotechnol.*, 1(3), 229-240.
- Erdei, B., Galbe, M., Zacchi, G., 2013. Simultaneous saccharification and co-fermentation of whole wheat in integrated ethanol production. *Biomass Bioenergy*, 56, 506-514.
- Fenske, J.J., Griffin, D.A., Penner, M.H., 1998. Comparison of aromatic monomers in lignocellulosic biomass prehydrolysates. *J. Ind. Microbiol. Biotechnol.*, 20, 364-368.
- Ferchak, J.D., Pye, E.K., 1983. Effect of cellobiose, glucose, ethanol, and

- metal ions on the cellulase enzyme complex of *Thermomonospora fusca*. *Biotechnol. Bioeng.*, 25, 2865-2872.
- Franden, M.A., Pilath, H.M., Mohagheghi, A., Pienkos, P.T., Zhang, M., 2013. Inhibition of growth of *Zymomonas mobilis* by model compounds found in lignocellulosic hydrolysates. *Biotechnol. Biofuel*, 6, 99.
- Fukuda, H., Kondo, A., Tamalampundi, S., 2009. Bioenergy: Sustainable fuels from biomass by yeast and fungal whole-cell biocatalysts. *Biochem. Eng. J.*, 44(1), 2-12.
- Galbe, M., Zacchi, G., 2002. A review of the production of ethanol from softwood. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 59, 618-628.
- Galbe, M., Zacchi, G., 2007. Pretreatment of lignocellulosic materials for efficient bioethanol production. *Adv. Biochem. Eng./Biotechnol.*, 108, 41-65.
- Galbe, M., Sassner, P., Wingren, A., Zacchi, G., 2007. Process engineering economics of bioethanol production. *Adv. Biochem. Eng./Biotechnol.*, 108, 303.
- García-Aparicio, M.P., Ballesteros, M., Manzanares, P., Ballesteros, I., González, A., Negro, M.J., 2007. Xylanase Contribution to the Efficiency of Cellulose Enzymatic Hydrolysis of Barley Straw. *Appl. Biochem. Biotechnol.*, 136-140, 353-66.
- Garrote, G., Domínguez, H., Parajó, J.C., 1999. Hydrothermal processing of lignocellulosic materials. *Holz Roh-Werkst*, 57, 191-202.
- Gorsich, S.W., Dien, B.S., Nichols, N.N., Slininger, P.J., Liu, Z.L., Skory, C.D., 2006. Tolerance to furfural-induced stress is associated with pentose phosphate pathway genes ZWF1, GND1, RPE1, and TKL1 in *Saccharomyces cerevisiae*. *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 71, 339-349.

- Gray, W.D., 1941. Studies on the alcohol tolerance of yeasts. *J. Bacteriol.*, 42, 561-574.
- Grzenia, D.L., Schell, D.J., Wickramasinghe, S.R., 2010. Detoxification of biomass hydrolysates by reactive membrane extraction. *J. Memb. Sci.*, 348, 6-12.
- Hahn-Hägerdal, B., Galbe, M., Gorwa-Grauslund, M.F., Lidén, G., Zacchi, G., 2006. Bio-ethanol – the fuel of tomorrow from the residues of today. *TRENDS in Biotechnology*, 24(12), 549-556.
- Hallsworth, J.E., 1998. Ethanol-induced water stress in yeast. *J. Ferment. and Bioengin.*, 85(2), 125-137.
- 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), 384-410.
- Harris, P.V., Xu, F., Kreel, N.E., Kang, C., Fukuyama, S., 2014. New enzyme insights drive advances in commercial ethanol production. *Current Op Chem Biol*, 19, 162 -170.
- Hasunuma, T., Sanda, T., Yamada, R., Yoshimura, K., Ishii, J., Kondo, A., 2011 α . Metabolic pathway engineering based on metabolomics confers acetic and formic acid tolerance to a recombinant xylose-fermenting strain of *Saccharomyces cerevisiae*. *Microb. Cell. Fact.*, 10, 2.
- Hasunuma, T., Sung, K., Sanda, T., Yoshimura, K., Matsuda, F., Kondo, A., 2011 β . Efficient fermentation of xylose to ethanol at high formic acid concentrations by metabolically engineered *Saccharomyces cerevisiae*. *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 90, 997-1004.
- Heer, D., Sauer, U., 2008. Identification of furfural as a key toxin in lignocellulosic hydrolysates and evolution of a tolerant yeast strain. *Microb. Biotechnol.*, 1, 497-506.

- Hendriks, A.T.W.M., Zeeman, G., 2009. Pretreatments to enhance the digestibility of lignocellulosic biomass. *Bioresour. Technol.*, 100, 10-18.
- Hennessey, R.C., Doohan, F., Mullins, E., 2013. Generating Phenotypic Diversity in a Fungal Biocatalyst to Investigate Alcohol Stress Tolerance Encountered during Microbial Cellulosic Biofuel Production. *PlosOne*, 8(10), e77501.
- Hodge, D.B., Andersson, C., Berglund, K.A., Rova, U., 2009. Detoxification requirements for bioconversion of softwood dilute acid hydrolyzates to succinic acid. *Enzym. Microb. Technol.*, 44, 309-316.
- Huang, H.J., Ramaswamy, S., Tschirner, U.W., Ramarao, B.V., 2008. A review of separation technologies in current and future biorefineries. *Sep. Pur. Technol.*, 62, 1-21.
- Ingram, L.O., Buttke, T.M., 1984. Effects of alcohols on microorganisms. *Adv. Microb. Physiol.*, 25, 253-299.
- Jain, M., Wu, N.M., 1977. Effect of small molecules on the dipalmitoyllecithin liposomal bilayers: phase transition in lipid bilayer. *J. Memb. Biol.*, 34, 157-165.
- Jing, X., Zhang, X., Bao, J., 2009. Inhibition performance of lignocellulose degradation products on industrial cellulase enzymes during cellulose hydrolysis. *Appl. Biochem. Biotechnol.*, 159, 696-707.
- Jorgensen, H., Vibe-Pedersen, J., Larsen, J., Felby, C., 2007. Liquefaction of Lignocellulose at High-Solids Concentrations. *Biotechnol. Bioeng.*, 96, 862-870.
- Jönsson, L.J., Palmqvist, E., Nilvebrant, N.O., Hahn-Hägerdal, B., 1998. Detoxification of wood hydrolysates with laccase and peroxidase from the white-rot fungus *Trametes versicolor*. *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 49, 691-697.

- Jönsson, L.J., Alriksson, B., Nilvebrant, N.O., 2013. Bioconversion of lignocellulose: inhibitors and detoxification. *Biotechnol. Biofuels*, 6, 16.
- Jurado, M., Prieto, A., Martínez-Alcalá, A., Martínez, A.T., Martínez, M.J., 2009. Laccase detoxification of steam-exploded wheat straw for second generation bioethanol. *Bioresour. Technol.*, 100, 6378-6384.
- Karnaouri, A.C., Topakas, E., Christakopoulos, P., 2014. Cloning, expression, and characterization of a thermostable GH7 endoglucanase from *Myceliophthora thermophila* capable of high-consistency enzymatic liquefaction. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 98(1), 231-242.
- Katapodis, P., Christakopoulos, P., 2007. Enzymic production of feruloyl xylo-oligosaccharides from corn cobs by a family 10 xylanase from *Thermoascus aurantiacus*. *LWT-Food Sci. Technol.*, 41(7), 1239-1243.
- Kavanagh, K., Whittake, P.A., 1994. Application of the Melle-Boinot process to the fermentation of xylose by *Pachysolen tannophilus*. *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 42, 28-31.
- Keating, J.D., Panganiban, C., Mansfield, S.D., 2006. Tolerance and Adaptation of Ethanologenic Yeasts to Lignocellulosic Inhibitory Compounds. *Biotechnol. and Bioeng.*, 93(6), DOI 10.1002/bit.
- Kim, T.B., Lee, Y.J., Kim, P., Kim, C.S., Oh, D.K., 2004. Increased xylitol production rate during long-term cell recycle fermentation of *Candida tropicalis*. *Biotechnol. Lett.*, 26, 623-627.
- Kim, T.H., Lee, Y.Y., 2005. Pretreatment of corn stover by soaking in aqueous ammonia. *Appl. Biochem. Biotechnol.*, 1119-1132.
- Kiran Sree, N, Sridhar, M., Suresh, K., Banat, I.M., Venkateswar Rao, L., 2000. High alcohol production by repeated batch fermentation using

- an immobilized osmotolerant *Saccharomyces cerevisiae*. J. Ind. Microbiol. Biotechnol., 24, 222-226.
- Klinke, H.B., Olsson, L., Thomsen, A.B., Ahring, B.K., 2003. Potential inhibitors from wet oxidation of wheat straw and their effect on ethanol production of *Saccharomyces cerevisiae*: wet oxidation and fermentation by yeast. Biotechnol. Bioeng., 81, 738-747.
- Klinke, H.B., Thomsen, A.B., Ahring, B.K., 2004. Inhibition of ethanol-producing yeast and bacteria by degradation products produced during pre-treatment of biomass. Appl. Microbiol. Biotechnol., 66, 10-26.
- Koppram, R., Tomás-Pejó, E., Xiros, C., Olsson, L., 2014. Lignocellulosic ethanol production at high-gravity: challenges and perspectives. Trends Biotechnol., 32(1), 46-53.
- Kristensen, J.B., Borjesson, J., Bruun, M.H., Tjerneld, F., Jorgensen, H., 2007. Use of surface active additives in enzymatic hydrolysis of wheat straw lignocellulose. Enzyme and Microbial Technology, 40, 888-895.
- Kumar, P., Barrett, D.M., Delwiche, M.J., Stroeve, P., 2009. Methods for pretreatment of lignocellulosic biomass for efficient hydrolysis and biofuel production. Ind. Eng. Chem. Res., 48(8), 3713-3729.
- Kumar Chandel, A., Kumar Kapoor, R., Singh, A., Chander Kuhad, R., Detoxification of sugarcane bagasse hydrolysate improves ethanol production by *Candida shehatae* NCIM 3501. Bioresour. Technol., 98, 1947-1950.
- Lang, X., Macdonald, D.G., Hill, G.A., 2001. Recycle bioreactor for bioethanol production from wheat starch II. Fermentation and economics. Energy Sources, 23, 427-436.
- Langston, J.A., Shaghasi, T., Abbate, E., Xu, F., Vlasenko, E., Sweeney,

- M.D., 2011. Oxidoreductive Cellulose Depolymerization by the Enzymes Cellobiose Dehydrogenase and glycoside Hydrolase 61. *Am. Soc. Microbiol.*, 77(19), 7007-7015.
- Larsen, J., Øtergaard Petersen, M., Thirup, L., Li, H.W., Iversen, F.K., 2008. The IBUS process - Lignocellulosic bioethanol close to a commercial reality. *Chem. Eng. Technol.*, 31, 765-772.
- Larsson, S., Palmqvist, E., Hahn-Hagerdal, B., Tengborg, C., Stenberg, K., Zacchi, G., Nilvebrant, N.O., 1999. The generation of fermentation inhibitors during dilute acid hydrolysis of softwood. *Enzyme Microb. Technol.*, 24, 151-159.
- Larsson, S., Quintana-Sainz, A., Reimann, A., Nilvebrant, N.O., Jonsson, L.J., 2000. Influence of lignocellulose-derived aromatic compounds on oxygen-limited growth and ethanolic fermentation by *Saccharomyces cerevisiae*. *Appl. Biochem. Biotechnol.*, 84-86, 617-632.
- Larsson, S., Cassland, P., Jönsson, L.J., 2001. Development of a *Saccharomyces cerevisiae* strain with enhanced resistance to phenolic fermentation inhibitors in lignocellulose hydrolysates by heterologous expression of laccase. *Appl. Environ. Microbiol.*, 67, 1163-1170.
- Larsson, S., Nilvebrant, N.O., Jönsson, L.J., 2001. Effect of overexpression of *Saccharomyces cerevisiae* Pad1p on the resistance to phenylacrylic acid and lignocellulose hydrolysates under aerobic and oxygen-limited conditions. *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 57, 167-174.
- Larsson, S., Reimann, A., Nilvebrant, N.O., Jönsson, L.J., 1999. Comparison of different methods for the detoxification of lignocellulose hydrolysates of spruce. *Appl. Biochem. Biotechnol.*, 77, 91-103.

- Laureano-Perez, L., Teymouri, F., Alizadeh, H., Dale, B.E., 2005. Understanding Factors that Limit Enzymatic Hydrolysis of Biomass. In: Twenty-Sixth Symposium on Biotechnology for Fuels and Chemicals, pp. 1081-1099.
- Leao, C., van Uden, N., 1984. Effects of ethanol and other alkanols on the general amino acid permease of *Saccharomyces cerevisiae*. Biotechnol. Bioeng., 26, 403-405.
- Leao, C., Van Uden, N., 1984. Effects of ethanol and other alkanols on the glucose transport system of *Saccharomyces cerevisiae*. Biotechnol. Bioeng, 24, 2601-2604.
- Lee, J.H., Woodard, J.C., Pagan, R.J., Rogers, P.L., 1981. Vacuum fermentation for ethanol production using strains of *Zymomonas Mobilis*. Biotechnol. Lett., 3(4), 177-182.
- Lee, T.Y., Kim, M.D., Kim, K.Y., Park, K., Ryu, Y.W., Seo, J.H., 2000. A parametric study on ethanol production from xylose by *Pichia stipitis*. Biotechnol. Bioprocess Eng., 5, 27-31.
- Lee, W.G., Lee, J.S., Shin, C.S., Park, S.C., Chang, H.N., Chang, Y.K., 1999. Ethanol production using concentrated oak wood hydrolysates and methods to detoxify. Appl. Biochem. Biotechnol., 77-79, 547-559.
- Lin, Y., Tanaka, S., 2006. Ethanol fermentation from biomass resources: current state and prospects. Appl. Microbiol. Biotechnol., 69, 627-642.
- Liu, Z.L., Slininger, P.J., Dien, B.S., Berhow, M.A., Kurtzman, C.P., Gorsich, S.W., 2004. Adaptive response of yeasts to furfural and 5-hydroxymethylfurfural and new chemical evidence for HMF conversion to 2,5-bis-hydroxymethylfuran. J. Ind. Microbiol. Biotechnol., 31, 345-352.

- López, M.J., Nichols, N.N., Dien, B.S., Moreno, J., Bothast, R.J., 2004. Isolation of microorganisms for biological detoxification of lignocellulosic hydrolysates. *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 64, 125-131.
- Luong, J.H.T., 1985. Kinetics of ethanol inhibition in alcohol fermentation. *Biotechnol. Bioeng.*, 27, 280-285.
- 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, 506-577.
- Lynd, L.R., van Zyl, W.H., McBride, J.E., Laser, M., 2005. Consolidated bioprocessing of cellulosic biomass: an update. *Current Opinion biotechnol.*, 16, 577-583.
- Maas, R.H., Springer, J., Eggink, J., Weusthuis, R.A., 2008. Xylose metabolism in the fungus *Rhizopus oryzae*: effect of growth and respiration on L+-lactic acid production. *J. Ind. Microbiol. Biotechnol.*, 35(6), 569-578.
- MacLean, H.L., Lave, L.B., 2003. Evaluating automobile fuel/propulsion system technologies. *Prog. Ener. Combust. Sci.*, 29, 1-69.
- Maiorella, B., Blanch, H.W., Wilke, C.R., 1983. By product inhibition effects from ethanolic fermentation of *Saccharomyces Cerevisiae*, *Biotechnol. Bioeng.*, 25(1), 103-121.
- Mamma, D., Koullas, D., Fountoukidis, G., Kekos, D., Macris, B.J. Koukios, E., 1996. Bioethanol from sweet sorghum: Simultaneous saccharification and fermentation of carbohydrates by a mixed microbial culture. *Pr. Biochem.*, 31(4), 377-381.
- de Mancilha, I.M., Karim, M.N., 2003. Evaluation of Ion Exchange Resins for Removal of Inhibitory Compounds from Corn Stover Hydrolyzate for Xylitol Fermentation. *Biotechnol. Prog.*, 19, 1837-1841.

- Margeot, A., Hahn-Hagerdal, B., Edlund, M., Slade, R., Monot, F., 2009. New improvements for lignocellulosic ethanol. *Current Opinion Biotechnol.*, 20(3), 372-380.
- Matsakas, L., Christakopoulos, P., 2013. Optimization of ethanol production from high dry matter liquefied dry sweet sorghum stalks. *Biomass and Bioenergy*, 51, 91-98.
- Mazeau, K., Moine, C., Krausz, P., Gloaguen, V., 2005. Conformational analysis of xylan chains. *Carbohydrate Research*, 340, 2752-2760.
- Meaden, P.G., Arneborg, N., Guldfeldt, L.U., Siegumfeldt, H., Jakobsen, M., 1999. Endocytosis and vacuolar morphology in *Saccharomyces cerevisiae* are altered in response to ethanol stress or heat shock. *Yeast*, 15, 1211-1222.
- Meyrial, V., Delgenes, J.P., Romieu, C., Moletta, R., Gounot, A.M., 1995. Ethanol tolerance and activity of plasma membrane ATPase in *Pichia stipitis* grown on D-xylose or on D-glucose. *Enzym. Microb. Technol.*, 17, 535-540.
- Miller, G. L., 1959. Use of Dinitro-Salicylic as Reagent for the determination of reducing sugars. *Anal. Chem.*, 31, 426-428.
- Mishar, P., Prasad, R., 1989. Relationship between ethanol tolerance and fatty acyl composition of *Saccharomyces cerevisiae*. *Appl. Microbiol.*, 30(3): 294-298.
- Modig, T., Lidén, G., Taherzadeh, M.J., 2002. Inhibition effects of furfural on alcohol dehydrogenase, aldehyde dehydrogenase and pyruvate dehydrogenase. *Biochem. J.*, 363, 769-776.
- Moreno, A.D., Tomas-Pejo, E., Ibarra, D., Ballesteros, M., Olsson, L., 2013. In situ laccase treatment enhances the fermentability of steam-exploded wheat straw in SSCF processes at high dry matter consistencies. *Bioresour. Technol.*, 143, 337-343.

- Mosier, N., Wyman, C., Dale, B., Elander, R., Lee, Y.Y., Holtzapple, M., Ladish, M., 2005a. Features of promising technologies for pretreatment of lignocellulosic biomass. *Bioresour. Technol.*, 96, 673-686.
- Mosier, N., Hendrickson, R., Ho, N., Sedlak, M., Ladisch, M.R., 2005b. Optimazation of pH controlled liquid hot water pretreatment of corn stover. *Bioresour. Technol.*, 96, 1986-1993.
- Mussato, S.I., Roberto, I.C., 2001. Hydrolysate detoxification with activated charcoal for xylitol production by *Candida guilliermondii*. *Biotechnol. Lett.*, 23, 1681-1684.
- Mussatto, S.I., Roberto I.C., 2004. Alternatives for detoxification of diluted-acid lignocellulosic hydrolyzates for use in fermentative processes: a review. *Biores. Technol.*, 93, 1-10.
- Nagodawithana, T.W., Steinkraus, K.H., 1976. Influence of the rate of ethanol production and accumulation on the viability of *Saccharomyces cerevisiae* in "rapid fermentation". *Appl. Environ. Microbiol.*, 31, 151-162.
- Nguyen, V.D., Auresenia, J., Kosuge, H., Tan, R.R., Brondial, Y., 2011. Vacuum fermentation integrated with separation process for ethanol production. *Biochem. Eng.*, 55(3), 208-214.
- Nichols, N.N., Sharma, L.N., Mowery, R.A., Chambliss, C.K., van Walsum, G.P., Dien, B.S., Iten, L.B., 2008. Fungal metabolism of fermentation inhibitors present in corn stover dilute acid hydrolysate. *Enz. Microb. Technol.*, 42, 624-630.
- Nilvebrant, N.O., Reimann, A., Larsson, S., Jönsson, L.J., 2001. Detoxification of lignocellulose hydrolysates with ion-exchange resins. *Appl. Biochem. Biotechnol.*, 91-93, 35-49.
- Okuda, N., Soneura, M., Ninomiya, K., Katakura, Y., Shioya, S., 2008.

- Biological detoxification of waste house wood hydrolysate using *Ureibacillus thermosphaericus* for bioethanol production. *J. Biosci. Bioeng.*, 106, 128-133.
- Olofsson, K., Bertilsson, M., Lidén, G., 2008. A short review on SSF – an interesting process option for ethanol production from lignocellulosic feedstocks. *Biotechnol. for Biofuel*, 1, 7.
- Olsson, L., Hahn-Hagerdal, B., 1999. Fermentation of lignocellulosic hydrolysates for ethanol production. *Enz. Microb. Technol.*, 18, 312-331.
- Otero, J., Panagiotou, G., Olsson, L., 2007. Fueling industrial biotechnology growth with bioethanol. *Biofuels*, 1, 40.
- Palmqvist, E., Hahn-Hägerdal, B., Szengyel, Z., Zacchi, G., Réczey, K., 1997. Simultaneous detoxification and enzyme production of hemicellulose hydrolysates obtained after steam pretreatment. *Enzyme Microb. Technol.*, 20, 286-293.
- Palmqvist, E., Hahn-Hagerdal, B., 2000. Fermentation of lignocellulosic hydrolysates. I: inhibition and detoxification. *Bioresour. Technol.*, 74, 17-24.
- Palmqvist, E., Hahn-Hägerdal, B., 2000. Fermentation of lignocellulosic hydrolysates. II: Inhibitors and mechanisms of inhibition. *Bioresour. Technol.*, 74, 25-33.
- 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. *Ind. Cr. Prod.*, 18, 7-45.
- Panagiotou, G., Villas-Boas, S.G., Christakopoulos, P., Nielsen, J., Olsson, L., 2005a. Intracellular metabolite profiling of *Fusarium oxysporum* converting glucose to ethanol. *J. Biotechnol.*, 115, 425-434.

- Panagiotou, G., Christakopoulos, P., Olsson, L., 2005 β . Simultaneous saccharification and fermentation of cellulose by *Fusarium oxysporum* F3-growth characteristics and metabolite profiling. *Enzym. Microb. Technol.*, 36, 693-699.
- Panagiotou, G., Olsson, L., 2007. Effect of compounds released during pretreatment of wheat straw on microbial growth and enzymatic hydrolysis rates. *Biotechnol. Bioeng.*, 96, 250-258.
- Panagiotou, G., Topakas, E., Moukouli, M., Christakopoulos, P., Olsson, L., 2011. Studying the ability of *Fusarium oxysporum* and recombinant *Saccharomyces cerevisiae* to efficiently cooperate in decomposition and ethanolic fermentation of wheat straw. *Biomass and Bioenergy*, 35(8), 3727-3732.
- Parajó, J.C., Dominguez, H., Dominguez, J.M., 1996. Charcoal adsorption of wood hydrolysates for improving their fermentability: influence of the operational conditions. *Bioresour. Technol.*, 57, 179-85.
- Parajó, J.C., Dominguez, H., Dominguez, J.M., 1997. Improved xylitol production with *Debaromyces hansenii* Y-7426 from raw or detoxified wood hydrolysates. *Enzyme Microb. Technol.*, 21, 18-24.
- Parawira, W., Tekere, M., 2011. Biotechnological strategies to overcome inhibitors in lignocellulose hydrolysates for ethanol production: review. *Crit. Rev. Biotechnol.*, 31, 20-31.
- Parekh, S.R., Yu, S., Wayman, M., 1986. Adaptation of *Candida shehatae* and *Pichia stipitis* to wood hydrolysates for increased ethanol production. *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 25, 300-304.
- Persson, P., Larsson, S., Jönsson, L.J., Nilvebrant, N.O., Sivik, B., Munteanu, F., Thörneby, L., Gorton, L., 2002. Supercritical fluid extraction of a lignocellulosic hydrolysate of spruce for detoxification and to facilitate analysis of inhibitors. *Biotech. Bioeng.*, 79, 694-700.

- Petersson, A., Almeida, J.R.M., Modig, T., Karhumaa, K., Hahn-Hägerdal, B., Gorwa-Grauslund, M.F., Lidén, G., 2006. A 5-hydroxymethyl furfural reducing enzyme encoded by the *Saccharomyces cerevisiae* ADH6 gene conveys HMF tolerance. *Yeast*, 23, 455-464.
- Pienkos, P.T., Zhang, M., 2009. Role of pretreatment and conditioning processes on toxicity of lignocellulosic biomass hydrolysates. *Cellulose*, 16, 743-762.
- Pietrzak, W., Kawa-Rygielska, J., 2015. Simultaneous saccharification and ethanol fermentation of waste wheat-rye bread at very high solids loading: Effect of enzymatic liquefaction conditions. *Fuel*, 147(1), 236-242.
- Prasad, S., Singh, A., Joshi, H.C., 2007. Ethanol as an alternative fuel from agricultural, industrial and urban residues. *Resour. Conserv. Recycl.* 50, 1-39.
- Puhan, S., Vedaraman, N., Rambrahamam, B.V., Nagarajan, G., 2005. Mahua (*Madhuca indica*) seed oil: A source of renewable energy in India. *J. Scient. Ind. Research*, 64(11), 890-896.
- Puppan, D., 2002. Environmental evaluation of biofuels. *Periodica Polytechnica Ser. Soc. Man. Sci.*, 10, 95-116.
- Ranatunga, T.D., Jervis, J., Helm, R.F., McMillan, J.D., Wooley, R.J., 2000. The effect of overliming on the toxicity of dilute acid pretreated lignocellulosics: The role of inorganics, uronic acids and ether-soluble organics. *Enzyme Microb. Tech.*, 27, 240-247.
- Roberto, I.C., Felipe, M.G.A., Lacis, L.C., Silva, S.S., Mancilha, I.M., 1991. Utilization of sugarcane bagasse hemicellulosic hydrolysate by *Candida guilliermondii* for xylitol production. *Bioresour. Technol.*, 36, 271-5.
- Roffler, S.R., Blanch, H.W., Wilke, C.R. 1984. *In situ* recovery of

- fermentation products. Trends Biotechnol., 2, 129-136.
- Sánchez, O.J., Cardona, C.A., 2008. Trends in biotechnological production of fuel ethanol from different feedstocks. Bioresour. Technol., 99 (13), 5270-5295.
- Sárvári Horváth, I., Sjöde, A., Nilvebrant, N.O., Zagorodni, A., Jönsson, L.J., 2004. Selection of anion exchangers for detoxification of dilute-acid hydrolysates from spruce. Appl. Biochem. Biotechnol., 114, 525-538.
- Sato, T.K., Liu, T., Parreiras, L.S., Williams, D.L., Wohlbach, D.J., Bice, B.D., Ong, I.M., Breuer, R.J., Qin, L., Busalacchi, D., 2014. Harnessing genetic diversity in *Saccharomyces cerevisiae* for fermentation of xylose in hydrolysates of alkaline hydrogen peroxide-pretreated biomass. Appl. Environ. Microbiol., 80, 540-554.
- Scotti, C.T., Vergoignan, C., Feron, G., Durand, A., 2001. Glucosamine measurement as indirect method for biomass estimation of *Cunninghamella elegans* grown in solid state cultivation conditions. Biochem. Eng. J., 7, 1-5.
- Singh, A., Kumar, P.K., 1991. *Fusarium oxysporum*: status in bioethanol production. Crit. Rev. Biotechnol., 11(2), 129-147.
- Singh, R., Shukla, A., Tiwari, S., Srivastava, M., 2014. A review on delignification of lignocellulosic biomass for enhancement of ethanol production potential. Renew. Sustain. Energ. Rev., 32, 713-728.
- Skovgaard, P.A., Jorgensen, H., 2013. Influence of high temperature and ethanol on thermostable lignocellulolytic enzymes. J. Ind. Microbiol. Biotechnol., 40(5), 447-456.
- Sluiter, A., Hames, B., Ruiz, R., Scarlata, C., Sluiter, J., Templeton, D., 2005. Determination of structural carbohydrates and lignin biomass. Laboratory Analytical Protocol. National Renewable Energy

Laboratory, Golden.

- Soni, M.L., Meehrotra, R.N., Kapoor, R.C., 1982. Dissociation constant & some thermodynamic parameters of levulinic acid. *India J. Chem.*, 21A, 196-197.
- Stanley, G., Bandara, D.A., Fraser, S., Chambers, P.J., Stanley, G.A., 2010. The ethanol stress response and ethanol tolerance of *Saccharomyces cerevisiae*. *J. Appl. Microbiol.*, 109, 13-24.
- Suihko, M.L., 1983. The fermentation of different carbon sources by *Fusarium oxysporum*. *Biotechnol. Lett.*, 5, 721-724.
- Sun, Y., Cheng, J., 2002. Hydrolysis of lignocellulosic materials for ethanol production: a review. *Bioresour. Technol.*, 83, 1-11.
- Szczodrak, J., Fiedurek, J., 1995. Technology for conversion of lignocellulosic biomass to ethanol. *Biomass and Bioenergy*, 10, 367-375.
- Taherzadeh, M.J., Eklund, R., Gustafsson, L., Niklasson, C., Lidén, G., 1997. Characterization and fermentation of dilute-acid hydrolyzates from wood. *Ind. Eng. Chem. Res.*, 36, 4659-4665.
- Taherzadeh, M.J., Gustafsson, L., Niklasson, C., Liden, G., 2000. Physiological effects of 5-hydroxymethylfurfural on *Saccharomyces cerevisiae*. *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 53, 701-708.
- Tang, Y., Zha, D., Cristhian, C., Jiang, J., 2011. Simultaneous saccharification and cofermentation of lignocellulosic residues from commercial furfural production and corn kernels using different nutrient media. *Biotechnol. Biofuel*, 4, 22.
- Taylor, F., Marquez, M.A., Johnston, D.B., Goldberg, N.M., Hicks, K.B., 2010. Continuous high-solids corn liquefaction and fermentation with stripping of ethanol. *Bioresour. Technol.*, 101, 4403-4408.
- Thomas, V., Kwong, A., 2001. Ethanol as a lead replacement: phasing out

- leaded gasoline in Africa. *Energy Policy*, 29, 1133-1143.
- Thomas, K.C., Ingledew, W.M., 1992. Production of 21% (v/v) ethanol by fermentation of very high gravity (VHG) wheat mashes. *J. Ind. Microbiol.*, 10, 61-68.
- Thomsen, M.H., Thygesen, A., Jørgensen H., Larsen, J., Christensen, B.H., Thomsen, A.B., 2006. Preliminary results on optimization of pilot scale pretreatment of wheat straw used in coproduction of bioethanol and electricity. *Appl. Biochem. Biotechnol.*, 130, 448-60.
- Thomsen, M.H., Thygesen, A., Thomsen, A.B., 2009. Identification and characterization of fermentation inhibitors formed during hydrothermal treatment and following SSF of wheat straw. *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 83(3), 447-455.
- Tomas-Pejo, E., Oliva, J.M., Ballesteros, M., 2008. Realistic approach for full-scale bioethanol production from lignocellulose: a review. *J. Sci. Ind. Res.*, 67, 874-884.
- Tomek, K.J., Saldarriaga, C.R.C., Velasquez, F.P.C., Liu, T., Hodge, D.B., Whitehead, T.A., 2015. Removal and Upgrading of Lignocellulosic Fermentation Inhibitors by *In Situ* Biocatalysis and Liquid-Liquid Extraction. *Biotechnol. and Bioengin.*, 112(3), DOI 10.1002/bit.25473.
- Wheeler, K., Janshekar, H., Sakuma, Y., 1991. Ethyl alcohol. In *Chemical Economics Handbook*, SRI International, USA.
- Wickramasinghe, S.R., Grzenia, D.L., 2008. Adsorptive membranes and resins for acetic acid removal from biomass hydrolysates, *Desalination*, 234, 144-151.
- Wingren, A., Galbe, M., Roslander, C., Rudolf, A., Zacchi, G., 2005. Effect of reduction in yeast and enzyme concentrations in a simultaneous-saccharification-and-fermentation-based bioethanol process. *Appl.*

- Biotechnol. Biochem., 122, 485-500.
- Woo, J.M., Yang, K.M., Kim, S.U., Blank, L.M., Park, J.B., 2014. High temperature stimulates acetic acid accumulation and enhances the growth inhibition and ethanol production by *Saccharomyces cerevisiae* under fermenting conditions. Appl. Microbiol. Biotechnol., 98(13), 6085-6094.
- Wood, T.M., Bhat, K.M., 1988. Methods for measuring cellulase activities. Methods Enzymo, 160, 87-112.
- Wu, Z., Lee, Y.Y., 1997. Inhibition of the enzymatic hydrolysis of cellulose by ethanol. Biotechnol. Lett., 19, 977-979.
- Wu, C.W., Chen, R.H., Pu, J.Y., Lin, T.H., 2004. The influence of air–fuel ratio on engine performance and pollutant emission of an SI engine using ethanol–gasolineblended fuels. Atmospheric Environment, 38, 7093-7100.
- 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. Ind. Crop. Prod., 28, 213-24.
- Xiros, C., Topakas, E., Katapodis, P., Christakopoulos, P., 2008b. Hydrolysis and fermentation of brewer's spent grain by *Neurospora crassa*. Bioresour. Technol., 99, 5427-35.
- Xiros, C., Christakopoulos, P., 2009. Enhanced ethanol production from brewer's spent grain by a *Fusarium oxysporum* consolidated system. Biotechnol. Biofuels., 2, 4.
- Xiros, C., Katapodis, P., Christakopoulos, P., 2009. Evaluation of *Fusarium oxysporum* cellulolytic system for an efficient hydrolysis of hydrothermally treated wheat straw. Bioresour. Technol., 100, 5362-65.

- Xiros, C., Vafiadi, C., Paschos, T., Christakopoulos, P., 2011. Toxicity tolerance of *Fusarium oxysporum* towards inhibitory compounds formed during pretreatment of lignocellulosic materials. *J. Chem. Technol. Biotechnol.*, 86(2), 223-30.
- Xiros, C., Olsson, L., 2014. Comparison of strategies to overcome the inhibitory effects in high-gravity fermentation of lignocellulosic hydrolysates. *Biomass Bioenergy*, 65, 79-90.
- Yoshikawa, H., Hirano, A., Arakawa, T., Shiraki, K., 2012. Mechanistic insights into protein precipitation by alcohol. *Int. J. Biol. Macromol.*, 50(3), 865-871.
- Zaldivar, J., Nielsen, J., Olsson, L., 2001. Fuel ethanol production from lignocellulose: a challenge for metabolic engineering and process integration. *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 56, 17-34.
- Zeng, M., Mosier, N.S., Huang, C.P., Sherman, D.M., Ladisch, M.R., 2007. Microscopic examination of changes of plant cell structure in corn stover due to cellulase activity and hot water pretreatment. *Biotechnol. Bioeng.*, 97(2), 265-278.
- Zhang, Y.H.P., Lynd, L.R., 2004. Towards an aggregated understanding of enzymatic hydrolysis of cellulose: noncomplexed cellulase systems. *Biotechnol. Bioeng.*, 88, 797-824.
- Zhang, J., Tuomainen, P., Siika-Aho, M., Viikari, L., 2011. Comparison of the synergistic action of two thermostable xylanases from GH families 10 and 11 with thermostable cellulases in lignocellulose hydrolysis. *Bioresour. Technol.*, 102(19), 9090-9095.
- Zhao, X.Q., Bai, F.W., 2009. Mechanisms of yeast stress tolerance and its manipulation for efficient fuel ethanol production. *J. Biotechnol.*, 144, 23-30.
- Zhu, J., Yong, Q., Xu, Y., Yu, S., 2011. Detoxification of corn stover

prehydrolyzate by trialkylamine extraction to improve the ethanol production with *Pichia stipitis* CBS 5776. *Bioresour. Technol.*, 102, 1663-1668.

van Zyl, C., Prior, A.B., du Perez, J.C., 1991. Acetic acid inhibition of D-xylose fermentation by *Pichia Stipitis*. *Enz. Microbial. Technol.*, 13(1), 82-86.