



ΕΘΝΙΚΟ ΜΕΤΣΟΒΙΟ ΠΟΛΥΤΕΧΝΕΙΟ

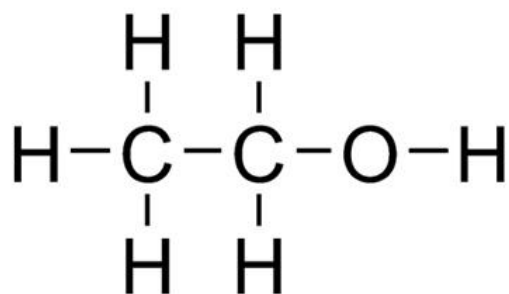
ΣΧΟΛΗ ΧΗΜΙΚΩΝ ΜΗΧΑΝΙΚΩΝ

ΤΟΜΕΑΣ IV:

ΣΥΝΘΕΣΗ ΚΑΙ ΑΝΑΠΤΥΞΗ ΒΙΟΜΗΧΑΝΙΚΩΝ ΔΙΑΔΙΚΑΣΙΩΝ

Διπλωματική εργασία:

ΠΑΡΑΓΩΓΗ ΒΙΟΑΙΘΑΝΟΛΗΣ ΑΠΟ ΠΡΟΚΑΤΕΡΓΑΣΜΕΝΑ ΜΕ ΥΓΡΗ
ΟΞΕΙΔΩΣΗ ΣΤΕΛΕΧΗ ΑΡΑΒΟΣΙΤΟΥ



Σπουδαστής :

ΠΕΡΡΑΚΗΣ ΜΠΙΣΤΗΣ

Επιβλέπων :

ΕΥΑΓΓΕΛΟΣ ΤΟΠΑΚΑΣ (ΕΠΙΚΟΥΡΟΣ ΚΑΘΗΓΗΤΗΣ ΕΜΠ)

Αθήνα, 2016

Ευχαριστίες

Η παρούσα διπλωματική εργασία εκπονήθηκε στο Εργαστήριο Βιοτεχνολογίας της σχολής Χημικών Μηχανικών του Εθνικού Μετσόβιου Πολυτεχνείου και αποτελεί την ολοκλήρωση των σπουδών μου στην πενταετούς φοίτησης σχολή Χημικών Μηχανικών.

Αρχικά θα ήθελα να ευχαριστήσω θερμά τον Επίκουρο Καθηγητή του ΕΜΠ Ευάγγελο Τόπακα για την ανάθεση του θέματος αλλά και για την πολύτιμη βοήθειά του κατά την διεξαγωγή των πειραμάτων και τον χρόνο που διέθεσε. Επίσης θα ήθελα να τον ευχαριστήσω για τις γνώσεις που μου προσέφερε αλλά και για την βοήθειά του οποτεδήποτε την χρειάστηκα.

Επίσης θα ήθελα να ευχαριστήσω θερμά τον υποψήφιο διδάκτορα Κωνσταντίνο Κατσίμπουρα ο οποίος με καθοδήγησε καθ' όλη τη διάρκεια της διπλωματικής μου και απαντούσε σε όλες τις ερωτήσεις μου, ακόμα και άμα τον ρώταγα Κυριακή μεσημέρι, με προθυμία και θέληση να μου λύσει τις απορίες μου. Επίσης θέλω να τον ευχαριστήσω για την καλή του διάθεση και το ευχάριστο κλίμα που επικρατούσε όταν δούλευα μαζί του.

Ακόμα θα ήθελα να ευχαριστήσω την Μαρία Ζαχαροπούλου, η οποία επίσης έκανε διπλωματική με τη βοήθεια του Κώστα, και αρκετές φορές χρειάστηκε να συνεργαστούμε. Η συνεργασία αυτή ήταν άψογη και η Μαρία ήταν πάντα πρόθυμη να βοηθήσει.

Στη συνέχεια θα ήθελα να ευχαριστήσω όλα τα μέλη του εργαστηρίου για το πολύ ωραίο, φιλικό και αξιοζήλευτο κλίμα που επικρατούσε στο εργαστήριο. Συγκεκριμένα θα ήθελα να ευχαριστήσω τους υποψήφιους διδάκτορες Μαρία Κανελλή, Ευστράτιο Νικολάιβιτς, Παναγιώτη Αγιουτάντη, Αναστασία Ζέρβα, Μαρία-Θεογνωσία Σαββίδου, Δανάη Αλαμάνου και Αικατερίνη Κόντη, τους συμφοιτητές μου που εκπονούσαν διπλωματική εργασία Αγγελική-Ελένη Χαλιμά, Παύλο Κοτίδη, Ευθυμία Κουτροφίνη, Αλεξάνδρα Κατσαμπέα, Ειρήνη Βαρδάκα και Αθηνά Δεσденάκη τους ΕΔΙΠ Μαρία Δημαρόγκωνα και Διομήδη Μάμμα και τους καθηγητές Δημήτριο Κέκο, Νικόλαο Τσουκιά και Φραγκίσκο Κολίση.

Τέλος θα ήθελα να ευχαριστήσω την οικογένειά μου και τους φίλους μου που μου στάθηκαν καθ' όλη τη διάρκεια των σπουδών μου αλλά και κατά την συγγραφή της παρούσας εργασίας.

Περίληψη

Σκοπός της συγκεκριμένης διπλωματικής εργασίας ήταν η παραγωγή βιοαιθανόλης από στελέχη αραβοσίτου τα οποία είχαν υποστεί προεπεξεργασία είτε με υγρή οξείδωση είτε με απολιγνίνωση Milox ώστε να προσδιοριστούν οι συνθήκες οι οποίες οδηγούν στην υψηλότερη παραγωγή της. Οι προκατεργασίες πραγματοποιήθηκαν από το Ινστιτούτο Χημικών Διεργασιών και Ενεργειακών Πόρων (ΙΔΕΠ). Η υγρή οξείδωση πραγματοποιήθηκε σε θερμοκρασία 175°C, με αέρα περιεκτικότητας 40% σε O₂, με χρήση διαλύτη H₂O/(CH₃)₂CO (1:1), για 120 min. Η προκατεργασία αυτή πραγματοποιήθηκε σε 3 δείγματα στελεχών αραβοσίτου με μεταβολή της παραμέτρου της πίεσης (8.5, 20, 40 bar) και η τελική σύσταση της βιομάζας, σε ξηρή βάση, σε κυτταρίνη ημικυτταρίνη και λιγνίνη ήταν αντίστοιχα 66.78%, 16.95% και 12.09% για τα 8.5 bar, 71.41%, 14.65% και 8.64% για τα 20 bar και 74.63%, 13.32%H και 7.61%Λ για τα 40 bar. Η προκατεργασία απολιγνίνωσης Milox πραγματοποιήθηκε σε πίεση 1 bar, θερμοκρασία 80°C, με χρήση διαλύτη φορμικό οξύ/ 2% H₂O₂, για 60 min και η τελική σύσταση των στελεχών αραβοσίτου ήταν αντίστοιχα 70.08%, 8.68% και 7.23%. Στη συνέχεια πραγματοποιήθηκε μελέτη ενζυμικού φορτίου για την επιλογή της βέλτιστης συγκέντρωσης του εμπορικού ενζυμικού σκευάσματος Cellic CTec2 (9 mg/g ΞB) στους 50 °C με ανάδευση 180 rpm, για 72 h με 10% (w/v) συγκέντρωση στερεών. Κατά την υδρόλυση των παραπάνω δειγμάτων στελεχών αραβοσίτου, η συγκέντρωση γλυκόζης που παράχθηκε ήταν: 62.55 ± 0.74 g/L (8.5 bar), 68.93 ± 0.89 g/L (20 bar), 79.24 ± 0.22 g/L (40 bar) και 55.54 ± 1.48 g/L (Milox). Ακολούθως έγινε ταυτόχρονη σακχαροποίηση και ζύμωση με την προσθήκη ενός σταδίου προϋδρόλυσης 12 h, για την εύρεση της αποδοτικότερης προκατεργασίας ως προς την παραγωγή αιθανόλης. Η προϋδρόλυση έγινε με χρήση της βέλτιστης συγκέντρωσης ενζυμικού σκευάσματος που προσδιορίστηκε μέσω της μελέτης ενζυμικού φορτίου, στις ίδιες συνθήκες. Για να πραγματοποιηθεί αλκοολική ζύμωση προστέθηκε ο μικροοργανισμός *S. Cerevisiae* (Ethanol Red®) σε συγκέντρωση 15 mg/g ΞB. Η ζύμωση πραγματοποιήθηκε σε 35°C, με ανάδευση 80 rpm για 120 h. Υψηλότερη συγκέντρωση αιθανόλης σημειώθηκε στο προκατεργασμένο με υγρή οξείδωση δείγμα σε πίεση 40 bar (26.03 g/L, 61.57% απόδοση). Επομένως, το παραπάνω δείγμα επιλέχθηκε για ζύμωση μεγαλύτερης κλίμακας με στάδιο ρευστοποίησης/σακχαροποίησης σε αναμικτήρα ελεύθερης πτώσης σε συγκέντρωση στερεών 25% (w/v). Στη συνέχεια μελετήθηκε η επίδραση της διάρκειας (6 και 12 h) του σταδίου ρευστοποίησης/σακχαροποίησης στην παραγωγή βιοαιθανόλης. Μεγαλύτερη παραγωγή αιθανόλης παρατηρήθηκε σε διάρκεια 12 h ρευστοποίησης/σακχαροποίησης (72.65 ± 1.44 g/L, απόδοσης 68.72%) από αυτή των 6 h (70.87 ± 0.22 g/L, απόδοσης 66.57%). Η διαφορά είναι αρκετά μικρή, επομένως η διάρκεια των 6 h είναι επαρκής για την μετέπειτα παραγωγή αιθανόλης σε υψηλές συγκεντρώσεις. Η παραγωγικότητα (1,48 g/L/h) όσο και η συγκέντρωση σε αιθανόλη (71,0 g/L) με απόδοση 67,1%, που αναφέρονται στην παρούσα εργασία είναι ανάμεσα στις υψηλότερες που συναντώνται στη διεθνή βιβλιογραφία.

Λέξεις κλειδιά: Στελέχη αραβοσίτου, υγρή οξείδωση, ενζυμική υδρόλυση, αλκοολική ζύμωση, προϋδρόλυση, ταυτόχρονη σακχαροποίηση και ζύμωση (SSF), αναμικτήρας ελεύθερης πτώσης.

Abstract

The purpose of this thesis was the production of bioethanol using corn stover which had been pretreated either with wet oxidation or with a delignification method (Milox) to find out the conditions which lead to the highest ethanol yield. These pretreatments were performed from the Institute of Chemical Processes and Energy Recourses. The wet oxidation took place in temperature of 175°C, with air (40% O₂), by use of H₂O/(CH₃)₂CO (1:1) solvent, for 120 min. This pretreatment was implied in 3 corn stover samples with deferent pressure (8.5, 20, 40 bar) and the final composition of the biomass, in dry basis, in cellulose, hemicellulose and lignin was respectively 66.78%,16.95% and 12.09% after the 8.5 bar pretreatment, 71.41%, 14.65% and 8.64% after the 20 bar pretreatment and 74.63%, 13.32% και 7.61% after the 40 bar pretreatment. The Milox delignification pretreatment took place under 1 bar pressure, temperature of 80 °C, by the use of formic acid/2% H₂O₂ solvent, for 60 min and the final composition of corn stover was respectively 70.08%, 8.68% και 7.23%. After that, enzyme loading hydrolysis was performed to determine the best commercial enzyme mixture (Cellic CTec2) concentration (9 mg/g dry basis) in temperature of 50 °C with a stirring of 180 rpm, for 72 h with 10% (w/v) solids concentration. During the hydrolysis of these samples, the concentration of glucose that was produced was: 62.55 ± 0.74 g/L (8.5 bar), 68.93 ± 0.89 g/L (20 bar), 79.24 ± 0.22 g/L (40 bar) και 55.54 ± 1.48 g/L (Milox). Then, the simultaneous saccharification and fermentation occurred with 12 h prehydrolysis to find the pretreatment with the most efficient ethanol production. The prehydrolysis took place using the optimum enzyme concentration which was determined after the enzyme loading hydrolysis, under the same conditions. The microorganism *S. Cerevisiae* (Ethanol Red[®]) was added for the beginning of the fermentation, in concentration of 15 mg/g dry basis. The conditions of the fermentation were: temperature of 35°C, 80 rpm stirring, for 120 h. The highest production of ethanol was 26.03 g/L (61.57% yield) from the sample that was pretreated with wet oxidation in 40 bar. Therefore, this corn stover was used for high gravity fermentation with a liquefaction/saccharification step in a free fall mixer with solids concentration of 25% (w/v). After that the effect of duration (6 and 12 h) of liquefaction/saccharification was studied, in the production of bioethanol. Despite the fact that the ethanol yield of 12 h liquefaction/saccharification (72.65 ± 1.44 g/L, 68.72% yield) was higher from the 6 h (70.87 ± 0.22 g/L, 66.57% yield), the deference is not significant, so the 6 h liquefaction/saccharification are enough. The productivity (1,48 g/L/h) and the ethanol concentration (71.0 g/L) with a 67.1% yield, of this thesis, are one of the highest in the international literature.

Key words: corn stover, wet oxidation, enzyme hydrolysis, fermentation, prehydrolysis, simultaneous saccharification and fermentation (SSF), free fall mixer

Περιεχόμενα

Ευχαριστίες.....	2
Περίληψη.....	4
Abstract	6
Εισαγωγή	12
1.Θεωρητικό μέρος	14
1.1. Γενικά για την βιοαιθανόλη	14
1.1.1. Ιστορική αναδρομή της βιοαιθανόλης.....	15
1.1.2. Παραγωγή βιοαιθανόλης ανά τον κόσμο	16
1.1.3. Πλεονεκτήματα και μειονεκτήματα της βιοαιθανόλης	17
1.2. Βιομάζα.....	19
1.2.1. Βιομάζα που χρησιμοποιείται για βιοκαύσιμα 1 ^{ης} γενιάς	19
1.2.2. Βιομάζα που χρησιμοποιείται για βιοκαύσιμα 2 ^{ης} γενιάς	20
1.2.2.1. Κυτταρίνη	21
1.2.2.2. Ημικυτταρίνη	21
1.2.2.3. Λιγνίνη	22
1.2.2.4. Σύσταση λιγνινοκυτταρινούχου βιομάζας για διάφορα υλικά.....	23
1.2.3. Βιομάζα που χρησιμοποιείται για βιοκαύσιμα 3 ^{ης} γενιάς	23
1.2.4. Στελέχη αραβοσίτου.....	24
1.3. Παραγωγή βιοαιθανόλης από λιγνινοκυτταρινούχο βιομάζα.....	25
1.3.1. Προκατεργασία	26
1.3.1.1. Φυσικές προκατεργασίες	26
1.3.1.1.1. Μηχανικός θρυμματισμός.....	26
1.3.1.1.2. Εκβολή	26
1.3.1.1.3. Ακτινοβολήση	27
1.3.1.2. Χημικές Προκατεργασίες.....	27
1.3.1.2.1. Ώξινη προκατεργασία.....	27
1.3.1.2.2. Αλκαλική προκατεργασία.....	28
1.3.1.2.3. Ιοντικά υγρά	28
1.3.1.2.4. Οργανικοί διαλύτες	29
1.3.1.2.5. Οζονόλυση.....	29
1.3.1.3. Φυσικοχημικές προκατεργασίες.....	29
1.3.1.3.1. Έκρηξη ατμών	30
1.3.1.3.2. Έκρηξη αμμωνίας	30
1.3.1.3.3. Έκρηξη CO ₂	31

1.3.1.3.4.	Υδροθερμική προκατεργασία	31
1.3.1.3.5.	Υγρή οξείδωση.....	32
1.3.1.4.	Βιολογικές προκατεργασίες	32
1.3.1.5.	Συνδυασμός προκατεργασιών	33
1.3.1.6.	Σύγκριση προκατεργασιών.....	34
1.3.2.	Υδρόλυση.....	35
1.3.2.1.	Όξινη υδρόλυση	36
1.3.2.2.	Ενζυμική υδρόλυση	36
1.3.3.	Αλκοολική Ζύμωση.....	38
1.3.3.1.	Διεργασίες παραγωγής αιθανόλης	38
1.3.4.	Διάγραμμα ροής παραγωγής αιθανόλης	40
2.	Πειραματικό μέρος.....	42
2.1.	Υλικά	42
2.1.1.	Μικροοργανισμοί.....	42
2.1.2.	Πρώτες ύλες	42
2.1.3.	Ένζυμα	42
2.1.4.	Ρυθμιστικά διαλύματα	43
2.1.5.	Όργανα και συσκευές.....	43
2.2.	Μέθοδοι	44
2.2.1.	Προκατεργασία στελεχών αραβοσίτου με υγρή οξείδωση	44
2.2.2.	Αναλυτικές μέθοδοι	44
2.2.3.	Μέτρηση ενεργότητας κυτταρινάσης	48
2.2.4.	Ανάλυση σύστασης	48
2.2.5.	Ενζυμική υδρόλυση	49
2.2.6.	Αλκοολική ζύμωση	49
2.2.7.	Αλκοολική ζύμωση με χρήση αναμεικτήρα ελεύθερης πτώσης για την προϋδρόλυση	50
2.2.8.	Μέτρηση ιξώδους.....	50
3.	Αποτελέσματα.....	52
3.1.	Μέτρηση ενζυμικής ενεργότητας κυτταρινάσης	52
3.2.	Ανάλυση σύστασης των προκατεργασμένων στελεχών αραβοσίτου	55
3.2.1.	Υπολογισμός κρυσταλλικής κυτταρίνης με XRD	57
3.3.	Ενζυμική υδρόλυση	60
3.4.	Αλκοολική ζύμωση	71
3.5.	Προϋδρόλυση με αναμεικτήρα ελεύθερης πτώσης για μετέπειτα ζύμωση	76
3.6.	Μέτρηση ιξώδους σε δείγματα της προϋδρόλυσης	80

4. Συμπεράσματα	82
Βιβλιογραφία.....	88

Εισαγωγή

Για πολλά χρόνια βασική πηγή ενέργειας είναι το πετρέλαιο. Όμως η εξόρυξη του πετρελαίου δεν μπορεί να συνεχιστεί για πάρα πολλά χρόνια λόγω εξάντλησης των αποθεμάτων. Ήδη έχουν εξαντληθεί μεγάλες ποσότητες αποθεμάτων πετρελαίου. Επίσης η επεξεργασία αλλά και καύση του πετρελαίου επιβαρύνει το περιβάλλον. Έτσι είναι απαραίτητη η εύρεση καυσίμων που θα μπορέσουν να αντικαταστήσουν το πετρέλαιο. Ένα τέτοιου είδους καύσιμο είναι η βιοαιθανόλη η οποία μπορεί να αντικαταστήσει τη βενζίνη στους βενζινοκινητήρες αυτοκινήτων χωρίς να χρειάζονται κάποια τροποποίηση. Η βιοαιθανόλη μπορεί να παραχθεί από πηγές βιομάζας με αποτέλεσμα να υπάρχει άπλετη πρώτη ύλη, σε αντίθεση με το πετρέλαιο. Επίσης θεωρείται ανανεώσιμη πηγή ενέργειας, αφού στην ουσία ανακυκλώνει το CO₂ της ατμόσφαιρας μέσω της κυτταρικής αναπνοής των φυτών.

Τα τελευταία χρόνια γίνεται εκτενής έρευνα πάνω στην παραγωγή βιοαιθανόλης. Κάποια από τα βασικότερα πεδία έρευνας είναι η εύρεση κατάλληλων πρώτων υλών, η όσο το δυνατό καλύτερη προκατεργασία του, η εύρεση κατάλληλων ενζύμων για την υδρόλυση της κυτταρίνης και τις ημικυτταρίνης, η εύρεση και γενετική τροποποίηση του μικροοργανισμού που θα χρησιμοποιηθεί για ζύμωση, η καταλληλότερη διεργασία υδρόλυσης και ζύμωσης και ο βέλτιστος τρόπος διαχωρισμού της αιθανόλης από τα υπόλοιπα συστατικά.

Η παρούσα διπλωματική εργασία έχει ως στόχο την όσο το δυνατό αποδοτικότερη παραγωγή αιθανόλης από στελέχη αραβοσίτου (corn stover). Μελετάται η προκατεργασία με υγρή οξείδωση, επίσης προσδιορίζεται η βέλτιστη υδρόλυση της βιομάζας (συγκέντρωση ενζύμου, περιεκτικότητα σε στερεά), πραγματοποιείται ζύμωση για τον εντοπισμό της προκατεργασίας με την μεγαλύτερη απόδοση σε αιθανόλη και τέλος το υλικό αυτής της προκατεργασίας ζυμώνεται με προϋδρόλυση σε αναμικήρα ελεύθερης πτώσης ώστε να υπολογιστεί η τελική απόδοση σε αιθανόλη.

Η παρούσα διπλωματική εργασία χωρίζεται σε τέσσερα βασικά μέρη. Το θεωρητικό μέρος, το πειραματικό μέρος τα αποτελέσματα-σχολιασμός και τα συμπεράσματα. Στο θεωρητικό μέρος αρχικά αναφέρονται κάποια βασικά για την βιοαιθανόλη. Γίνεται μια μικρή ιστορική αναδρομή, μια σύγκριση της παραγωγής βιοαιθανόλης ανά τον κόσμο και τέλος αναφέρονται μερικά από τα βασικά πλεονεκτήματα και μειονεκτήματα της χρήσης της. Στη συνέχεια γίνεται αναφορά στην πρώτη ύλη που χρησιμοποιείται για την παραγωγή της βιοαιθανόλης (βιομάζα). Ειδικότερα στα είδη βιομάζας, πρώτης, δεύτερης και τρίτης γενιάς καθώς και στην σύσταση της λιγνινοκυτταρινούχου βιομάζας (2^{ης} γενιάς) και κυρίως των στελεχών αραβοσίτου τα οποία χρησιμοποιούνται σε αυτή την εργασία. Έπειτα αναλύεται το κομμάτι της παραγωγής της αιθανόλης. Πρώτα πραγματοποιείται προκατεργασία για την διευκόλυνση μετέπειτα της υδρόλυσης και ζύμωσης. Αναλύονται αρκετές μέθοδοι προκατεργασίες οι οποίες μπορεί να είναι είτε φυσικές, είτε χημικές, είτε φυσικοχημικές, είτε βιολογικές, είτε και συνδυασμός. Ανάλογα το είδος της βιομάζας και τα επιθυμητά αποτελέσματα επιλέγεται κατάλληλη προκατεργασία. Στη συνέχεια αναλύεται η υδρόλυση, η οποία μπορεί να είναι όξινη ή ενζυμική. Η ενζυμική υδρόλυση προτιμάται γιατί πραγματοποιείται σε ήπιες συνθήκες και δεν αποικοδομεί τα σάκχαρα. Τέλος, ακολουθεί η

αλκοολική ζύμωση και στη συνέχεια οι διεργασίες παραγωγής αιθανόλης που οι βασικότερες είναι η ταυτόχρονη σακχαροποίηση και ζύμωση και η διακριτή υδρόλυση και ζύμωση.

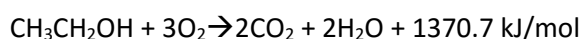
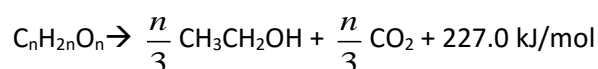
Στο πειραματικό μέρος αρχικά αναφέρονται τα υλικά, οι μικροοργανισμοί, οι πρώτες ύλες, τα ένζυμα, τα ρυθμιστικά διαλύματα και τα όργανα και οι συσκευές που χρησιμοποιήθηκαν. Στη συνέχεια περιγράφονται οι μέθοδοι που χρησιμοποιήθηκαν στα πειράματα. Αρχικά περιγράφονται οι προκατεργασίες που πραγματοποιήθηκαν (8.5, 20, 40 bar υγρή οξείδωση και Milox). Στη συνέχεια περιγράφονται οι αρχές και οι διαδικασίες των αναλυτικών μεθόδων που χρησιμοποιήθηκαν (φωτομετρία, DNS, GOD/PAP, HPLC και XRD). Μετά αναλύονται οι βασικές μέθοδοι που χρησιμοποιήθηκαν στα πειράματα. Πραγματοποιήθηκε μέτρηση ενεργότητας του εμπορικού ενζυμικού μίγματος Cellic CTec2, ανάλυση σύστασης των υλικών διαφορετικής προκατεργασίας για να βρεθεί η % σύσταση σε κυτταρίνη, ημικυτταρίνη και λιγνίνη, ενζυμική υδρόλυση ώστε να αποφασιστεί η συγκέντρωση ενζυμικού σκευάσματος που θα χρησιμοποιηθεί, αλκοολική ζύμωση για να αποφασιστεί η αποδοτικότερη προκατεργασία σε αιθανόλη και τέλος ζύμωση με προϋδρόλυση σε αναμικτήρα ελεύθερης πτώσης για τον υπολογισμό της απόδοσης σε αιθανόλη. Επίσης περιγράφεται η ιξωδομετρία που πραγματοποιήθηκε στα προϋδρολύματα.

Στη συνέχεια παρουσιάζονται και σχολιάζονται τα αποτελέσματα των πειραμάτων. Παρουσιάζονται οι υπολογισμοί και οι μετρήσεις κυρίως μέσω διαγραμμάτων σύγκρισης διαφορετικών συγκεντρώσεων ενζύμων της υδρόλυσης αλλά και διαφορετικών υλικών προκατεργασίας στη ζύμωση. Επίσης υπολογίζεται η % υδρόλυση της κυτταρίνης και η απόδοση σε αιθανόλη. Τέλος στα συμπεράσματα γίνεται σύγκριση με τη βιβλιογραφία των αποτελεσμάτων των πειραμάτων.

1.Θεωρητικό μέρος

1.1. Γενικά για την βιοαιθανόλη

Τα καύσιμα που παράγονται από υλικά τα οποία προέρχονται από ζωντανούς οργανισμούς (βιομάζα) ονομάζονται βιοκαύσιμα. Τα σημαντικότερα βιοκαύσιμα είναι η βιοαιθανόλη και το βιοντήζελ. Η βιοαιθανόλη είναι στην ουσία αιθανόλη (CH₃CH₂OH) που παράγεται με βιολογικό τρόπο. Η παραγωγή της πραγματοποιείται με υδρόλυση της βιομάζας, με αποτέλεσμα να παράγεται γλυκόζη και κάποια άλλα σάκχαρα, και στη συνέχεια ζύμωση με κάποιον μικροοργανισμό (συνήθως *Saccharomyces Cerevisiae*), για την παραγωγή της αιθανόλης. Η γενική αντίδραση της μετατροπής των σακχάρων σε αιθανόλη αλλά και η καύση της φαίνονται παρακάτω (Das, 2016).



Ανάλογα με το είδος της βιομάζα που χρησιμοποιείται, η βιοαιθανόλη αλλά και γενικότερα τα βιοκαύσιμα κατατάσσονται σε τρεις κατηγορίες: Βιοκαύσιμα πρώτης δεύτερης και τρίτης γενιάς (Κεφ. 2.1.1-3). Η βιοαιθανόλη είναι σε υγρή μορφή και χρησιμοποιείται κυρίως ως καύσιμο μεταφοράς οχημάτων. Στον παρακάτω πίνακα φαίνονται αρκετές φυσικοχημικές ιδιότητες της αιθανόλης.

Πίνακας 1. Φυσικοχημικές ιδιότητες της αιθανόλης(Walker, 2011)

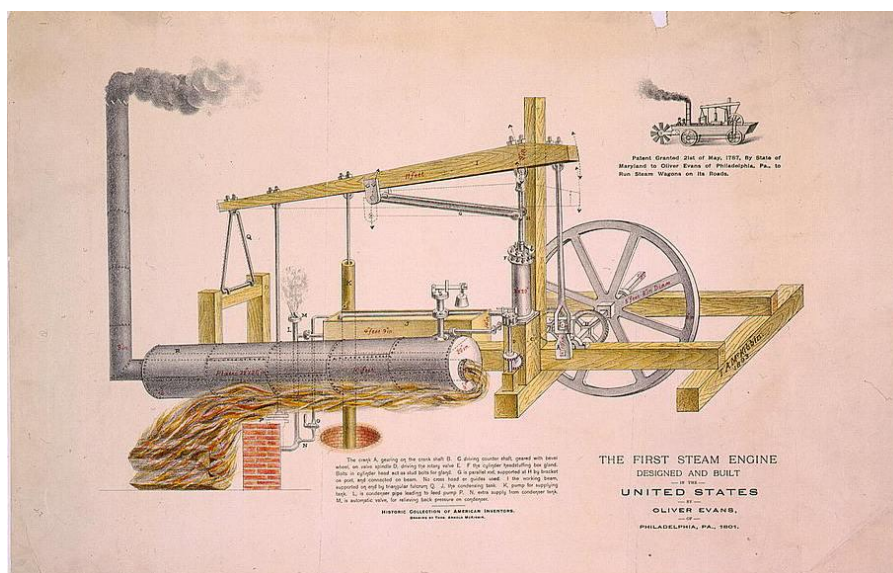
Παράμετρος	Χαρακτηριστική ιδιότητα
Μοριακή δομή	C ₂ H ₅ OH
Μοριακό βάρος	46,07 g/mol
Φάση	υγρή
Διαλυτότητα στο νερό	αναμίξιμη
Πυκνότητα	0,789 kg/L
Σημείο ζέσεως	78,5 °C
Σημείο πήξεως	-117 °C
Σημείο ανάφλεξης(χαμηλότερη θερμοκρασία ανάφλεξης)	12,8 °C
Θερμοκρασία ανάφλεξης	425 °C
Ιξώδες	1,2 mPa·s (20 °C)
Δείκτης διάθλασης	1,36 (25 °C)

1.1.1. Ιστορική αναδρομή της βιοαιθανόλης

Πολλοί μπορεί να πιστεύουν ότι η ανάπτυξη της βιοαιθανόλης ξεκίνησε μετά το εμπόργκο του Αραβικού πετρελαίου στις ΗΠΑ (και σε άλλες μεγάλες δυνάμεις της εποχής που βοηθούσαν το Ισραήλ στον πόλεμο Αραβίας-Ισραήλ) το 1973 (Office of the Historians, n.d.), ώστε να βρεθεί ένα νέο ανανεώσιμο καύσιμο. Όμως στην πραγματικότητα ξεκίνησε αρκετά χρόνια πριν και μάλιστα πριν την ανακάλυψη του πετρελαίου το 1859 (Kovarik, 1998).

Στα τέλη της δεκαετίας του 30 πραγματοποιούνταν προσπάθειες για την αντικατάσταση του φαλαινέλαιου, το οποίο χρησιμοποιούνταν για φωτισμό, επειδή ήταν πολύ ακριβό. Τελικά, για την αντικατάστασή του χρησιμοποιήθηκε ένα μίγμα αποτελούμενο από αιθανόλη και νέφτι (Tomes, Lakshmanan, & Songstad, 2011).

Εκείνη την περίοδο ο εφευρέτης Samuel Morey έφτιαξε μια μηχανή εσωτερικής καύσης, η οποία έκαιγε μίγμα από αιθανόλη και νέφτι. Χρησιμοποίησε αυτή τη μηχανή σε ένα βαγόνι και σε ένα πλοίο το οποίο ταξίδευσε με ταχύτητα 7-8 mph (Kovarik, 1998).



Εικόνα 1. Μηχανή εσωτερικής καύσης του S.Morey και το πλοίο που χρησιμοποιήθηκε

Ο Morey όμως δεν μπόρεσε να βρει κάποιον επενδυτή οπότε η πατέντα του δεν αξιοποιήθηκε. Το 1860 ο Γερμανός εφευρέτης Nicholas Otto, κατασκεύασε μια μηχανή εσωτερικής καύσης η οποία έκαιγε ένα μίγμα το οποίο περιείχε αιθανόλη. Σε αντίθεση με τον Morey, ο Otto κατάφερε να βρει επενδυτή, ο οποίος είχε ένα εργοστάσιο εξευγενισμού ζάχαρης και είχε σχέσεις με την αγορά αιθανόλης.

Στις αρχές του 20^{ου} αιώνα ο Henry Ford πίστευε ότι θα είναι δυνατή η κατασκευή αυτοκινήτων που θα κινούνται με αιθανόλη (Kovarik, 1998). Επίσης ο Alexander Graham Bell είπε ότι στο μέλλον θα είναι δυνατή η παραγωγή βιοαιθανόλης από σχεδόν όλες τις φυτικές ύλες που μπορούν να ζυμωθούν (Tomes et al., 2011). Κατά τις δεκαετίες του 20 και 30 ο Ford λόγω της ανάγκης για παραγωγή αιθανόλης (Παγκόσμιοι πόλεμοι) ξεκίνησε ένα «κίνημα» που ονομάστηκε Chemurgy (γεωργική χημεία) το οποίο προήγαγε την παραγωγή αιθανόλης από γεωργικά προϊόντα. Η αιθανόλη χρησιμοποιούνταν κυρίως για την παραγωγή ελαστικών

και γενικότερα πλαστικών αντικειμένων. Έτσι στον 1^ο Παγκόσμιο πόλεμο παράχθηκαν 60 εκατομμύρια γαλόνια αιθανόλης και στον 2^ο 600 εκατομμύρια γαλόνια.

Το Αραβικό εμπάργκο το 1973 στις ΗΠΑ ώθησε στην αύξηση της παραγωγής της αιθανόλης σ' όλο τον κόσμο. Έτσι το 1978 φτιάχτηκε το πρώτο εργοστάσιο παραγωγής αιθανόλης από αγροτικά προϊόντα, στο πανεπιστήμιο της νότιας Ντακότα από τον καθηγητή Paul Middaugh. Στη συνέχεια δύο μαθητές του ίδρυσαν μια εταιρία που σχεδίαζε εργοστάσια παραγωγής αιθανόλης (Tomes et al., 2011).

Παράλληλα η Βραζιλία από τη δεκαετία του 70 ξεκίνησε την παραγωγή βιοαιθανόλης εξαιτίας της πετρελαϊκής κρίσης και εξαιτίας της πολύ μεγάλης παραγωγής ζαχαροκάλαμων, κατάφερε να είναι δεύτερη σήμερα, μετά τις ΗΠΑ, στην παραγωγή βιοαιθανόλης (Cremonez et al., 2015).

Τέλος το 2001 ιδρύθηκε η εταιρία VeraSun η οποία αποτέλεσε τη μεγαλύτερη εταιρία παραγωγής βιοαιθανόλης στις ΗΠΑ με δυνατότητα παραγωγής 6,21 δις L βιοαιθανόλης το χρόνο, η οποία όμως χρεοκόπησε το 2006 (Tomes et al., 2011).

1.1.2. Παραγωγή βιοαιθανόλης ανά τον κόσμο

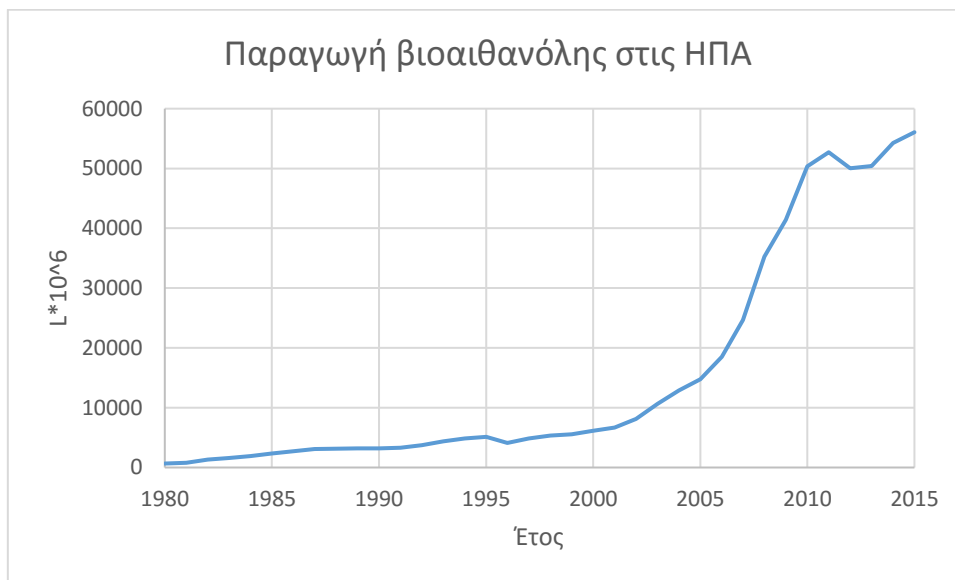
Όπως αναφέρθηκε και προηγουμένως, η παραγωγή της βιοαιθανόλης ως καύσιμο, σε εργοστασιακή κλίμακα έχει ξεκινήσει από τον 20^ο αιώνα. Οι χώρες που παράγουν μεγαλύτερη ποσότητα βιοαιθανόλης είναι οι ΗΠΑ, η Βραζιλία και η Κίνα. Στον παρακάτω πίνακα φαίνονται οι χώρες με την μεγαλύτερη παραγωγή βιοαιθανόλης.

Στην Ευρώπη βιοαιθανόλη παράγεται κυρίως από την Γερμανία και την Γαλλία. Στην Ασία εκτός από την Κίνα, η Ινδία, η Ινδονησία αλλά και η Ταϊλάνδη παράγουν υπολογίσιμες ποσότητες βιοκαυσίμων. Στην Νότια Αμερική ο βασικός παραγωγός βιοαιθανόλης είναι η Βραζιλία η οποία παράγει πάνω από το 95% της βιοαιθανόλης που παράγεται στην ήπειρο. Τέλος στην Αφρική η παραγωγή βιοαιθανόλης αλλά και γενικότερα βιοκαυσίμων βρίσκεται ακόμα σε αρχικά στάδια (Koizumi, 2015; Liao, Heijungs, & Hurrpes, 2012).

Πίνακας 2 Παραγωγή βιοαιθανόλης τις χρονολογίες 2013-2015 σε 10⁶ L/έτος (Renewable Fuels Association, 2016)

Χώρα	2015	2014	2013
ΗΠΑ	56047	54131	50346
Βραζιλία	26850	23437	23723
Ευρώπη	5250	5470	5190
Κίνα	3078	2404	2635
Καναδάς	1650	1931	1980
Ταϊλάνδη	1264	1173	
Αργεντινή	799	606	
Ινδία	799	587	2063
Υπόλοιπος κόσμος	1480	3274	2752

Όπως φαίνεται και στον παραπάνω πίνακα η Αργεντινή και η Ταϊλάνδη ξεκίνησαν την παραγωγή της βιοαιθανόλης σε αρκετά μεγάλη κλίμακα τα τελευταία 2 χρόνια. Οι ΗΠΑ παράγουν σταθερά την μεγαλύτερη ποσότητα βιοαιθανόλης με διαφορά. Στο παρακάτω διάγραμμα φαίνεται και η εξέλιξη της παραγωγής στις ΗΠΑ από το 1980 έως το 2015.



Διάγραμμα 1 Παραγωγή βιοαιθανόλης στις ΗΠΑ από το 1980-2015 (Renewable Fuels Association, 2016)

Από το διάγραμμα φαίνεται μια συνεχής αύξηση της παραγωγής βιοαιθανόλης με εκθετική αύξηση τις χρονολογίες 2002-2010. Σε ελάχιστες περιπτώσεις υπήρξε και μείωση (2012).

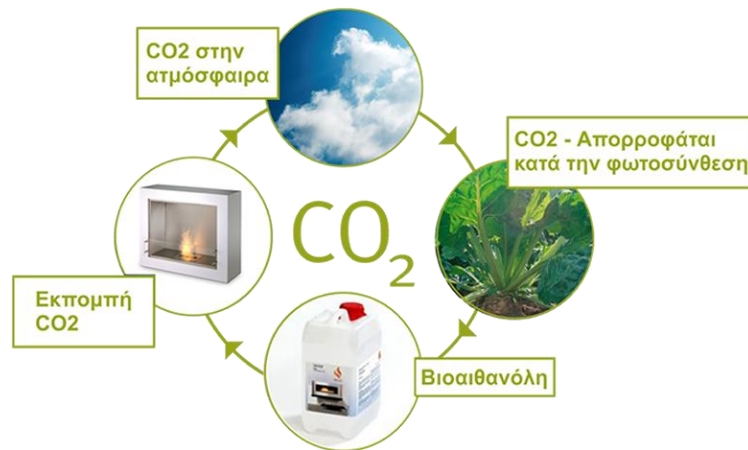
1.1.3. Πλεονεκτήματα και μειονεκτήματα της βιοαιθανόλης

Για να μπορέσει να συγκριθεί η βιοαιθανόλη με τα συμβατικά καύσιμα και κυρίως τη βενζίνη, πρέπει να εξεταστούν τα πλεονεκτήματα, αλλά και μειονεκτήματα της προς αυτά.

Τα βασικότερα πλεονεκτήματα της βιοαιθανόλης είναι:

- Ελάττωση της περιβαλλοντικής ρύπανσης
- Μείωση της ενεργειακής εξάρτησης από τα ορυκτά καύσιμα
- Καλύτερες ιδιότητες σε σχέση με τη βενζίνη (αριθμός οκτανίου, περισσότερο οξυγόνο, κ.α)

Κατά την παραγωγή των συμβατικών καυσίμων απελευθερώνονται στο περιβάλλον πολλά αέρια του θερμοκηπίου και κυρίως CO₂. Συγκεκριμένα το CO₂ που απελευθερώνεται λόγω της καύσης των ορυκτών καυσίμων είναι το 73% της συνολικής απελευθέρωσης CO₂ (Balat, Balat, & Öz, 2008). Κατά την παραγωγή της βιοαιθανόλης η εκπομπή αερίων του θερμοκηπίου είναι σημαντικά χαμηλότερη από τα συμβατικά καύσιμα. Επίσης κατά την καύση της αιθανόλης το CO₂ ουσιαστικά ανακυκλώνεται αφού η αιθανόλη παράγεται από τη βιομάζα, η οποία μέσω της φωτοσύνθεσης έχει προσλάβει το CO₂ από την ατμόσφαιρα.



Εικόνα 2 Ανακύκλωση CO₂ μέσω φωτοσύνθεσης και καύσης αιθανόλης

Με τη χρήση της βιοαιθανόλης ως καύσιμο, μειώνεται και η εξάρτηση στα συμβατικά καύσιμα. Η τιμή των συμβατικών καυσίμων αυξάνεται και μειώνεται συνεχώς τα τελευταία χρόνια ανάλογα με της ιστορικές εξελίξεις. Μεγάλη αύξηση υπήρξε στον πόλεμο του Ιράκ αλλά και στο Αραβικό εμπάργκο. Πλέον η τιμή του πετρελαίου είναι υψηλή λόγω της εξάντλησης των αποθεμάτων του. Η βιοαιθανόλη παράγεται από βιομάζα, η οποία είναι άφθονη οπότε η τιμή τις εξαρτάται από το είδος της βιομάζας και όχι από τα αποθέματα (Χριστακόπουλος & Τοπακας, 2013).

Τέλος η βιοαιθανόλη έχει μεγαλύτερο αριθμό οκτανίου (~107) από τη βενζίνη (από 95-100). Ο αριθμός οκτανίου προσδιορίζει την ποιότητα της βενζίνης. Όσο μεγαλύτερος είναι τόσο καλύτερη η βενζίνη με αποτέλεσμα να εμποδίζεται το «χτύπημα των κυλίνδρων». Εξαιτίας του γεγονότος ότι η βιοαιθανόλη έχει μεγαλύτερο λόγο συμπίεσης και μικρότερο χρόνο καύσης από τη βενζίνη μπορεί να αναμιχθεί άμεσα με αυτή, με αποτέλεσμα να είναι δυνατό να χρησιμοποιηθεί και ως πρόσθετο αύξησης του αριθμού οκτανίου (Deenanath, Iyuke, & Rumbold, 2012). Επίσης περιέχει οξυγόνο, το οποίο βοηθάει ώστε να γίνεται καλύτερη καύση με αποτέλεσμα να εκπέμπονται λιγότερα τοξικά καυσαέρια όπως διάφοροι υδρογονάνθρακες και μονοξείδιο του άνθρακα. Τέλος, ο κινητήρας του αυτοκινήτου δε χρειάζεται καμία τροποποίηση για να κάψει βιοαιθανόλη (Balat et al., 2008).

Τα βασικά μειονεκτήματα της βιοαιθανόλης είναι:

- Για την ανάπτυξη καλλιέργειας ώστε να παραχθεί η πρώτη ύλη, χρησιμοποιούνται συμβατικά καύσιμα
- Αύξηση πτητικών οργανικών ρυπαντών
- Χαμηλότερο περιεχόμενο σε ενέργεια
- Πρώτης γενιάς βιοκαύσιμα → Ανταγωνίζεται τα τρόφιμα

Η βιοαιθανόλη έχει χαμηλότερο περιεχόμενο ενέργειας από την βενζίνη, συγκεκριμένα αποδίδει το 66% της ενέργειας που αποδίδει η βενζίνη (Balat et al., 2008). Επίσης με την προσθήκη βιοαιθανόλης στη βενζίνη αυξάνονται οι πτητικοί οργανικοί ρυπαντές και σχηματίζονται μεγαλύτερες αλδεΐδες. Το πρόβλημα αυτό μπορεί να αντιμετωπιστεί με τους τριοδικούς καταλύτες των αυτοκινήτων που δεν επιτρέπουν στους περισσότερους απ' αυτούς τους ρυπαντές να απελευθερωθούν στο περιβάλλον. Τέλος, η παραγωγή βιοαιθανόλης πρώτης γενιάς χρησιμοποιεί πρώτες ύλες οι οποίες προορίζονται για την

βιομηχανία τροφίμων. Αυτό το μειονέκτημα μπορεί να αντιμετωπιστεί με την κατεύθυνση της παραγωγής της αιθανόλης προς την λιγνινοκυτταρινούχο βιομάζα (Deenanath et al., 2012).

1.2. Βιομάζα

Ως βιομάζα ορίζονται τα υλικά τα οποία παράγονται από ζωντανούς οργανισμούς. Για την παραγωγή βιοαιθανόλης αλλά και γενικότερα βιοκαυσίμων χρησιμοποιείται η φυτική βιομάζα. Η φυτική βιομάζα μπορεί και αναπτύσσεται χρησιμοποιώντας την ηλιακή ακτινοβολία μέσω της φωτοσύνθεσης. Όμως υπάρχουν πολλά είδη φυτικής βιομάζας τα οποία χωρίζονται σε τρεις κατηγορίες σε σχέση με την παραγωγή βιοκαυσίμων. Έτσι έχουμε τα βιοκαύσιμα πρώτης, δεύτερης και τρίτης γενιάς.

1.2.1. Βιομάζα που χρησιμοποιείται για βιοκαύσιμα 1^{ης} γενιάς

Η βιομάζα που χρησιμοποιείται για βιοκαύσιμα 1^{ης} γενιάς είναι κυρίως αμυλούχα και σακχαρούχα φυτά. Τα βασικότερα σακχαρούχα φυτά που χρησιμοποιούνται είναι το σακχαροκάλαμο το σακχαρότευτλο και ο γλυκός σόργος. Τα βασικότερα αμυλούχα φυτά είναι ο αραβόσιτος, το σιτάρι και το κριθάρι. Στον παρακάτω πίνακα φαίνεται η δυνατότητα παραγωγή αιθανόλης από κάθε είδος βιομάζας αλλά και η ποσότητα συμβατικών καυσίμων για την παραγωγή τους. Ως συντελεστής ορυκτής ενέργειας ορίζεται οι μονάδες αιθανόλης που παράγονται από την πρώτη ύλη, για μια μονάδα ορυκτών καυσίμων που χρησιμοποιείται για την παραγωγή της αιθανόλης (Χριστακόπουλος & Τοπακας, 2013).

Πίνακας 3 Παραγωγή αιθανόλης ανά στρέμμα καλλιέργειας βιομάζας και συντελεστής ορυκτής ενέργειας (Χριστακόπουλος & Τοπακας, 2013)

Βιομάζα	L αιθανόλης/στρέμμα	Συντελεστής ορυκτής ενέργειας
Σακχαροκάλαμο	600-900	8
Σακχαρότευτλο	600	2
Γλυκός σόργος	600	2,2
Αραβόσιτος	300	1,3
Σιτάρι	45-240	2

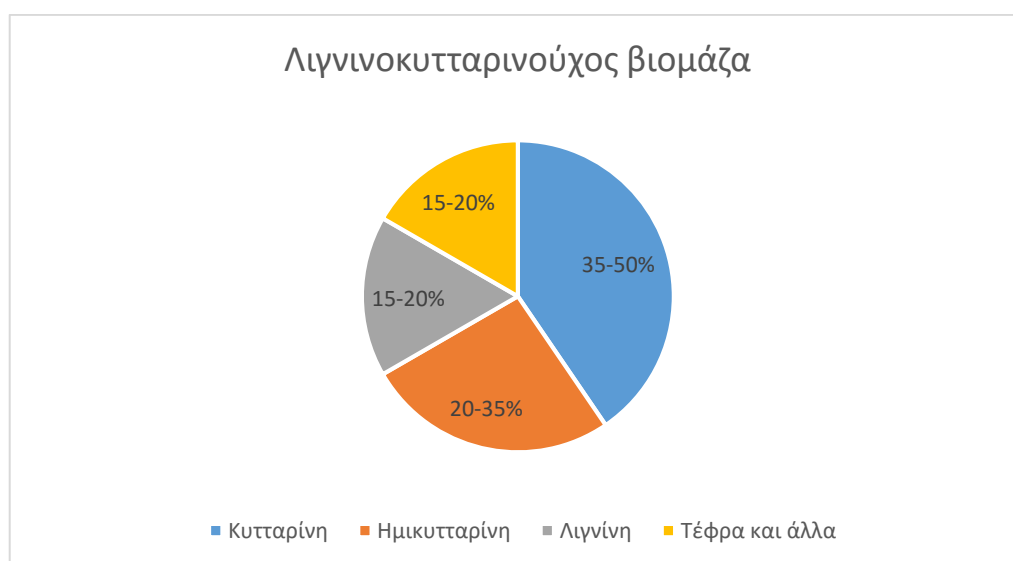
1.2.2. Βιομάζα που χρησιμοποιείται για βιοκαύσιμα 2^{ης} γενιάς.

Η βιομάζα που χρησιμοποιείται στα καύσιμα 2^{ης} γενιάς ονομάζεται λιγνινοκυτταρινούχος βιομάζα και μπορεί να προέρχεται από αγροτικά ή δασικά κατάλοιπα (όπως κοτσάνια, φύλλα και καυσόξυλα) ή ενεργειακά φυτά (όπως ο ευκάλυπτος). Σε σχέση με τη βιομάζα 1^{ης} γενιάς, τα λιγνινοκυτταρινούχα πλεονεκτούν γιατί δεν ανταγωνίζονται άμεσα την βιομηχανία τροφίμων. Για αυτό το λόγο η μετάβαση σ' αυτά είναι αναγκαία.



Εικόνα 3 Στοίβες άχυρα

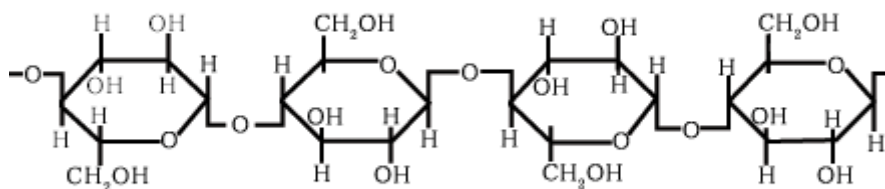
Τα τρία βασικά συστατικά της λιγνινοκυτταρινούχου βιομάζας είναι η κυτταρίνη, η ημικυτταρίνη και η λιγνίνη. Εκτός από αυτά τα τρία βασικά συστατικά περιέχει ακόμα νερό και κάποια ανόργανα συστατικά. Στο παρακάτω διάγραμμα φαίνεται η % περιεκτικότητα της λιγνινοκυτταρινούχου βιομάζας στα βασικά της χαρακτηριστικά (Sudiyani, Corneliasari, & Adilina, 2014).



Διάγραμμα 2 Γενική σύσταση της λιγνινοκυτταρινούχου βιομάζας (Haghighi Mood et al., 2013)

1.2.2.1. Κυτταρίνη

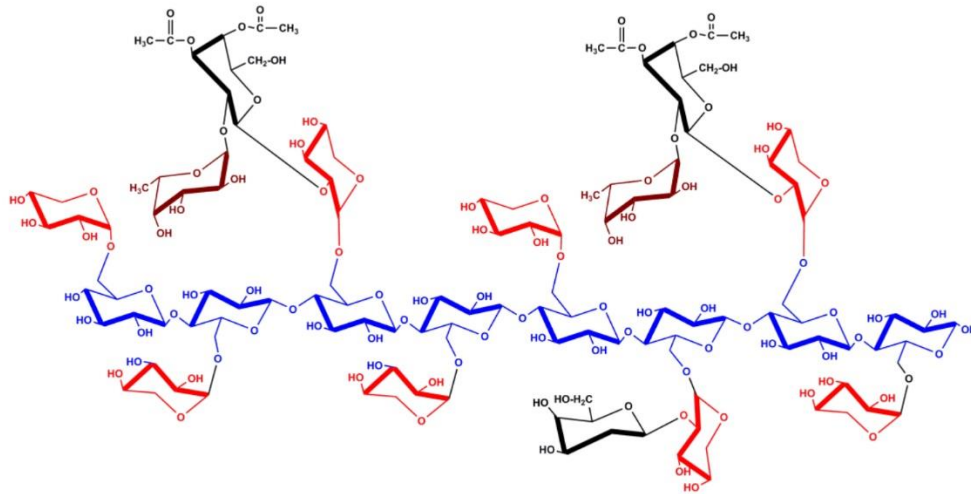
Όπως φαίνεται και στο παραπάνω διάγραμμα, η κυτταρίνη ($C_6H_{10}O_5$)_x είναι το συστατικό που καταλαμβάνει το μεγαλύτερο ποσοστό των συστατικών της λιγνινοκυτταρινούχου βιομάζας. Βρίσκεται στο κυτταρικό τοίχωμα και προσδίδει μηχανική αντοχή και χημική σταθερότητα στα φυτά (Sudiyani et al., 2014). Αποτελεί ένα γραμμικό πολυμερές από D-γλυκόζες συνδεδεμένες με β-1,4 γλυκοζιτικό δεσμό. Συνήθως η κυτταρίνη αποτελείται από 7000 έως 15000 μονάδες γλυκόζης. Η κυτταρίνη σχηματίζει και κρυσταλλική αλλά και άμορφη δομή. Η κρυσταλλική δομή σχηματίζεται μέσω δεσμών υδρογόνου μεταξύ των αλυσίδων κυτταρίνης δημιουργώντας έτσι μικροϊνίδια αποτελούμενα από περίπου 36 αλυσίδες κυτταρίνης. Αυτά τα μικροϊνίδια έχουν διάμετρο από 2 έως 68 nm και μήκος από 100 έως 40000 nm και η βασική τους λειτουργία είναι να προσδίδουν ακαμψία στο κυτταρικό τοίχωμα (Sharma, 2013; Χριστακόπουλος & Τοπακας, 2013).



Εικόνα 4 Μοριακή δομή της κυτταρίνης

1.2.2.2. Ημικυτταρίνη

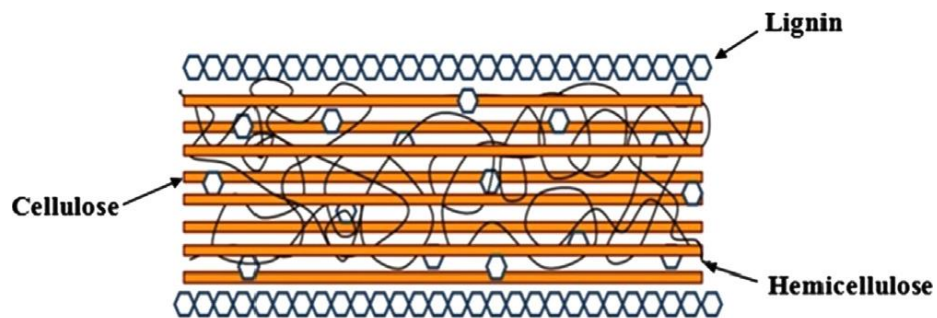
Η ημικυτταρίνη ($C_5H_8O_4$)_m αποτελεί ένα μίγμα από συμπολυμερή που αποτελούνται από πεντόζες, εξόζες και ουρονικά οξέα. Βρίσκεται κι αυτή στο κυτταρικό τοίχωμα σε άμορφη δομή μεταξύ των μικροϊνιδίων της κυτταρίνης. Οι πιο συνηθισμένη ημικυτταρίνη είναι η ξυλάνη η οποία αποτελεί το τρίτο, σε ποσότητα πολυμερές στη γη μετά την κυτταρίνη και την χιτίνη (Haghighi Mood et al., 2013; Sharma, 2013). Η ξυλάνη αποτελείται από μια κεντρική αλυσίδα μορίων D-ξυλοπυρανόζης οι οποίες είναι ενωμένες με β-1,4 γλυκοζιτικούς δεσμούς. Η αλυσίδα μπορεί να είναι γραμμική ή να έχει πολλές διακλαδώσεις ανάλογα την προέλευση της ξυλάνης (Χριστακόπουλος & Τοπακας, 2013).



Εικόνα 5 Μοριακή δομή ξυλογλυκάνης

1.2.2.3. Λιγνίνη

Η λιγνίνη $[C_9H_{10}O_3(OCH_3)_{0.9-1.7}]_n$ είναι ένα πολύπλοκο αρωματικό πολυμερές με βασική μονάδα το φαινυλοπροπάνιο. Βρίσκεται σε αρκετά είδη βιομάζας, αλλά όχι σε όλα (π.χ. φύκη) (Haghighi Mood et al., 2013). Η λιγνίνη είναι πολύ χρήσιμη για τα φυτά γιατί διατηρεί σταθερό το δίκτυο κυτταρίνης-ημικυτταρίνης (Sharma, 2013). Στην παρακάτω εικόνα φαίνεται η δομή των τριών βασικών συστατικών της λιγνινοκυτταρινούχου βιομάζας.



Εικόνα 6 Δομή των τριών βασικών συστατικών της λιγνινοκυτταρινούχου βιομάζας (Haghighi Mood et al., 2013)

1.2.2.4. Σύσταση λιγνινοκυτταρινούχου βιομάζας για διάφορα υλικά

Στον παρακάτω πίνακα υπάρχουν οι % περιεκτικότητες σε κυτταρίνη, ημικυτταρίνη και λιγνίνη για διάφορα υλικά.

Πίνακας 4. % περιεκτικότητες σε κυτταρίνη, ημικυτταρίνη και λιγνίνη για διάφορα υλικά ως προς ξηρό βάρος (Walker, 2011)

Υλικό	Κυτταρίνη	Ημικυτταρίνη	Λιγνίνη
Corn stover	38-40	22-28	18-23
Corn cobs	45	35	15
Corn fibre	14	17	8
Wheat straw	30-38	21-50	15-23
Nut shells	25-30	25-30	30-40
Leaves	15-30	80-85	0
Paper pulp	60-70	10-20	5-10
Eucalyptus	50	13	28

1.2.3. Βιομάζα που χρησιμοποιείται για βιοκαύσιμα 3^{ης} γενιάς.

Για την παραγωγή βιοαιθανόλης τρίτης γενιάς η βιομάζα που χρησιμοποιείται είναι άλγη. Τα άλγη είναι φωτοσυνθετικοί ευκαρυωτικοί οργανισμοί που βρίσκονται στη θάλασσα. Χωρίζονται σε 2 κατηγορίες, τα μικροάλγη και τα μακροάλγη (φύκια). Τα μικροάλγη είναι μονοκύτταροι μικροοργανισμοί οι οποίοι μπορούν να χρησιμοποιηθούν για την παραγωγή βιοαιθανόλης και γενικότερα βιοκαυσίμων (Das, 2016).

Η παραγωγή βιοαιθανόλης από μικροάλγη βρίσκεται ακόμα σε εργαστηριακό επίπεδο, αλλά εμφανίζει πολλά πλεονεκτήματα, γι' αυτό και μελετάται. Μερικά απ' αυτά τα πλεονεκτήματα είναι: (Das, 2016)

- Δεν ανταγωνίζονται την βιομηχανία τροφίμων
- Είναι πολύ πλούσια σε υδρογονάνθρακες
- Δεν έχουν καθόλου λιγνίνη, οπότε η προκατεργασία είναι ευκολότερη και φθηνότερη, αλλά και διευκολύνονται οι διεργασίες της υδρόλυσης και ζύμωσης
- Ο ρυθμός ανάπτυξής τους είναι πολύ μεγάλος
- Αξιοποίηση του CO₂ της ατμόσφαιρας το οποίο τα άλγη το μετατρέπουν σε βιομάζα.

Τα μικροάλγη έχουν πολύ μεγάλη απόδοση στην παραγωγή βιοαιθανόλης. Στον παρακάτω πίνακα φαίνονται οι αποδόσεις σε αιθανόλη από διάφορες πηγές βιομάζας.

Πηγή βιομάζας	Απόδοση σε αιθανόλη (L/στρέμμα)
Corn stover	105-140
Wheat	259
Cassava	331
Sweet sorghum	305-407
Corn	346-402
Sugar beet	501-668
Sugar cane	619-750
Switch grass	1076
Microalgae	4676-14029

1.2.4. Στελέχη αραβοσίτου

Ως στελέχη αραβοσίτου θεωρούνται τα κατάλοιπα του θερισμού κτημάτων αραβοσίτου, όπως φύλλα και κοτσάνια. Στην παρακάτω εικόνα φαίνονται κατάλοιπα αραβοσίτου.

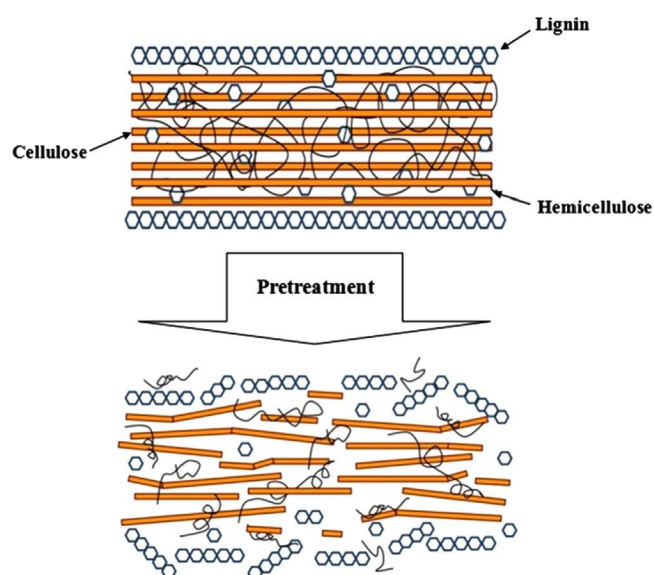


Εικόνα 7 Corn stover

Όπως φαίνεται και στον πίνακα 4 τα στελέχη αραβοσίτου (corn stover) αποτελούνται από 38-40% κυτταρίνη, 22-28% ημικυτταρίνη και 18-23% λιγνίνη. Χρησιμοποιείται ως πηγή λιγνινοκυτταρινούχου βιομάζας για την παραγωγή αιθανόλης με απόδοση 105-140 L/στρέμμα (Πίνακας 5). Τα στελέχη αραβοσίτου είναι τα πιο άφθονα κατάλοιπα στις ΗΠΑ καθιστώντας τα την βασική επιλογή λιγνινοκυτταρινούχου βιομάζας για παραγωγή βιοαιθανόλης. Συγκεκριμένα κάθε χρόνο υπάρχουν 252 εκ τόνοι στελεχών αραβοσίτου (στις ΗΠΑ) από τους οποίους 100 εκ τόνοι είναι διαθέσιμοι για την παραγωγή βιοκαυσίμων (Chundawat, Venkatesh, & Dale, 2006).

1.3. Παραγωγή βιοαιθανόλης από λιγνινοκυτταρινούχο βιομάζα

Για να παραχθεί βιοαιθανόλη από λιγνινοκυτταρινούχο βιομάζα πρέπει η κυτταρίνη να μετατραπεί σε ζυμώσιμα σάκχαρα (υδρόλυση ή σακχαροποίηση), δηλαδή γλυκόζη. Στη συνέχεια με τη χρήση κάποιου μικροοργανισμού που μεταβολίζει τη γλυκόζη (*Saccharomyces cerevisiae*), είναι δυνατή η παραγωγή της αιθανόλης. Όμως άμα υδρολυθεί ενζυμικά κάποια πηγή λιγνινοκυτταρινούχου βιομάζας το ένζυμο για πολλούς λόγους δε θα είναι αποδοτικό. Οι βασικοί λόγοι είναι η κρυσταλλική δομή της κυτταρίνης με αποτέλεσμα να μην είναι διαθέσιμη μεγάλη επιφάνειά της για να δράσει το ένζυμο, η ημικυτταρίνη που βρίσκεται μπλεγμένη στην κυτταρίνη και η λιγνίνη η οποία αποτελεί παρεμποδιστικό παράγοντα για την υδρόλυση γιατί όσο περισσότερο λιγνίνη υπάρχει στη βιομάζα μειώνεται η πιθανότητα το ένζυμο να έρθει σε επαφή με την κυτταρίνη (μειονεκτήματα αποτελούν και η ύπαρξη μεγάλης ποσότητας ημικυτταρίνης και επίσης το ένζυμο συνδέεται με την λιγνίνη χωρίς κάποιο αποτέλεσμα οπότε παρεμποδίζεται η δράση του). Τέλος η βιομάζα μπορεί να περιέχει κάποιες ουσίες οι οποίες να είναι παρεμποδιστικές για τη δράση της κυτταρινάσης, όπως η κελλοβιόζη (S. Sun, Sun, Cao, & Sun, 2016). Γι' αυτούς τους λόγους είναι απαραίτητη η προκατεργασία της βιομάζας, ώστε να μορφοποιηθεί η δομή της. Οι βασικοί στόχοι της προκατεργασίας είναι η αύξηση του ποσοστού της κυτταρίνης σε σχέση με αυτό της ημικυτταρίνης και της λιγνίνης, οπότε και η όσο το δυνατό μεγαλύτερη απομάκρυνση λιγνίνης κυρίως, αλλά και ημικυτταρίνης και η διάσπαση της κρυσταλλικής δομής της κυτταρίνης. Στην παρακάτω εικόνα φαίνεται το αποτέλεσμα της προκατεργασίας στη δομή ενός λιγνινοκυτταρινούχου υλικού (Alvira, Tomas-Pejo, Ballesteros, & Negro, 2010; Haghghi Mood et al., 2013).



Εικόνα 8 Αλλαγή της δομής λιγνινοκυτταρινούχου υλικού μετά από την προκατεργασία (Haghghi Mood et al., 2013)

1.3.1. Προκατεργασία

Όπως αναφέρθηκε και προηγουμένως, για να υπάρξει ικανοποιητική απόδοση στη μετατροπή της λιγνινοκυτταρινούχου βιομάζας σε αιθανόλη, είναι απαραίτητη κάποια μορφή προκατεργασίας. Τα είδη της προκατεργασίας χωρίζονται σε φυσική, χημική, φυσικοχημική και βιολογική προκατεργασία. Επιπλέον είναι δυνατός ο συνδυασμός 2 ή περισσότερων προκατεργασιών. Η επιλογή της κατάλληλης προκατεργασίας εξαρτάται από τη σύσταση και τις ιδιότητες της βιομάζας (Sudiyani et al., 2014).

1.3.1.1. Φυσικές προκατεργασίες

Με τις φυσικές προκατεργασίες επιτυγχάνεται η μείωση του μεγέθους των σωματιδίων και η διάσπαση της δομής της βιομάζας, με αποτέλεσμα την αύξηση της συνολικής επιφάνειάς της. Οι φυσικές προκατεργασίες είναι ο μηχανικός θρυμματισμός, η εκβολή, η ακτινοβολή και η ψύξη. Συνήθως χρησιμοποιούνται σε συνδυασμό με άλλες προκατεργασίες (Haghighi Mood et al., 2013; S. Sun et al., 2016).

1.3.1.1.1. Μηχανικός θρυμματισμός

Κατά τον μηχανικό θρυμματισμό επιτυγχάνεται η μείωση της κρυσταλλικότητας της λιγνινοκυτταρινούχου βιομάζας καθώς και η μείωση του μεγέθους των σωματιδίων της. Αρχικά κόβονται τα μεγάλα κομμάτια της βιομάζας μετά λειαινούνται και τέλος αλέθονται. Η άλεση αποτελεί το πρώτο βήμα σε αρκετές προκατεργασίες, όμως είναι πολύ ακριβή μέθοδος (Haghighi Mood et al., 2013). Το μέγεθος των σωματιδίων μετά τον μηχανικό θρυμματισμό μπορεί να είναι από 0,2 mm έως 30 mm ανάλογα τον χρόνο προκατεργασίας (Alvira et al., 2010; S. Sun et al., 2016).

1.3.1.1.2. Εκβολή

Η εκβολή είναι μια νέα και πολλά υποσχόμενη θερμοφυσική προκατεργασία κατά την οποία η βιομάζα ανακατεύεται θερμαίνεται και κόβεται με αποτέλεσμα να πραγματοποιούνται φυσικές αλλά και χημικές αλλαγές σε αυτή. Με την εκβολή οι ίνες κυτταρίνης κόβονται σε μικρά κομμάτια με αποτέλεσμα να αυξάνεται η ενζυμική ενεργότητα της κυτταρινάσης (S. Sun et al., 2016). Τα βασικότερα πλεονεκτήματα της μεθόδου είναι ότι δε σχηματίζονται φουρφουράλες, που παρεμποδίζουν τη ζύμωση, δεν χάνεται κρίσιμη ποσότητα κυτταρίνης και δεν είναι δαπανηρή διεργασία (Haghighi Mood et al., 2013).

1.3.1.1.3. Ακτινοβόληση

Η ακτινοβόληση αποτελεί μια εναλλακτική προκατεργασία σε σχέση με την συμβατική θέρμανση. Όμως η ακτινοβόληση από μόνη της δεν μπορεί να αλλάξει τη δομή της λιγνινοκυτταρινούχου βιομάζας ικανοποιητικά, γι' αυτό χρησιμοποιείται σε συνδυασμό με κάποια άλλη προκατεργασία. Πιο συγκεκριμένα με εφαρμογή μικροκυμάτων στη βιομάζα επιτυγχάνεται η μερική απομάκρυνση της ημικυτταρίνης και της λιγνίνης, κυρίως μέσω μοριακών συγκρούσεων εξαιτίας της διηλεκτρικής πόλωσης. Τα βασικά πλεονεκτήματα αυτής της προκατεργασίας είναι το σύντομο χρονικό διάστημα που διαρκεί, η μεγάλη εκλεκτικότητα και τέλος τα μικροκύματα άμα εφαρμοστούν σε συνδυασμό με κάποια χημική προκατεργασία είναι πιο αποτελεσματικά και οικονομικά σε σχέση με την συμβατική θέρμανση. Όμως το κόστος αυτής της μεθόδου είναι πολύ υψηλό για χρήση σε βιομηχανική κλίμακα οπότε συνήθως δεν προτιμάται (Haghighi Mood et al., 2013; S. Sun et al., 2016).

1.3.1.2. Χημικές Προκατεργασίες

Η χημικές προκατεργασίες αναπτύχθηκαν αρχικά για την επεξεργασία χαρτιού ώστε να απομακρυνθεί η λιγνίνη και να παραχθούν διάφορα προϊόντα από χαρτί. Γι' αυτό το λόγο οι χημικές προκατεργασίες έχουν μελετηθεί περισσότερο από τις υπόλοιπες. Βασικός τους στόχος είναι να βελτιώσουν την βιοαποδομησιμότητα της κυτταρίνης απομακρύνοντας την λιγνίνη. Οι βασικότερες χημικές προκατεργασίες είναι: η όξινη προκατεργασία, η αλκαλική προκατεργασία, η προκατεργασία με ιοντικά υγρά, η προκατεργασία με οργανικούς διαλύτες και η οζονόλυση (Sudiyani et al., 2014).

1.3.1.2.1. Όξινη προκατεργασία

Η όξινη προκατεργασία με χρήση θειικού οξέος είναι η πιο συχνά εφαρμοζόμενη χημική προκατεργασία. Ο βασικός της στόχος είναι η διαλυτοποίηση της ημικυτταρίνης και η όσο το δυνατό μεγαλύτερη υδρόλυσή της σε μονοσακχαρίτες, με αποτέλεσμα το ένζυμο να εντοπίζει ευκολότερα την κυτταρίνη (Alvira et al., 2010; Haghighi Mood et al., 2013). Η υδρόλυση της ημικυτταρίνης αλλά και της κυτταρίνης επιτυγχάνεται επειδή οι γλυκοζιτικοί δεσμοί σε αυτούς τους δύο πολυσακχαρίτες είναι ευαίσθητοι στα οξέα (S. Sun et al., 2016). Έτσι όσο πιο πυκνό οξύ χρησιμοποιηθεί τόσο καλύτερη υδρόλυση της ημικυτταρίνης θα πραγματοποιηθεί. Όμως η χρήση πυκνών οξέων μειονεκτεί έναντι των αραιών οξέων παρόλο που η προκατεργασία με αραιά οξέα είναι ακριβότερη αφού απαιτείται μεγαλύτερη θερμοκρασία. Τα μειονεκτήματα των πυκνών οξέων είναι ότι παράγουν αρκετούς παρεμποδιστές της ζύμωσης (π.χ. φουρφουράλες), φθείρουν αρκετά τον εξοπλισμό και αποδομούν τους μονοσακχαρίτες. Τα μειονεκτήματα αυτά εμφανίζονται και κατά την χρήση αραιών οξέων όμως σε πολύ χαμηλότερο βαθμό γι' αυτό και προτιμώνται σε βιομηχανικές εφαρμογές. Κατά την προκατεργασία μπορεί να χρησιμοποιηθεί υψηλή θερμοκρασία για μικρή χρονική περίοδο (180°C, 10min) ή χαμηλή θερμοκρασία για μεγαλύτερη χρονική περίοδο (120°C, 30-90min). Τέλος, εκτός από θειικό οξύ έχουν χρησιμοποιηθεί και άλλα οξέα

όπως το υδροχλωρικό οξύ, φωσφορικό οξύ, νιτρικό οξύ, αλλά και οργανικά οξέα (μαλεϊκό, φουμαρικό οξύ) τα οποία μάλιστα παράγουν και λιγότερες φουρφουράλες από το θειικό οξύ (Alvira et al., 2010; Haghghi Mood et al., 2013).

1.3.1.2.2. Αλκαλική προκατεργασία

Η αλκαλική προκατεργασία είναι η πιο κοινή προκατεργασία για την απομάκρυνση της ημικυτταρίνης και της λιγνίνης. Κατά την αλκαλική προκατεργασία οι εστερικοί δεσμοί της ημικυτταρίνης και της λιγνίνης διασπώνται με αποτέλεσμα να διαλυτοποιούνται και η κυτταρίνη να γίνεται ευκολότερα προσβάσιμη για το ένζυμο. Είναι δυνατή η περαιτέρω διαλυτοποίηση με εφαρμογή σχετικά υψηλής θερμοκρασίας ώστε να διασπαστούν και οι αιθερικοί δεσμοί της ημικυτταρίνης και της λιγνίνης (Haghghi Mood et al., 2013; S. Sun et al., 2016). Ακόμα με την αλκαλική επεξεργασία επιτυγχάνεται διόγκωση της κυτταρίνης με αποτέλεσμα να μειώνεται η κρυσταλλικότητά της αλλά και να σπάει οπότε μειώνεται και ο βαθμός πολυμερισμού της, γεγονός που οδηγεί και στην καταστροφή της δομής της λιγνίνης (Sudiyani et al., 2014). Οι πιο συχνά χρησιμοποιούμενες ενώσεις είναι το υδροξείδιο του νατρίου και το υδροξείδιο του ασβεστίου. Με διάλυμα NaOH επιτυγχάνεται κυρίως η διόγκωση της κυτταρίνης, ενώ με το Ca(OH)₂ η απομάκρυνση της λιγνίνης και των ακετυλομάδων από την ημικυτταρίνη. Η προκατεργασία με Ca(OH)₂ έχει χαμηλότερο κόστος και απαιτούνται λιγότερα μέτρα ασφαλείας από την προκατεργασία με NaOH. Σε σχέση με την όξινη προκατεργασία, η αλκαλική διαλυτοποιεί λιγότερο την κυτταρίνη και την ημικυτταρίνη, όμως αποδομεί λιγότερο τους μονοσακχαρίτες. Βασικό πλεονέκτημα αυτής της προκατεργασίας είναι ότι απομακρύνει τη λιγνίνη χωρίς να επηρεάζει πολύ τα υπόλοιπα συστατικά της βιομάζας, ενώ βασικά μειονεκτήματα είναι ότι απαιτείται μεγάλος χρόνος προκατεργασίας και εξουδετέρωση της προκατεργασμένης βιομάζας (Alvira et al., 2010).

1.3.1.2.3. Ιοντικά υγρά

Τα ιοντικά υγρά είναι οργανικά άλατα αποτελούμενα από μεγάλα οργανικά κατιόντα και μικρά ανόργανα ανιόντα. Έχουν τη δυνατότητα να διαλυτοποιούν υδρογονάνθρακες και λιγνίνη ταυτόχρονα. Αυτό πραγματοποιείται μέσω δεσμών υδρογόνου που σχηματίζονται μεταξύ των άνυδρων ιόντων του ιοντικού υγρού και τα πρωτόνια υδροξυλίου των σακχάρων, με αποτέλεσμα να απλοποιείται το πολύπλοκο σύστημα κυτταρίνης, ημικυτταρίνης και λιγνίνης. Βασικά πλεονεκτήματα της μεθόδου σε σχέση με άλλες προκατεργασίες είναι ότι οι συνθήκες της διεργασίας καθώς και τα χημικά που χρησιμοποιούνται είναι αρκετά ασφαλή, μπορούν να παραμείνουν υγρά σε μεγάλο εύρος θερμοκρασίας, έχουν μεγάλη θερμική και χημική σταθερότητα και θεωρούνται «πράσινοι» διαλύτες αφού δεν σχηματίζουν τοξικά και εκρηκτικά αέρια. Βασικό μειονεκτήματα των ιοντικών υγρών είναι ότι άμα δεν είναι συμβατά με την κυτταρίνη τότε δεν αλλάζουν την δομή της με αποτέλεσμα μετέπειτα να μην δράσει η κυτταρινάση. Για να εφαρμοστούν σε βιομηχανική κλίμακα πρέπει να ερευνηθούν αρκετά ακόμα ως προς την μείωση της ποσότητας των ιοντικών υγρών που χρησιμοποιούνται στην προκατεργασία, την εύρεση μιας οικονομικότερης μεθόδου ανακύκλωσης τους και το ιξώδες

του υγρού να μην είναι πολύ μεγάλο ώστε να διαχειρίζεται πιο εύκολα (Alvira et al., 2010; Haghghi Mood et al., 2013).

1.3.1.2.4. Οργανικοί διαλύτες

Ως προκατεργασία στη λιγνινοκυτταρινούχο βιομάζα μπορούν να χρησιμοποιηθούν και οργανικοί διαλύτες. Μερικοί απ' αυτούς είναι η μεθανόλη, η αιθανόλη, η ακετόνη, οργανικά οξέα και άλλοι. Η αιθανόλη αποτελεί τον πιο ευνοϊκό διαλύτη λόγω της χαμηλής της τοξικότητας και της εύκολης ανάκτησής της. Όμως οι οργανικοί διαλύτες δεν είναι πολύ δραστικοί, οπότε συνήθως προστίθεται και κάποιο οξύ (π.χ. θειικό) ή κάποια βάση (π.χ. υδροξείδιο του νατρίου) (S. Sun et al., 2016). Έτσι επιτυγχάνεται η διάσπαση των εσωτερικών δεσμών της λιγνίνης και της ημικυτταρίνης. Η προκατεργασία αυτή είναι πολύ αποτελεσματική για βιομάζες με μεγάλο ποσοστό λιγνίνης. Βασικά πλεονεκτήματα της μεθόδου είναι η εύκολη ανάκτηση των διαλυτών, οι μη σημαντικές επιπτώσεις στο περιβάλλον και η συλλογή ρεύματος σχετικά καθαρής λιγνίνης (Alvira et al., 2010). Τα κυριότερα μειονεκτήματα είναι το χαμηλό σημείο ζέσεως των διαλυτών, η ευφλεκτότητα και η αστάθεια αυτών και τέλος, οι διαλύτες πρέπει να ανακυκλώνονται για να μειωθεί το κόστος της διεργασίας και γιατί αποτελούν παρεμποδιστές της κυτταρινάσης (Haghghi Mood et al., 2013).

1.3.1.2.5. Οζονόλυση

Το όζον είναι ένας ισχυρός αέριος διαλύτης ο οποίος απομακρύνει μεγάλες ποσότητες λιγνίνης, αλλά και σημαντικές ποσότητες ημικυτταρίνης (Alvira et al., 2010). Τα βασικότερα πλεονεκτήματα της μεθόδου είναι η αφθονία του όζοντος, η διαλυτότητά του στο νερό, η έλλειψη παραπροϊόντων που παρεμποδίζουν την υδρόλυση και τη ζύμωση και οι συνθήκες κατά την προκατεργασία είναι ήπιες (θερμοκρασία δωματίου, ατμοσφαιρική πίεση) (Balat, 2011). Το μειονέκτημα της μεθόδου είναι η πολύ μεγάλη ποσότητα του απαιτούμενου όζοντος, που την καθιστά δαπανηρή (Haghghi Mood et al., 2013). Εκτός από όζον μπορούν ακόμα να χρησιμοποιηθούν οξυγόνο, υπεροξείδιο του υδρογόνου, χλώριο και άλλα ώστε να πραγματοποιηθεί οξειδωτική απολιγνίνωση της βιομάζας (S. Sun et al., 2016).

1.3.1.3. Φυσικοχημικές προκατεργασίες

Αρκετές προκατεργασίες συνδυάζουν και φυσικά αλλά και χημικά χαρακτηριστικά, γι' αυτό ονομάζονται φυσικοχημικές προκατεργασίες. Οι σημαντικότερες είναι η έκρηξη ατμών, έκρηξη αμμωνίας, έκρηξη CO₂, η υδροθερμική προκατεργασία και η υγρή οξείδωση (Sudiyani et al., 2014).

1.3.1.3.1. Έκρηξη ατμών

Η έκρηξη ατμών είναι η πιο συχνά εφαρμοζόμενη προκατεργασία σε λιγνινοκυτταρινούχα υλικά. Αποτελεί μια θερμική, μηχανική και χημική προκατεργασία αφού εφαρμόζονται θερμοί ατμοί, θρυμματίσματα των σωματιδίων και αυτοϋδρόλυση των γλυκοζιτικών δεσμών. Οι θερμοκρασίες και οι πιέσεις που χρησιμοποιούνται στην έκρηξη ατμών είναι 160-260°C και 0,69-4,83 MPa αντίστοιχα (Xu & Huang, 2014). Κατά την έκρηξη ατμών η βιομάζα επεξεργάζεται με ατμό υψηλής πίεσης για μερικά δευτερόλεπτα ή και λεπτά και στη συνέχεια η πίεση μειώνεται απότομα στην ατμοσφαιρική με αποτέλεσμα να πραγματοποιείται εκρηκτική αποσύνθεση του υλικού. Με αυτήν την προκατεργασία επιτυγχάνεται η αύξηση της κρυσταλλικότητας της κυτταρίνης, λόγω της επιλεκτικής υδρόλυσης της άμορφης περιοχής, η υδρόλυση της ημικυτταρίνης, εξαιτίας της υψηλής θερμοκρασίας το νερό δρα σαν οξύ και ευνοείται η υδρόλυσή της, και απομάκρυνση λιγνίνης εξαιτίας της υψηλής θερμοκρασίας (Balat, 2011; Xu & Huang, 2014). Οι βασικοί παράγοντες που επηρεάζουν την διεργασία είναι το μέγεθος των σωματιδίων, ο χρόνος παραμονής, η θερμοκρασία και ο συνδυασμός χρόνου παραμονής και θερμοκρασίας. Βασικά πλεονεκτήματα της μεθόδου σε σχέση με άλλες είναι ότι η έκρηξη ατμών έχει χαμηλή απαιτούμενη επένδυση, είναι φιλική προς το περιβάλλον, μεγάλη ενεργειακή αποδοτικότητα, δεν χρησιμοποιεί επικίνδυνα χημικά και δεν υπάρχει απώλεια σακχάρων. Επίσης είναι μια από τις λίγες προκατεργασίες που είναι εφικτή η χρήση της σε βιομηχανική κλίμακα. Τα βασικά μειονεκτήματα είναι ότι η δομή της λιγνίνης με την κυτταρίνη και την ημικυτταρίνη καταστρέφεται μερικώς και σε υψηλές θερμοκρασίες παράγονται παρεμποδιστές της ζύμωσης (Balat, 2011). Οι παρεμποδιστές αυτοί μπορούν να μειωθούν αρκετά με ξέπλυμα της βιομάζας με νερό πριν τη ζύμωση. Για να αυξηθεί η απόδοση της υδρόλυσης και γενικότερα της παραγωγής αιθανόλης πολλές φορές χρησιμοποιείται και κάποιο οξύ ως καταλύτης στη μέθοδο έκρηξης ατμών. Τα πιο συνηθισμένα οξέα είναι το H_2SO_4 και το SO_2 . Όμως με την προσθήκη κάποιου οξέος ο εξοπλισμός φθείρεται γρηγορότερα και παράγονται περισσότεροι παρεμποδιστές της ζύμωσης. Έτσι ανάλογα με την περίπτωση επιλέγεται αν θα χρησιμοποιηθεί κάποιο οξύ και αν ναι πρέπει να μελετηθεί ποια είναι η κατάλληλη ποσότητα αυτού (Alvira et al., 2010).

1.3.1.3.2. Έκρηξη αμμωνίας

Η προκατεργασία έκρηξη αμμωνίας βασίζεται στην έκρηξη ατμού όμως χρησιμοποιεί υγρή αμμωνία. Οι βασικοί παράγοντες που επηρεάζουν την διεργασία είναι η ποσότητα της αμμωνίας, η ποσότητα του νερού, η θερμοκρασία, η υγρασία του υλικού, ο χρόνος παραμονής και η πίεση. Η διεργασία αυτή λειτουργεί σε υψηλές πιέσεις (1,72-2,06 MPa) και θερμοκρασίες που κυμαίνονται μεταξύ 60-120°C, για περίπου 30min. Η ξαφνική εξάπλωση της αέριας αμμωνίας προκαλεί διόγκωση και στη συνέχεια καταστροφή της δομής των λιγνινοκυτταρινούχων υλικών με αποτέλεσμα την μετέπειτα αύξηση της δραστηριότητας του ενζύμου στην υδρόλυση (Haghighi Mood et al., 2013). Τα κυριότερα πλεονεκτήματα της μεθόδου είναι η χαμηλή υγρασία μετά την επεξεργασία, δε σχηματίζονται πολύ παρεμποδιστικοί παράγοντες για τη ζύμωση, το υλικό μετά την υδρόλυση βρίσκεται σε μορφή στερεού εξαιτίας του χαμηλού σημείου ζέσεως της αμμωνίας και μειώνει αρκετά την

κρυσταλλικότητα της κυτταρίνης με αποτέλεσμα η κυτταρινάση να μπορεί εύκολα να προσδένεται σ' αυτήν. Όμως το κόστος της αμμωνίας είναι σχετικά μεγάλο και είναι απαραίτητη η ανακύκλωσή της η οποία είναι μια πολύπλοκη διαδικασία. Μπορεί να ανακυκλωθεί το 95% της αμμωνίας και το υπόλοιπο 5% που παραμένει στη βιομάζα μπορεί να χρησιμεύσει ως πηγή αζώτου για τον μικροοργανισμό της ζύμωσης. Τέλος, είναι απαραίτητη και η χρήση ημικυτταρινασών κατά την υδρόλυση γιατί η ημικυτταρίνη υδρολύεται σε πολύ μικρό βαθμό στην προκατεργασία (Alvira et al., 2010; Xu & Huang, 2014).

1.3.1.3.3. Έκρηξη CO₂

Η έκρηξη με CO₂ βασίζεται στην έκρηξη ατμών μόνο που περιέχει και υπερκρίσιμο CO₂ (31 °C, 7,4 MPa). Η μέθοδος λειτουργεί ομοίως με τις δύο προηγούμενες αφού το μόριο του διοξειδίου του άνθρακα είναι παρόμοιο σε μέγεθος με το μόριο του νερού και τις αμμωνίας. Έτσι μπορεί να εισέλθει σε μικρούς πόρους της δομής της λιγνινοκυτταρινούχου βιομάζας και επειδή βρίσκεται σε υπερκρίσιμες συνθήκες είναι εφικτό να απομακρύνει τη λιγνίνη. Επίσης το CO₂ όταν διαλυθεί στο νερό σχηματίζει ανθρακικό οξύ το οποίο υδρολύει τους γλυκοζιτικούς δεσμούς. Αυτή η μέθοδος είναι οικονομικά αποδοτικότερη από την έκρηξη αμμωνίας και δεν παράγονται παρεμποδιστές της ζύμωσης όπως στην έκρηξη ατμών. Επίσης δεν παράγει απόβλητα αφού το CO₂ απομακρύνεται εύκολα από τη βιομάζα και θεωρείται οικονομική γιατί το CO₂ που παράγεται κατά τη ζύμωση μπορεί να χρησιμοποιηθεί στην προκατεργασία. Όμως, η απόδοση στη μετέπειτα υδρόλυση είναι λιγότερο αποδοτική σε σχέση με τις προηγούμενες δύο μεθόδους (Alvira et al., 2010; Haghghi Mood et al., 2013).

1.3.1.3.4. Υδροθερμική προκατεργασία

Η υδροθερμική προκατεργασία είναι αρκετά παλιά μέθοδος. Χρησιμοποιείται καυτό νερό σε θερμοκρασία μεταξύ 160-240 °C και υψηλή πίεση τέτοια ώστε το νερό να βρίσκεται σε υγρή μορφή και διαρκεί από μερικά λεπτά μέχρι και ώρα. Το νερό δρα ως αραιό οξύ το οποίο υδρολύει επιλεκτικά γλυκοζιτικούς δεσμούς απελευθερώνοντας ακετυλομάδες οι οποίες σχηματίζουν οξικά και ουρανικά οξέα. Αυτά τα οξέα καταλύουν την υδρόλυση της ημικυτταρίνης. Ακόμα αυτά τα οξέα οδηγούν στην αποσύνθεση της λιγνίνης. Για να αποφευχθεί η αποικοδόμηση των μονοσακχαριτών σε παρεμποδιστικές ουσίες το pH πρέπει να διατηρείται από 4 έως 7. Τα κυριότερα πλεονεκτήματα της μεθόδου είναι ότι δε χρειάζεται πρόσθετα οξέα, παράγει ελάχιστους παρεμποδιστές της ζύμωσης και επειδή χρησιμοποιείται νερό δεν χρειάζεται ξέπλυμα της βιομάζας μετά την προκατεργασία. Όμως είναι ενεργειακά δαπανηρή διεργασία εξαιτίας της υψηλής πίεσης και της μεγάλης ποσότητας νερού που χρησιμοποιείται (Xu & Huang, 2014).

1.3.1.3.5. Υγρή οξείδωση

Η υγρή οξείδωση αποτελεί μια οξειδωτική προκατεργασία η οποία χρησιμοποιεί O₂ ή αέρα ως καταλύτη. Χρησιμοποιούνται θερμοκρασίες μεγαλύτερες των 120°C και πιέσεις από 10 bar και άνω συνήθως και σε χρόνο που ποικίλει από μερικά λεπτά έως και ώρες. Με προσθήκη O₂ σε θερμοκρασία μεγαλύτερη των 170 °C μετατρέπει την διεργασία σε εξώθερμη εξοικονομώντας ενέργεια. Η βασική αντίδραση στην υγρή οξείδωση είναι ο σχηματισμός οξέων. Με την υγρή οξείδωση επιτυγχάνεται κυρίως η διαλυτοποίηση της ημικυτταρίνης και της λιγνίνης. Για να μειωθούν οι παρεμποδιστικοί παράγοντες αρκεί η διατήρηση του pH σε τιμές ίσες ή και μεγαλύτερες του 7. Αυτό επιτυγχάνεται με την προσθήκη κάποιας βάσης. Τα κυριότερα πλεονεκτήματα της μεθόδου είναι η μικρή ποσότητα παρεμποδιστών που παράγονται και η αποτελεσματική απομάκρυνση της λιγνίνης, ενώ το κόστος της διεργασίας είναι το βασικότερο μειονέκτημα (Alvira et al., 2010; Haghghi Mood et al., 2013).

1.3.1.4. Βιολογικές προκατεργασίες

Η βιολογική προκατεργασία χρησιμοποιεί μικροοργανισμούς για την αποικοδόμηση της ημικυτταρίνης και της λιγνίνης. Οι μικροοργανισμοί που χρησιμοποιούνται είναι κυρίως οι καφέ, λευκοί ή μαλακοί σαπροφυτικοί μύκητες. Από αυτούς τους μύκητες οι λευκοί σαπροφυτικοί μύκητες θεωρούνται οι πιο αποτελεσματικοί, οι οποίοι αποδομούν την λιγνίνη με κάποια ένζυμα που παράγουν, τις υπεροξειδάσες και τις λακκάσες (Alvira et al., 2010; Balat, 2011). Τα κυριότερα πλεονεκτήματα της μεθόδου είναι ότι δε χρησιμοποιούνται χημικά, η χαμηλή κατανάλωση ενέργειας, οι ήπιες συνθήκες, και αποτελεί μια περιβαλλοντικά φιλική προκατεργασία. Όμως, υπάρχουν και αρκετά μειονεκτήματα όπως το μεγάλο χρονικό διάστημα αλλά και ο μεγάλος όγκος που απαιτεί αυτή η προκατεργασία, ο συνεχής και προσεκτικός έλεγχος των συνθηκών της ανάπτυξης των μυκήτων και κυριότερα απ' όλα η χαμηλές αποδόσεις κατά την υδρόλυση (Sudiyani et al., 2014).

1.3.1.5. Συνδυασμός προκατεργασιών

Για να αντιμετωπιστούν τα μειονεκτήματα διαφόρων προκατεργασιών πολλές φορές γίνεται συνδυασμός δύο ή περισσότερων προκατεργασιών. Ο συνδυασμός αυτός αποσκοπεί σε μια πιο αποδοτική υδρόλυση, στην παραγωγή λιγότερων παρεμποδιστών και στην μείωση του χρόνου της προκατεργασίας. Στον παρακάτω πίνακα φαίνονται κάποιοι συνδυασμοί και οι λόγοι για τους οποίους μπορούν να συμβούν (Haghighi Mood et al., 2013).

Πίνακας 6 Συνδυασμένες προκατεργασίες (Haghighi Mood et al., 2013)

Προκατεργασία 1	Πρόβλημα	Προκατεργασία 2	Συνδυασμένη προκατεργασία-κέρδος
Αραιό οξύ (οξικό οξύ)	Απαιτείται μεγάλη ποσότητα για να επιτευχθεί η αποικοδόμηση της λιγνίνης	Βάση	2 Βήματα. 1 ^ο) η βάση αποδομεί μια ποσότητα της λιγνίνης, 2 ^ο) χρήση μικρότερης ποσότητας οξέος για την αποικοδόμηση της υπόλοιπης
Έκρηξη ατμών	Χαμηλή απόδοση στην υδρόλυση	Αραιό οξύ	2 Βήματα. 1 ^ο) το οξύ υδρολύει την ημικυτταρίνη, 2 ^ο) έκρηξη ατμών
Βιολογική	Χαμηλή απόδοση στην υδρόλυση	Αραιό οξύ	Αύξηση των παραγόμενων σακχάρων κατά την υδρόλυση
Βιολογική	Δεν αποδομείται η κυτταρίνη και η λιγνίνη	Έκρηξη ατμών	Αποικοδόμηση κυτταρίνης και λιγνίνης και μείωση του χρόνου προκατεργασίας

1.3.1.6. Σύγκριση προκατεργασιών

Στους παρακάτω πίνακες γίνεται σύγκριση των προκατεργασιών ως προς την χημική αλλά και τη δομική αλλαγή που προκαλούν στη λιγνινοκυτταρινούχο βιομάζα (πίνακας 7) και τα πλεονεκτήματα και μειονεκτήματα της κάθε προκατεργασία (πίνακας 8).

Πίνακας 7 Σύγκριση προκατεργασιών ως προς την αλλαγή στη δομή της λιγνινοκυτταρινούχου βιομάζας (Alvira et al., 2010; Haghighi Mood et al., 2013)

Προκατεργασία	Αύξηση ειδικής επιφάνειας	Αποκρυστάλλωση κυτταρίνης	Απομάκρυνση και διαλυτοποίηση ημικυτταρίνης	Απομάκρυνση λιγνίνης	Παραγωγή παρεμποδιστών
Οξύ	++	-	++	+	++
Βάση	++	-	+	++	+/-
Ιοντικά υγρά	++	++	+	+	-
Οργανικοί διαλύτες	++	ΔΑ	++	++	-
Οζονόλυση	++	ΔΑ	-	++	-
Έκρηξη ατμών	++	-	++	+/-	++
Έκρηξη αμμωνίας	++	++	+	++	+/-
Έκρηξη CO ₂	++	-	++	-	-
Υγρή οξείδωση	++	+	++	++	+/-
Υδροθερμική	++	ΔΑ	++	+/-	+/-
Βιολογική	++	+	+/-	++	-
Άλεση	++	++	-	-	-

++: μεγάλη επίδραση, +: μεσαία επίδραση, +/-: μικρή επίδραση, -: καθόλου επίδραση, ΔΑ: δεν έχει αποφασιστεί

Πίνακας 8 Βασικά πλεονεκτήματα και μειονεκτήματα των διαφόρων προκατεργασιών (Alvira et al., 2010; Haghighi Mood et al., 2013; Sudiyani et al., 2014)

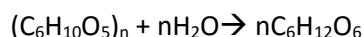
Προκατεργασία	Πλεονεκτήματα	Μειονεκτήματα
Οξύ	Υψηλές αποδόσεις γλυκόζης, θερμοκρασία περιβάλλοντος	Διάβρωση εξοπλισμού, αποικοδόμηση σακχάρων, εξουδετέρωση μετά την προκατεργασία
Βάση	Απομάκρυνση λιγνίνης ημικυτταρίνης, χαμηλό κόστος	Χρονοβόρα, εξουδετέρωση μετά την προκατεργασία
Ιοντικά υγρά	Μείωση κρυσταλλικότητας κυτταρίνης	Υψηλό κόστος των υγρών
Οργανικοί διαλύτες	Υδρόλυση ημικυτταρίνης	Ανάκτηση και ανακύκλωση των διαλυτών, υψηλό κόστος

Οζονόλυση	Μείωση λιγνίνης, δεν παράγει τοξικές ουσίες	Απαιτούνται μεγάλες ποσότητες όζοντος, ακριβή διεργασία
Έκρηξη ατμών	Οικονομικά αποδοτική, αποικοδόμηση λιγνίνης και διαλυτοποίηση ημικυτταρίνης	Ατελής αποικοδόμηση της λιγνινοκυτταρινούχου δομής, παραγωγή τοξικών ουσιών
Έκρηξη αμμωνίας	Παραγωγή μικρής ποσότητας παρεμποδιστών	Απαιτήσεις υψηλών πιέσεων, μικρή αποδοτικότητα σε βιομάζες με μεγάλη περιεκτικότητα λιγνίνης, υψηλό κόστος αμμωνίας
Έκρηξη CO ₂	Οικονομικά αποδοτική, δεν παράγει τοξικές ουσίες	Απαιτήσεις υψηλών πιέσεων, δεν επηρεάζει την λιγνίνη και την ημικυτταρίνη
Υγρή οξείδωση	Ελαχιστοποίηση ενεργειακής απαίτησης (εξώθερμη), αποτελεσματική αποβολή λιγνίνης, λίγοι παρεμποδιστές	Υψηλό κόστος οξυγόνου και καταλυτών
Υδροθερμική	Υδρόλυση ημικυτταρίνη, αποδόμηση λιγνίνης, όχι παρεμποδιστές	Υψηλές θερμοκρασίες, προσθήκη βάσεως για έλεγχο pH
Βιολογική	Αποικοδόμηση ημικυτταρίνης και λιγνίνης, χαμηλή κατανάλωση ενέργειας	Μικρή απόδοση στην υδρόλυση, απαίτηση μεγάλου όγκου και πολύ χρόνου, συνεχής έλεγχος ανάπτυξης των μυκήτων
Άλεση	Μείωση κρυσταλλικότητας κυτταρίνης	Υψηλή κατανάλωση ενέργειας

1.3.2. Υδρόλυση

Υδρόλυση της λιγνινοκυτταρινούχου βιομάζας, καλείται η διεργασία μετατροπής της κυτταρίνης και της ημικυτταρίνης σε ζυμώσιμα σάκχαρα. Οι κυριότερες μέθοδοι υδρόλυσης είναι η χημική και η ενζυμική υδρόλυση. Κατά τη χημική υδρόλυση χρησιμοποιείται είτε αραιό είτε πυκνό οξύ, ενώ κατά την ενζυμική χρησιμοποιούνται κυτταρινάσες και ημικυτταρινάσες. Υδρόλυση μπορεί να γίνει και με άλλους τρόπους όπως με ακτινοβόληση (ακτίνες γ, μικροκύματα) αλλά δεν συμφέρει η εφαρμογή τους σε βιομηχανική κλίμακα.

Παρακάτω φαίνεται η μετατροπή της κυτταρίνης σε γλυκόζη που είναι και η βασική αντίδραση κατά την υδρόλυση (Balat, 2011).



1.3.2.1. Όξινη υδρόλυση

Κατά τη χημική υδρόλυση η προκατεργασία και η υδρόλυση γίνονται συνήθως σε ένα στάδιο. Η βασικότερη χημική υδρόλυση είναι η όξινη υδρόλυση. Μπορεί να πραγματοποιηθεί όξινη υδρόλυση με αραιό οξύ αλλά και με πυκνό οξύ.

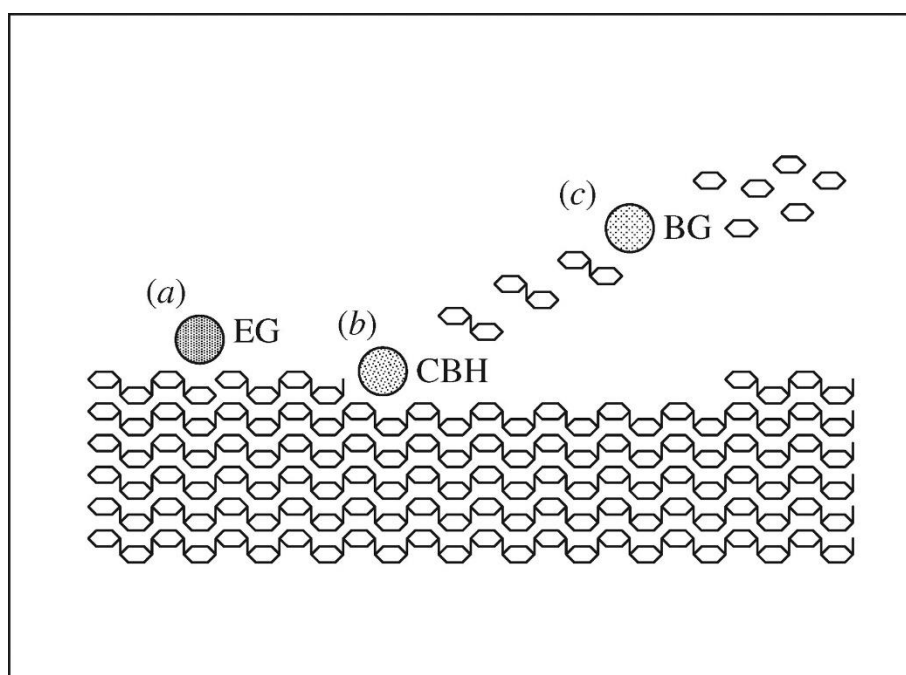
Η μέθοδος του αραιού οξέος μπορεί να χρησιμοποιηθεί και ως προκατεργασία για την ενζυμική υδρόλυση αλλά και ως υδρόλυση κατευθείαν (Sudiyani et al., 2014). Η υδρόλυση με αραιό οξύ είναι η πιο παλιά μέθοδος υδρόλυσης. Το οξύ που χρησιμοποιείται συνήθως είναι το H_2SO_4 σε περιεκτικότητα περίπου 1%. Επειδή το οξύ είναι αραιό απαιτείται υψηλή θερμοκρασία (περίπου $215^\circ C$) και πίεση και διαρκεί μερικά δευτερόλεπτα ή λεπτά. Λόγω του μικρού χρόνου υδρόλυσης, η διεργασία μπορεί να πραγματοποιηθεί σε αντιδραστήρα συνεχούς ροής. Παρότι η μέθοδος είναι πολύ γρήγορη δεν αποτελεί τη βέλτιστη μέθοδο γιατί έχει σημαντικά μειονεκτήματα. Βασικότερο πρόβλημα αποτελεί η χαμηλή απόδοση σε σάκχαρα. Επίσης λόγω της υψηλής θερμοκρασίας και πίεσης τα σάκχαρα αποδομούνται περαιτέρω σε συστατικά που αποτελούν παρεμποδιστές για τη ζύμωση. Για να μειωθούν κάπως αυτά τα προβλήματα, η υδρόλυση πραγματοποιείται σε δύο στάδια. Στο πρώτο στάδιο, η θερμοκρασία είναι χαμηλή για να μεγιστοποιηθεί η παραγωγή πεντοζών από την ημικυτταρίνη και στο δεύτερο η θερμοκρασία είναι υψηλή ώστε να μεγιστοποιηθεί η παραγωγή γλυκόζης από την κυτταρίνη (Balat et al., 2008).

Η μέθοδος του πυκνού οξέος, συνήθως, ξεκινάει με μια προκατεργασία με 70-90% πυκνό θειικό οξύ και στη συνέχεια πραγματοποιείται η υδρόλυση με 10-30% θειικό. Λόγω της υψηλής συγκέντρωσης οξέος δεν χρειάζεται υψηλή θερμοκρασία ($40-50^\circ C$ στην προκατεργασία και $100^\circ C$ στην υδρόλυση) και πίεση και η μετατροπή της κυτταρίνης σε γλυκόζη και της ημικυτταρίνης σε πεντόζες είναι πλήρης, με μικρή αποικοδόμηση σακχάρων. Σε σχέση με την μέθοδο του αραιού οξέος, η χρήση πυκνού οξέος απαιτεί περισσότερο χρόνο (2-4 h προκατεργασίας και 50 min υδρόλυσης). Όμως και αυτή η μέθοδος έχει αρκετά μειονεκτήματα όπως η φθορά του εξοπλισμού, και η επαναφορά και ανακύκλωση του οξέος (Balat, 2011).

1.3.2.2. Ενζυμική υδρόλυση

Βασικό μειονέκτημα της όξινης υδρόλυσης είναι η αποικοδόμηση των σακχάρων. Με τη χρήση ενζύμων όμως για τη μετατροπή της κυτταρίνης και της ημικυτταρίνης σε σάκχαρα, αυτό το πρόβλημα δεν υπάρχει. Ως ένζυμα στην ενζυμική υδρόλυση χρησιμοποιούνται οι κυτταρινάσες και οι ημικυτταρινάσες, οι οποίες δεν είναι ένα ένζυμο, αλλά αποτελούν μια ομάδα ενζύμων (Balat, 2011).

Οι κυτταρινάσες παράγονται από μικροοργανισμούς όπως ο *Trichoderma reesei* και ο *Aspergillus niger*. Τα βασικά ένζυμα της κυτταρινάσης είναι οι ενδογλουκανάσες, οι εξωγλουκανάσες και οι β-γλυκοζιδάσες, τα οποία δρουν συνεργιστικά για την μετατροπή της κυτταρίνης σε γλυκόζη. Οι ενδογλουκανάσες υδρολύουν τυχαία β-1,4-γλυκοζιτικούς δεσμούς οι οποίοι είναι εύκολα προσβάσιμοι στο ένζυμο δημιουργώντας έτσι νέες άκρες στις αλυσίδες. Οι εξωγλουκανάσες βρίσκουν αυτές τις άκρες και μετατρέπουν την κυτταρίνη σε πολλά κομμάτια κελλοβιόζης ή και γλυκόζης. Τέλος, οι β-γλυκοζιδάσες σπάνε τον β-1,4-γλυκοζιτικό δεσμό στα μόρια της κελλοβιόζης (που αποτελείται από δύο μόρια γλυκόζης ενωμένα με β-1,4-γλυκοζιτικό) κι έτσι τα μετατρέπουν σε γλυκόζη (Balat, 2011). Στην παρακάτω εικόνα φαίνεται η δράση των ενζύμων της κυτταρινάσης στην κυτταρίνη.



Εικόνα 9 Δράση των ενζύμων της κυτταρινάσης στην κυτταρίνη, όπου EG: ενδογλουκανάση, CBH: εξωγλουκανάση, BG: β-γλυκοζιδάση

Η ημικυτταρινάσες είναι επίσης ένα σύνολο ενζύμων πιο πολύπλοκο από τις κυτταρινάσες. Αυτό είναι λογικό αφού η ημικυτταρίνη δεν έχει μια συγκεκριμένη δομή και σύσταση όπως η κυτταρίνη, αλλά αποτελείται από πολλά διαφορετικά σάκχαρα ενωμένα σε διακλαδισμένες αλυσίδες, με βασικό πολυμερές την ξυλάνη. Μερικά ένζυμα της ημικυτταρίνης είναι: ενδο-1,4-β-D-ξυλανάσες, έξω-1,4-β-D-ξυλοζιδάσες, ενδο-1,4-β-D-μαννοζιδάσες, α-γλουκουρονιδάσες, ακετυλο-εστεράσες, α-L-αραβινοφουρανοζιδάσες και α-γαλακτοζιδάσες. (Jørgensen, Kutter, & Olsson, 2003) Ένα παράδειγμα λειτουργίας κάποιων ημικυτταρινασών αποτελούν οι ένδοξυλανάσες που αποικοδομούν την κύρια αλυσίδα της ξυλάνης σε πιο μικρούς ολιγοσακχαρίτες και στη συνέχεια οι ξυλοζιδάσες που αποικοδομούν τους ολιγοσακχαρίτες σε ξυλόζες (Χριστακόπουλος & Τοπακας, 2013).

Η απόδοση της ενζυμικής υδρόλυσης εξαρτάται από διάφορους παράγοντες όπως η θερμοκρασία, το pH, ο ρυθμός ανάδευσης, η συγκέντρωση υποστρώματος, η συγκέντρωση ενζύμου και άλλα. Η σύσταση και η δομή της βιομάζας είναι επίσης πολύ σημαντικοί παράγοντες για την υδρόλυση. Άμα πραγματοποιηθεί ενζυμική υδρόλυση χωρίς κάποια προκατεργασία τότε η απόδοση σε σάκχαρα θα 'ναι πολύ μικρή γιατί η πολύ λιγνίνη που θα

υπάρχει δεσμεύει τα ένζυμα, η κυτταρίνη θα είναι αρκετά κρυσταλλική και μπλεγμένη με ημικυτταρίνη με αποτέλεσμα να μην μπορούν τα ένζυμα να δράσουν αποτελεσματικά και το ποσοστό της κυτταρίνης σε σχέση με την ημικυτταρίνη και τη λιγνίνη θα είναι πολύ μικρότερο από το επιθυμητό. Γι' αυτούς τους λόγους πραγματοποιούνται κάποιες προκατεργασίες στη βιομάζα πριν την υδρόλυση. Τα κυριότερα πλεονεκτήματα της ενζυμικής υδρόλυσης είναι ότι αποτελεί περιβαλλοντικά φιλική μέθοδο, εφαρμόζονται ήπιες συνθήκες (pH 5, 50°C) και έχει χαμηλότερο κόστος από την όξινη υδρόλυση. Τα βασικότερα μειονεκτήματα αποτελούν το πολύ υψηλό κόστος των ενζύμων, το οποίο βέβαια έχει αρχίσει να πέφτει εξαιτίας της εκτεταμένης έρευνας για την παραγωγή ενζύμων και το γεγονός ότι τα σάκχαρα που παράγονται κατά την υδρόλυση αποτελούν παρεμπόδιση της υδρόλυσης (Sarkar, Ghosh, Bannerjee, & Aikat, 2012; Sudiyani et al., 2014).

1.3.3. Αλκοολική Ζύμωση

Η αλκοολική ζύμωση είναι μια βιολογική διεργασία που πραγματοποιείται από μικροοργανισμούς και μετατρέπει σάκχαρα σε αιθανόλη και CO₂. Ο μικροοργανισμός που χρησιμοποιείται πιο συχνά είναι ο *Saccharomyces cerevisiae*, ο οποίος παράγει μεγάλες συγκεντρώσεις αιθανόλης και είναι ανθεκτικός σε μεγάλες ποσότητες αυτής (Hallenbeck & Ghosh, 2012). Όμως ο *S. cerevisiae* δεν καταναλώνει πεντόζες με αποτέλεσμα η παραγωγή της αιθανόλης να είναι μειωμένη σε σχέση με τη θεωρητική, άμα καταναλώνονταν και οι πεντόζες. Για την αντιμετώπιση αυτού του προβλήματος χρησιμοποιούνται γενετικά τροποποιημένοι *S. cerevisiae*, οι οποίοι διαθέτουν τα απαραίτητα γονίδια, από μικροοργανισμούς που καταναλώνουν πεντόζες (π.χ. *Pichia Stipites*, *Candida Shehatae* και *Candida Parapsilosis*) για την κατανάλωση και πεντοζών με στόχο την παραγωγή μεγαλύτερης συγκέντρωσης αιθανόλης. Γενετική τροποποίηση πραγματοποιείται και για άλλους λόγους όπως ανθεκτικότητα σε μεγαλύτερες θερμοκρασίες. Άλλοι μικροοργανισμοί που χρησιμοποιούνται είναι ο *Zygomonas Mobilis*, ο οποίος ενώ έχει μεγαλύτερη απόδοση από τον *S. cerevisiae* δεν μπορεί να μεταβολίσει τις πεντόζες ακόμα και μετά από γενετική τροποποίηση (Sarkar et al., 2012; Sudiyani et al., 2014).

1.3.3.1. Διεργασίες παραγωγής αιθανόλης

Οι βασικοί παράγοντες που επηρεάζουν την αλκοολική ζύμωση είναι: η θερμοκρασία, το pH, η αντοχή του μικροοργανισμού στην αιθανόλη, η ανάπτυξη του μικροοργανισμού, η παραγωγικότητα, η αντοχή στους παρεμποδιστές και άλλοι. Για την ανάπτυξη αποδοτικών διεργασιών πρέπει οι παραπάνω παράγοντες να ληφθούν υπόψιν. Έτσι οι βασικότερες διεργασίες που αναπτύχθηκαν είναι η ταυτόχρονη σακχαροποίηση και ζύμωση (SSF), η διακριτή υδρόλυση και ζύμωση (SHF), η ενοποιημένη βιοδιεργασία (CBP) και η ταυτόχρονη σακχαροποίηση και συν-ζύμωση (SSCF) (Balat, 2011).

Κατά την SSF η υδρόλυση και η ζύμωση πραγματοποιούνται ταυτοχρόνως. Αυτό έχει σαν αποτέλεσμα οι μικροοργανισμοί να καταναλώνουν απευθείας τα σάκχαρα που παράγονται.

Με αυτόν τον τρόπο επιτυγχάνεται η αποφυγή της συσσώρευσης σακχάρων και άρα δεν παρεμποδίζεται η υδρόλυση από το προϊόν της. Η SSF αποτελεί την πιο διαδεδομένη διεργασία και έχει αρκετά πλεονεκτήματα, όπως μικρότερος χρόνος διεργασίας, απαιτείται λιγότερο ένζυμο, χρησιμοποιείται ένας αντιδραστήρας και εξαιτίας αυτού μειώνεται και η πιθανότητα μόλυνσης. Το βασικό πρόβλημα της SSF είναι η θερμοκρασία λειτουργίας. Η βέλτιστη θερμοκρασία λειτουργίας για την αλκοολική ζύμωση είναι γύρω στους 32 °C ενώ για την υδρόλυση 50-55 °C. Έτσι η θερμοκρασία λειτουργίας που επιλέγεται βρίσκεται κάπου ενδιάμεσα ώστε η τελική παραγωγή αιθανόλης να είναι η βέλτιστη. Συνήθως διαλέγεται μια θερμοκρασία γύρω στους 35 °C, αλλά αυτό εξαρτάται κυρίως από το πόσο θερμοάντοχος είναι ο μικροοργανισμός. Για την αύξηση της παραγωγής της αιθανόλης συνήθως πραγματοποιείται προϋδρόλυση, για 12 h, ώστε να ξεκινήσουν κατευθείαν οι μικροοργανισμοί να καταναλώνουν σάκχαρα (Sudiyani et al., 2014).

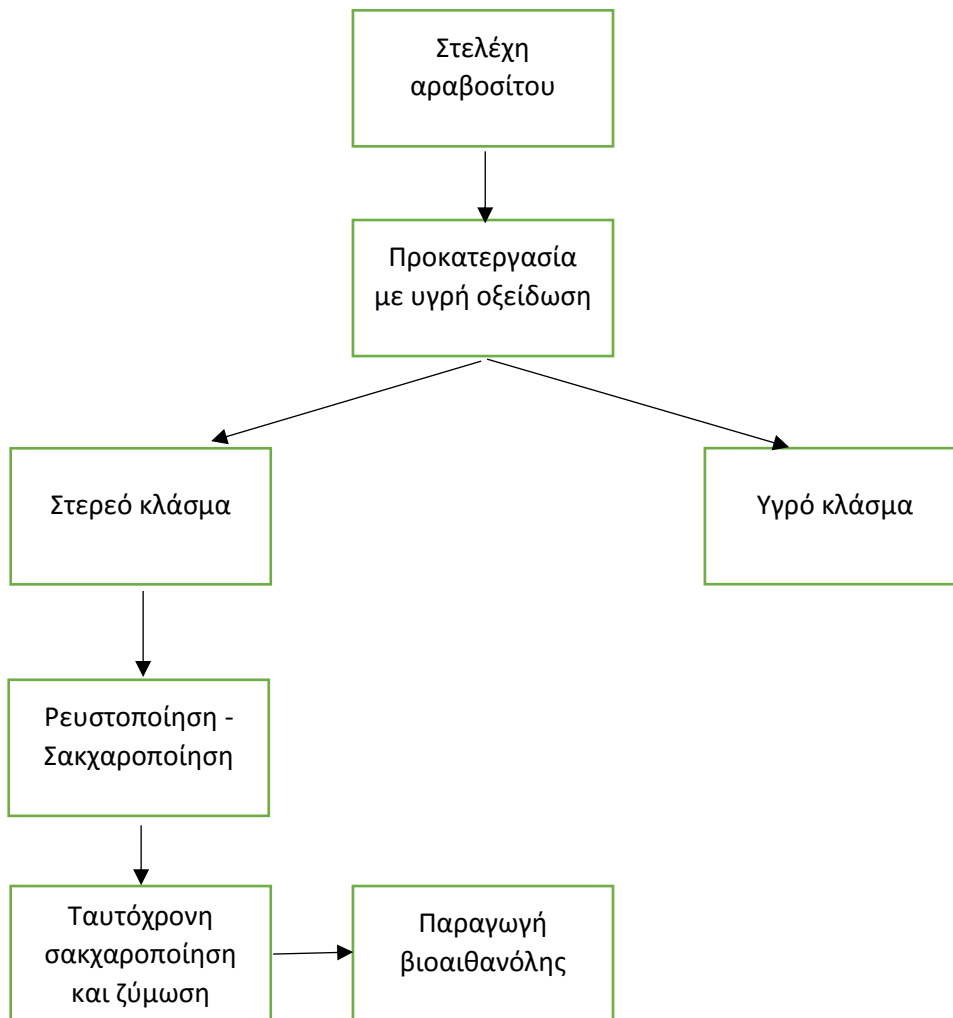
Κατά την SHF η υδρόλυση και η ζύμωση γίνονται ξεχωριστά. Το βασικό πλεονέκτημα της διεργασίας είναι ότι και η υδρόλυση και η ζύμωση πραγματοποιούνται στις βέλτιστες θερμοκρασίες, όμως λόγω της υψηλής συγκέντρωσης γλυκόζης παρεμποδίζεται η υδρόλυση και απαιτείται περισσότερος χρόνος και χώρος για τη διεργασία. Γι' αυτούς τους λόγους η μέθοδος αυτή είναι λιγότερο συμφέρουσα από την SSF. Στον παρακάτω πίνακα φαίνεται μια σύγκριση της SSF με την SHF (Balat, 2011; Sarkar et al., 2012).

Πίνακας 9 Σύγκριση SSF, SHF(Sarkar et al., 2012)

Διεργασία παραγωγής αιθανόλης	Πλεονεκτήματα	Μειονεκτήματα
SSF	Χαμηλό κόστος Μεγαλύτερες αποδόσεις Λιγότεροι αντιδραστήρες	Διαφορετική βέλτιστη θερμοκρασία υδρόλυσης με αυτή της ζύμωσης
SHF	Βέλτιστες συνθήκες υδρόλυσης και ζύμωσης	Παρεμπόδιση υδρόλυσης από το προϊόν της Αυξημένος χρόνος διεργασίας οπότε και μεγαλύτερη πιθανότητα μόλυνσής της

Ακόμα, έχουν μελετηθεί και άλλες διεργασίες παραγωγής αιθανόλης. Η CBP συνδυάζει την παραγωγή των ενζύμων, την υδρόλυση και τη ζύμωση σε ένα βήμα και είναι πολλά υποσχόμενη αφού θα μειώσει και τον χρόνο παραγωγής αιθανόλης αλλά και το κόστος. Κάποιοι μικροοργανισμοί που μπορούν να χρησιμοποιηθούν σε αυτή τη μέθοδο είναι ο *Fusarium oxysporum*, ο *Monilia sp.* και ο *Neurospora crassa*. Όμως η απόδοση σε αιθανόλη είναι πολύ μικρή και πρέπει να πραγματοποιηθεί περαιτέρω μελέτη για να χρησιμοποιηθεί σε μεγάλη κλίμακα (Hallenbeck & Ghosh, 2012; Χριστακόπουλος & Τοπακας, 2013). Τέλος, μια ακόμη διεργασία είναι η SSSF η οποία είναι σαν την SSF με τη διαφορά ότι χρησιμοποιούνται δύο μικροοργανισμοί (όπως *S. cerevisiae* και *Candida shehatae*) σε δύο στάδια, αρχικά τον *S. cerevisiae* για την κατανάλωση των εξοζών και μετά τον *Candida shehatae* για την κατανάλωση των πεντοζών (Sarkar et al., 2012).

1.3.4. Διάγραμμα ροής παραγωγής αιθανόλης



2. Πειραματικό μέρος

2.1. Υλικά

2.1.1. Μικροοργανισμοί

Ο μικροοργανισμός που χρησιμοποιήθηκε είναι ο *Saccharomyces cerevisiae* για την πραγματοποίηση της ζύμωσης. Ο μικροοργανισμός (Ethanol Red®) παραλήφθηκε από την εταιρία Fermentis.

2.1.2. Πρώτες ύλες

Ως πρώτη ύλη χρησιμοποιήθηκαν τεμαχισμένα στελέχη αραβοσίτου (corn stover) τα οποία παραλήφθηκαν από το τμήμα Γεωπονίας, Φυτικής Παραγωγής και Αγροτικού Περιβάλλοντος του πανεπιστημίου της Θεσσαλίας. Το κτήμα (Βελεστίνο, Μαγνησία) θερίστηκε τον Σεπτέμβριο του 2013. Στον παρακάτω πίνακα φαίνεται η περιεκτικότητα του ακατέργαστου υλικού σε κυτταρίνη, ημικυτταρίνη, λιγνίνη και τέφρα σε ξηρή βάση.

Πίνακας 10 % Περιεκτικότητα στελεχών αραβοσίτου σε κυτταρίνη, ημικυτταρίνη, λιγνίνη και τέφρα

Υλικό	Κυτταρίνη	Ημικυτταρίνη	Λιγνίνη	Τέφρα
Στελέχη αραβοσίτου	38,8 ± 0,86 %	23,5 ± 1,12 %	20,2 ± 0,72 %	5,3 ± 0,19 %

2.1.3. Ένζυμα

Το ενζυμικό σκεύασμα που χρησιμοποιήθηκε ήταν το Cellic® CTec2, που αποτελεί μίγμα λιγνινοκυτταρινολυτικών ενζύμων για την υδρόλυση της λιγνινοκυτταρινούχου βιομάζας. Το ενζυμικό αυτό σκεύασμα προέρχεται από την Novozymes A/S (Bagsværd, Denmark).

2.1.4. Ρυθμιστικά διαλύματα

Τα ρυθμιστικά διαλύματα που χρησιμοποιήθηκαν αλλά και ο τρόπος παρασκευής τους φαίνονται παρακάτω:

Πίνακας 11 Ρυθμιστικά διαλύματα

Ρυθμιστικό διάλυμα	Συγκέντρωση	pH	Συστατικά
Κιτρικών φωσφορικών (με αζίδιο)	0.1 M	5	0.1 M κιτρικό οξύ 0.2 M φωσφορικό νάτριο και 0.01% αζίδιο του νατρίου
Κιτρικών φωσφορικών	0.1 M	5	0.1 M κιτρικό οξύ και 0.2 M φωσφορικό νάτριο

2.1.5. Όργανα και συσκευές

Παρακάτω φαίνονται τα όργανα και οι συσκευές που χρησιμοποιήθηκαν στην παρούσα διπλωματική εργασία:

- Αναμικτήρας ελεύθερης πτώσης inox mar, εργαστήριο βιοτεχνολογίας
- Συσκευή κενού Heto Master, (Heto-Holten A/S, Δανία)
- Κατσαρόλα για βράσιμο με λύχνο bundchen
- Φυγόκεντρος Beckman TJ-6 (ΗΠΑ) και μικρή φυγόκεντρος για erpendorf Zentrifuge 3200 (Γερμανία)
- Μαγνητικός αναδευτήρας Nahita 690-1
- Γυάλινος ξηραντήρας
- Vortex Velp Scientifica
- Θερμοστατούμενα υδρόλουτρα
- Microplate reader Spectramax250, με λογισμικό softmax pro
- Σύστημα υγρής χρωματογραφίας υψηλής απόδοσης (HPLC) Shimadzu (Ιαπωνία) με σύστημα παροχής διαλύτη Shimadzu LC-20AD, με ανιχνευτή δείκτη διάθλασης Shimadzu RID-10A, με ένα αυτόματο δειγματολήπτη Shimadzu SIL-20A κι έναν υπολογιστή που ελέγχει το σύστημα μέσω του προγράμματος LCsolution έκδοση 1.24 SP1, Shimadzu. Η χρωματογραφική στήλη που χρησιμοποιήθηκε είναι μία Aminex HPLC-87H (300 x 7.8 mm, μέγεθος σωματιδίων 9 μm, Bio-rad, Hercules, ΗΠΑ). Η κινητή φάση ήταν 5mM θειικό οξύ σε απαερωμένο υπερκάθαρο νερό σε σταθερή ογκομετρική ροή 0,6 mL/min, και η θερμοκρασία της στήλης διατηρήθηκε στους 40°C με χρήση ενός θερμαντήρα στήλης (Merck Millipore, Γερμανία)
- Ζυγοί Mark 2060 και Kern ABS 120-4

- Μετρητής pH WTW 537 (Γερμανία)
- Κοφτήριο Kenwood
- Φούρνοι WTC binder (Γερμανία) και Gollenhamp Muffle Furnace
- Φασματοφωτόμετρα Boeco S-20 και S-22 UV/Vis (Γερμανία)
- Αποστειρωτήρας Labo Autoclave Sanyo (ΗΠΑ)
- Επωαστήρας ZHWY-211C Zhicheng (Κίνα)
- Συσκευή υπερήχων Transsonic Digital, Elma (Γερμανία)
- Ιξωδόμετρο Anton Paar Physica MCR, Styria (Αυστρία)
- Συσκευή περίθλασης ηλεκτρομαγνητικής ακτινοβολίας (XRD) Bruker D8 Advance, (Γερμανία)

2.2. Μέθοδοι

2.2.1. Προκατεργασία στελεχών αραβοσίτου με υγρή οξείδωση

Τα δείγματα στελεχών αραβοσίτου προκατεργάστηκαν στο Ινστιτούτο Χημικών Διεργασιών και Ενεργειακών Πόρων (ΙΔΕΠ), στη Θεσσαλονίκη, με τη μέθοδο της υγρής οξείδωσης σε τρεις διαφορετικές πιέσεις (8.5, 20 και 40 bar). Ως διαλύτης χρησιμοποιήθηκε H₂O/ακετόνη σε αναλογία 1/1. Για αέριο χρησιμοποιήθηκε εμπλουτισμένος αέρα σε O₂ (40% O₂). Η θερμοκρασία που εφαρμόστηκε ήταν 175 °C και ο χρόνος της προκατεργασίας 120 min. Επίσης στα στελέχη αραβοσίτου πραγματοποιήθηκε και η προκατεργασία με τη μέθοδο Milox. Αυτή είχε ως διαλύτη φορμικό οξύ και 2% H₂O₂, σε πίεση 1 bar, θερμοκρασία 80 °C για 60 min.

2.2.2. Αναλυτικές μέθοδοι

Οι αναλυτικές μέθοδοι που χρησιμοποιήθηκαν στην παρούσα εργασία είναι:

1. Φωτομετρία
2. Η φωτομετρική μέθοδος DNS (3,5-δινιτροσαλικυλικό οξύ) για την μέτρηση των αναγωγικών σακχάρων.(Miller, 1959)
3. Η φωτομετρική μέθοδος μέτρησης γλυκόζης GOD/PAP
4. Μέτρηση αιθανόλης με υγρή χρωματογραφία υψηλής απόδοσης (HPLC)
5. Ανάλυση με περίθλαση ακτίνων X (XRD)

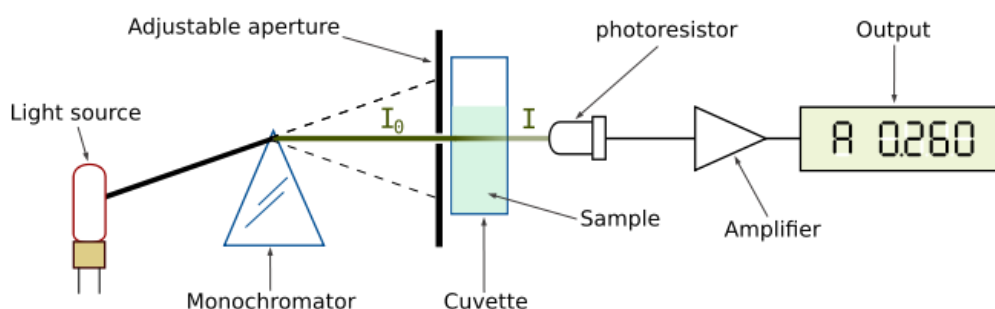
1) Φωτομετρία

Η φωτομετρία βασίζεται στην επιλεκτική απορρόφηση συγκεκριμένης συχνότητας της ηλεκτρομαγνητικής ακτινοβολίας από ένα δείγμα. Για τον υπολογισμό της συγκέντρωσης αυτού του δείγματος χρησιμοποιείται ο νόμος του Beer:

$A = \epsilon \cdot b \cdot C$, όπου A: απορρόφηση, ϵ : μοριακή απορρόφηση, b: μήκος διαδρομής της ακτινοβολίας και C: συγκέντρωση δείγματος.

Τα ϵ, b είναι σταθερά για συγκεκριμένη μετρούμενη ουσία και όργανο, οπότε με μια καμπύλη αναφοράς μπορεί να υπολογιστεί η συγκέντρωση του δείγματος άμα μετρηθεί η απορρόφησή του (Όξενγκιουν-Πετροπούλου & Παππά, 2009).

Τα βασικότερα μέρη του οργάνου είναι: η πηγή φωτός (λυχνία βολφραμίου για το ορατό και λυχνία δευτερίου για το UV), ο μονοχρωμάτορας που απομονώνει την ακτινοβολία σε ένα μήκος κύματος (στο οποίο το δείγμα έχει τη μέγιστη απορρόφηση) και ο ανιχνευτής από τον οποίο περνάει η δέσμη που πέρασε από το δείγμα και μια άλλη δέσμη που δεν πέρασε απ' το δείγμα ώστε να υπολογιστεί η απορρόφηση. Στην παρακάτω εικόνα φαίνεται η λειτουργία του φωτομέτρου (Όξενγκιουν-Πετροπούλου & Παππά, 2009).



Εικόνα 10 Φωτόμετρο

2) Μέθοδος DNS

Η αρχή της μεθόδου βασίζεται στο σχηματισμό συμπλόκου ανάμεσα στο ελεύθερο ημιακεταλικό υδροξύλιο του αναγωγικού σακχάρου και του δινιτροσαλικυλικού οξέος σε θέρμανση πάνω από 70 °C. Η μέθοδος αυτή βασίζεται στην αλλαγή χρώματος του διαλύματος από κίτρινο σε πορτοκαλοκόκκινο χρώμα (εικόνα 10) και έχει μέγιστη απορρόφηση στα 540 nm.



Εικόνα 11 Αναγωγή του DNS και αλλαγή χρώματος

Για την μέτρηση των αναγωγικών σακχάρων ενός δείγματος πρέπει σε δοκιμαστικούς σωλήνες (καλό είναι να υπάρχουν επαναλήψεις για μεγαλύτερη ακρίβεια) να τοποθετηθεί ίδια ποσότητα DNS και δείγματος (250 μ L+250 μ L). Έπειτα αναδεύονται και τοποθετούνται σε νερό που βράζει για 5 min. Στη συνέχεια, προστίθενται 2 mL νερό σε κάθε δοκιμαστικό και αναδεύονται. Τέλος φωτομετρούνται στα 540 nm και σύμφωνα με την κατάλληλη καμπύλη αναφοράς (π.χ. γλυκόζης) βρίσκεται η συγκέντρωση σε αναγωγικά σάκχαρα ως προς το σάκχαρο της καμπύλης αναφοράς.

3) Μέτρηση γλυκόζης με το εμπορικό σκεύασμα GOD/PAP

Η συγκεκριμένη μέθοδος βασίζεται στη διαδοχική δράση του ενζύμου της οξειδάσης και της υπεροξειδάσης της γλυκόζης ώστε να την μετατρέψουν σε ένα προϊόν ροζ χρώματος. Οι αντιδράσεις που πραγματοποιούνται φαίνονται παρακάτω:

Γλυκόζη + O₂ → Γλυκονικό οξύ + H₂O₂, λόγω δράσης της οξειδάσης της γλυκόζης

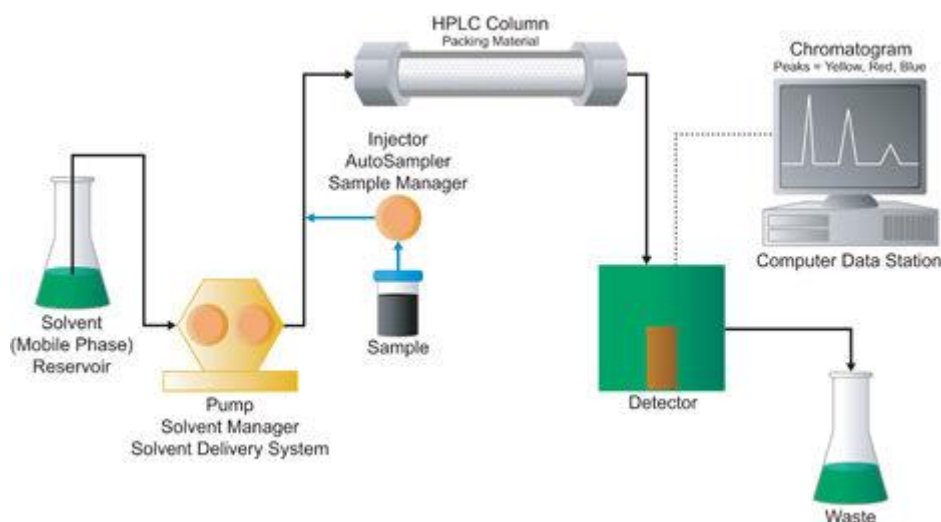
H₂O₂ + 4-Αμινοπυρίνη + Φαινολικό παράγωγο → Προϊόν ροζ χρώματος + 4 H₂O, λόγω δράσης της υπεροξειδάσης της γλυκόζης

Η μέτρηση γλυκόζης σε ένα δείγμα μπορεί να πραγματοποιηθεί με φωτομέτρηση σε 510 nm σε Microplate reader. Σε ένα microplate τοποθετούνται στα πηγάδια 240 µL διαλύματος GOD/PAP και 10 µL δείγματος. Το microplate τοποθετείται στο microplate reader σε θερμοκρασία 37 °C για 15 min. Στη συνέχεια μετριέται η απορρόφηση στα 510 nm.

4) HPLC

Η υγρή χρωματογραφία υψηλής απόδοσης βασίζεται στη διαφορετική μετακίνηση των σωματιδίων ενός διαλύματος κατά μήκος μιας στήλης που περιέχει ως στατική φάση ένα λεπτόκοκκο υλικό και ως κινητή φάση χρησιμοποιείται ένας διαλύτης ο οποίος βοηθά τις ουσίες του διαλύματος να μετακινηθούν μέσα στη στατική φάση. Το πληρωτικό υλικό που χρησιμοποιείται καθορίζει την τεχνική της χρωματογραφίας (π.χ. χρωματογραφία προσρόφησης)

Παρακάτω φαίνεται η οργανολογία της υγρής χρωματογραφίας υψηλής απόδοσης:



Εικόνα 12 Οργανολογία HPLC

Όπου αρχικά έχουμε τη δεξαμενή που βρίσκεται ο διαλύτης, μετά βρίσκεται η αντλία, στη συνέχεια το σύστημα εισαγωγής του δείγματος στη στήλη, μετά βρίσκεται η στήλη (συνήθως υπάρχει και μια μικρή προστήλη πριν τη στήλη), στη συνέχεια ο ανιχνευτής και τέλος το σύστημα καταγραφής και επεξεργασίας δεδομένων (ηλεκτρονικός υπολογιστής) (Οξενγκιουν-Πετροπούλου & Παππά, 2009).

Για τη μέτρηση της αιθανόλης με HPLC, ποσότητα των δειγμάτων τοποθετήθηκε σε vials σε τέτοια ποσότητα ώστε να είναι αρκετή για να φτάνει η βελόνα παραλαβής δείγματος. Ο

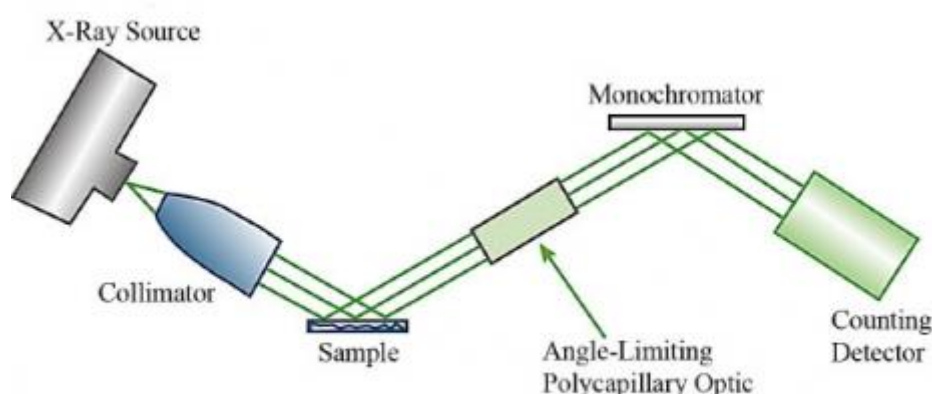
διαλύτης είναι 5 mM H₂SO₄ σε υπερκάθαρο νερό, ο οποίος απαερώνεται σε συσκευή υπερήχων για 40 min. Η βελόνα παραλαμβάνει 50 μL δείγματος και η ροή του διαλύτη στη στήλη είναι 0,6 mL/min. Η θερμοκρασία της στήλης διατηρείται στους 40 °C. Η μέτρηση πραγματοποιείται για 30 min αφού η κορυφή της αιθανόλης βγαίνει στα 21-22 min. Με ολοκλήρωση της κορυφής της αιθανόλης και κατασκευή μιας καμπύλης αναφοράς υπολογίζεται η συγκέντρωση της.

5) XRD

Η ανάλυση με περίθλαση ακτίνων X βασίζεται στη μοναδική απόσταση d που είναι χαρακτηριστική για κάθε κρυσταλλική ένωση. Έτσι άμα προσδιοριστεί η απόσταση d μπορεί να βρεθεί η κρυσταλλική ένωση. Αυτό επιτυγχάνεται με εφαρμογή μονοχρωματικής ακτινοβολίας ακτίνων X γνωστού μήκους κύματος λ στις εξεταζόμενες κρυσταλλικές ενώσεις, ώστε να βρεθεί η γωνία περίθλασης θ . Έτσι με την σχέση του Bragg μπορεί να προσδιοριστεί η απόσταση d (Όξενκιουν-Πετροπούλου & Παππά, 2009).

$$n \cdot \lambda = 2 \cdot d \cdot \eta \mu \theta, \quad (n=1,2,3,\dots \text{ η τάξη περίθλασης})$$

Η οργανολογία της μεθόδου φαίνεται στο παρακάτω σχήμα:



Εικόνα 13 Οργανολογία XRD

Στην εικόνα αρχικά υπάρχει η πηγή ακτινοβολίας X η οποία συνήθως είναι μια καθοδική λυχνία βολφραμίου με άνοδο ένα εκ των Ag, Co, Cr, Cu, Fe και Mo. Στη συνέχεια υπάρχει μια διόπτρα ευθυγράμμισης των ακτίνων X, μετά βρίσκεται το δείγμα, έπειτα μια υποδοχή αντιδιασκορπισμού ώστε να συλλέγεται η επιθυμητή ακτινοβολία, μετά ο μονοχρωμάτορας και τέλος ο ανιχνευτής. Επίσης υπάρχει κι ένας ηλεκτρονικός υπολογιστής ο οποίος συλλέγει και επεξεργάζεται τα δεδομένα (δεν φαίνεται στην εικόνα).

Κατά την μέτρηση στο XRD τα δείγματα τοποθετήθηκαν σε ειδική βάση που τοποθετείται μες στο όργανο. Οι γωνίες ακτινοβολίας 2θ ήταν από διάστημα 3°-30° με βήμα 0,02°/s. Η πηγή ακτίνων X ήταν λυχνία Cu, το μήκος κύματος της ακτινοβολίας $\lambda=1,5418 \text{ \AA}$ με τάση 40 kV και ένταση 40 mA.

2.2.3. Μέτρηση ενεργότητας κυτταρινάσης

Μετρήθηκε η ενεργότητα του εμπορικού ενζυμικού σκευάσματος Cellic Ctec2 σύμφωνα με το πρωτόκολλο μέτρησης ενεργότητας κυτταρινάσης (Adney & Baker, 1996).

Διηθητικά χαρτιά κόπηκαν σε παραλληλόγραμμα διαστάσεων (1x6 cm) έτσι ώστε να ζυγίζουν γύρω στα 50 mg. Τα κομμάτια αυτά τυλίχτηκαν σε κυλινδρικό σχήμα και τοποθετήθηκαν σε δοκιμαστικούς σωλήνες και προστέθηκε 1 mL ρυθμιστικό διάλυμα. Πραγματοποιήθηκαν 7 αραιώσεις του ενζυμικού σκευάσματος Cellic CTec2 (1/100, 1/200, 1/300, 1/400, 1/500, 1/600 και 1/800). Για κάθε αραιώση ενζυμικού σκευάσματος ετοιμάζεται και ένα τυφλό που περιέχει το ενζυμικό σκεύασμα και το ρυθμιστικό διάλυμα, επίσης ετοιμάζεται και τυφλό που περιέχει το ρυθμιστικό διάλυμα και το υπόστρωμα (διηθητικό χαρτί) και τέλος ένα τυφλό μόνο με το ρυθμιστικό διάλυμα. Ακόμα ετοιμάστηκαν πρότυπα γλυκόζης για κατασκευή καμπύλης αναφοράς. Αυτά τα διαλύματα αραιώθηκαν με ρυθμιστικό διάλυμα ώστε τελικά η συγκέντρωσή τους να είναι 1 mg/0.5 mL, 1.65 mg/0.5 mL, 2.5 mg/0.5 mL και 3,35 mg/0.5 mL. Σε δοκιμαστικούς σωλήνες προστέθηκαν επίσης 0.5 mL από τα διαλύματα γλυκόζης και 1 mL ρυθμιστικού διαλύματος. Οι δοκιμαστικοί σωλήνες τοποθετήθηκαν σε λουτρό στους 50 °C και στη συνέχεια προστέθηκαν 0,5 mL από τις διαφορετικές συγκεντρώσεις ενζυμικού σκευάσματος στα κατάλληλα σωληνάκια. Οι δοκιμαστικοί παρέμειναν στο λουτρό για 60 min και μετά το λουτρό, προστέθηκαν 3 mL DNS σε όλα τα σωληνάκια για να σταματήσει η δράση των ενζύμων (σταματά λόγω μεγάλης τιμής pH). Όλοι οι δοκιμαστικοί σωλήνες τοποθετήθηκαν σε νερό που έβραζε για 5 min. Στη συνέχεια με τη μέθοδο DNS, αφού αραιωθούν 0,2 mL δείγματος με 2,5 mL νερού, μετρήθηκε η συγκέντρωση της γλυκόζης αφού κατασκευάστηκε η καμπύλη αναφοράς της πρώτα.

Ακόμα μετρήθηκε η συγκέντρωση του ενζυμικού σκευάσματος Cellic CTec2 με τη μέθοδο Bradford. Κατά τη μέθοδο αυτή προετοιμάστηκαν σε δοκιμαστικούς σωλήνες δείγματα με συγκεντρώσεις πρωτεΐνης από 1 έως 10 mg/mL για κατασκευή καμπύλης αναφοράς. Στα πρότυπα διαλύματα πρωτεΐνης, στο τυφλό (ρυθμιστικό) και στο άγνωστο προστέθηκε το αντιδραστήριο Bradford (0.01% w/v CBB, 4.7% w/v αιθανόλη, 8.5% w/v φωσφορικό οξύ) και μετά από 15 min φωτομετρήθηκε στα 595 nm σε φωτόμετρο UV-Vis. Από την εξίσωση που προέκυψε από τα πρότυπα πρωτεΐνης μπορεί να υπολογιστεί η συγκέντρωση του αγνώστου διαλύματος σε πρωτεΐνη. Τέλος, είναι σημαντικό να γίνουν οι κατάλληλες αραιώσεις ώστε η απορρόφηση του αγνώστου να βρίσκεται μέσα στη γραμμική περιοχή της καμπύλης αναφοράς.

2.2.4. Ανάλυση σύστασης

Σκοπός της ανάλυσης σύστασης είναι ο προσδιορισμός της περιεκτικότητας των προκατεργασμένων υλικών σε κυτταρίνη, ημικυτταρίνη και λιγνίνη. Ανάλυση σύστασης πραγματοποιήθηκε και στα 3 υλικά των στελεχών αραβοσίτου (8.5, 20 και 40 bar κατά την προκατεργασία). Ζυγίστηκαν 300 mg από κάθε υλικό και τοποθετήθηκαν σε κωνικές φιάλες των 100 mL. Σε κάθε φιάλη προστέθηκαν 3 mL διαλύματος 72% H₂SO₄ και οι φιάλες τοποθετήθηκαν στον επωαστήρα στους 30 °C με ανάδευση 180 rpm για 1 h, ώστε να

υδρολυθούν τα δείγματα. Μετά την υδρόλυση σε κάθε φιάλη προστέθηκαν 84 mL νερού (το διάλυμα H₂SO₄ έγινε 4%) και αποστειρώθηκαν για 1 h στους 121 °C. Μετά την αποστείρωση πραγματοποιήθηκε φιλτράρισμα των διαλυμάτων υπό κενό με χρήση προζυγισμένων διηθητικών ηθμών. Τα υπολείμματα στους ηθμούς τοποθετήθηκε στους 100 °C για ξήρανση. Αφού ξηραθούν και τοποθετηθούν σε προζυγισμένες κάψες πορσελάνης και ζυγιστούν, τοποθετήθηκαν σε φούρνο στους 575 °C για 8 h. Στη συνέχεια ζυγίστηκαν οι κάψες με την τέφρα ώστε να υπολογιστεί η μη διαλυτή λιγνίνη. Για τη μέτρηση της διαλυτής λιγνίνης τα διηθήματα αραιώθηκαν με 4% H₂SO₄ έτσι ώστε να δίνουν απορρόφηση μεταξύ 0,7-1 κατά την φωτομέτρησή τους στα 320 nm (UV περιοχή). Τα διηθήματα συλλέχτηκαν σε ποτήρια ζέσεως και εν συνεχεία εξουδετερώθηκαν με CaCO₃ μέχρι το pH να είναι μεταξύ 5-6. Τα ποτήρια ζέσεως στη συνέχεια έμειναν ώστε να κατακαθίσει το ίζημα και συλλέχτηκε το υπερκείμενο υγρό. Σε αυτό, μετά από φυγοκέντριση, μετρήθηκε η γλυκόζη με το διάλυμα GOD/PAP και τα αναγωγικά σάκχαρα με τη μέθοδο DNS, ώστε να υπολογιστεί η κυτταρίνη και η ημικυτταρίνη του αρχικού υλικού (Sluiter et al., 2012).

2.2.5. Ενζυμική υδρόλυση

Ενζυμική υδρόλυση πραγματοποιήθηκε 2 φορές στο υλικό με το ενζυμικό σκεύασμα CTec2. Μια φορά για να διαπιστωθεί η βέλτιστη συγκέντρωση του ενζυμικού σκευάσματος για σταθερή μάζα δείγματος και μια φορά για να διαπιστωθεί η βέλτιστη ποσότητα του στερεού για σταθερή συγκέντρωση ενζυμικού σκευάσματος. Οι διαφορετικές συγκεντρώσεις που εξετάστηκαν είναι 3, 6, 9, 12 και 15 mg_{ενζ}/g_{δειγ}, και τα διαφορετικά ποσοστά στερεού είναι 6%, 8%, 10% και 12% w/v. Για τον προσδιορισμό της βέλτιστης συγκέντρωσης ενζύμου σκευάσματος τοποθετήθηκαν 0,5 g δείγματος σε κωνικές φιάλες των 50 mL και στην κάθε μια προστέθηκαν 5 mL διαφορετικής συγκέντρωσης (οι αραιώσεις του ενζύμου σκευάσματος πραγματοποιήθηκαν με ρυθμιστικό διάλυμα κιτρικού φωσφοτικού, pH=5, με αζίδιο, για αποφυγή μικροβιακών μολύνσεων). Οι κωνικές τοποθετήθηκαν σε επωαστήρες στους 50 °C με ανάδευση 180 rpm. Στη συνέχεια δείγμα παραλαμβάνονταν στις 2, 4, 6, 8, 24, 48 και 72 h για να μετρηθούν τα σάκχαρα και η γλυκόζη που παράχθηκαν.

2.2.6. Αλκοολική ζύμωση

Η αλκοολική ζύμωση των δειγμάτων πραγματοποιήθηκε με τη χρήση του μικροοργανισμού *S. cerevisiae*. Η διαδικασία που ακολουθήθηκε ήταν η ταυτόχρονη σακχαροποίηση και ζύμωση (SSF). Σε κωνικές φιάλες των 50 mL τοποθετήθηκαν 1,5 g δείγματος και 15 mL ενζυμικού σκευάσματος (ΕΣ) συγκέντρωσης 9 mg_{ενζ}/g_{δειγ} και οι κωνικές εισάχθηκαν σε επωαστήρα στους 50 °C, με ανάδευση 180 rpm, ώστε να γίνει προϋδρόλυση του δείγματος για 12 h. Μετά το πέρας των 12 h λήφθηκαν δείγματα για να μετρηθεί η παραγόμενη γλυκόζη και τα αναγωγικά σάκχαρα (GOD/PAP και DNS) και προστέθηκε σε κάθε φιάλη ο μικροοργανισμός σε συγκέντρωση 1,5 mg_{μικρ}/g_{δειγ}, άρα 22,5 mg μικροοργανισμού. Οι φιάλες επανατοποθετήθηκαν στον επωαστήρα στους 35 °C με ανάδευση 80 rpm για 120 h. Δείγματα λήφθηκαν στις 8, 24, 48, 72, 96, 120 h, για να μετρηθεί η γλυκόζη (GOD/PAP) αλλά και η

αιθανόλη με υγρή χρωματογραφία υψηλής απόδοσης (HPLC). Και στα τρία δείγματα στελεχών αραβοσίτου (προκατεργασία σε 8.5, 20, 40 bar) πραγματοποιήθηκε η αλκοολική ζύμωση που περιγράφεται ώστε να επιλεγεί το αποδοτικότερο για ζύμωση με προϋδρόλυση σε αναμεικτάρια ελεύθερης πτώσης και υψηλό ποσοστό στερεών.

2.2.7. Αλκοολική ζύμωση με χρήση αναμεικτάρια ελεύθερης πτώσης για την προϋδρόλυση

Ο αναμεικτάρια ελεύθερης πτώσης αποτελείται από 2, κάθετα τοποθετημένους, κυλινδρικούς θαλάμους πλάτους 6 cm και ακτίνας 25 cm. Οι θάλαμοι αυτοί περιέχουν από ένα πτερύγιο το οποίο περιστρέφεται με ταχύτητα 7 rpm και αλλάζει φορά κάθε 2 min για αποτελεσματικότερη ανάδευση. Η θερμοκρασία μέσα σε αυτούς του θαλάμου διατηρείται στους 50 °C , δηλαδή την βέλτιστη θερμοκρασία για τη δράση του (ΕΣ). Λόγω του μεγαλύτερου χώρου αλλά και της ανάδευσης το ενζυμικό σκεύασμα έχει τη δυνατότητα να υδρολύσει περισσότερο το στερεό οπότε προστίθενται 9 mg_{enz}/g_{δειγ} αυτού στο δείγμα που υπέστη προκατεργασία με 40 bar, σε ποσοστό στερεού 25% w/v. Έτσι πραγματοποιήθηκε υδρόλυση στον αναμεικτάρια ελεύθερης πτώσης και λήφθηκαν δείγματα στις 2, 4, 6, 8 και 12 h ώστε να μετρηθεί το ιξώδες. Στα προϋδρολύματα των 6 και 12 h πραγματοποιήθηκε αλκοολική ζύμωση με τον ίδιο τρόπο που έγινε και προηγουμένως (2.2.6.).

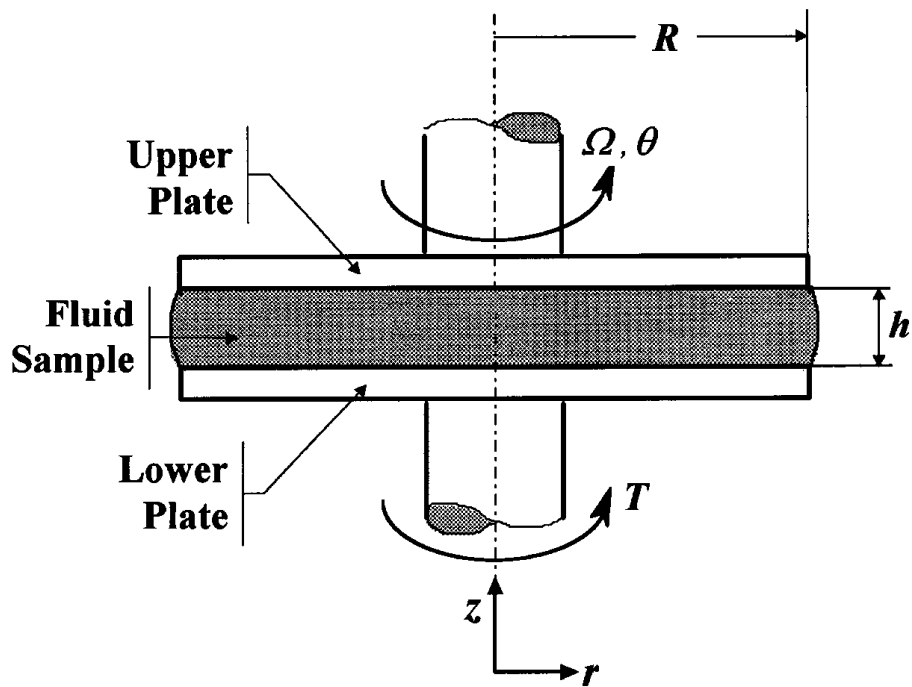
2.2.8. Μέτρηση ιξώδους

Η βασική αρχή όλων των τύπων ιξωδομετρίας είναι να προκαλέσουν μια απλή ροή στο δείγμα, μίας μόνο διάστασης, ώστε να βρεθεί ο ρυθμός μεταβολής της διατμητικής τάσης. Η ροή πρέπει να είναι μίας διάστασης για να μπορέσουν να υπολογιστούν με ακρίβεια ο ρυθμός παραμόρφωσης και η διατμητική τάση. Σε κάθε περίπτωση μετριέται η αντίσταση του ρευστού, σε αυτή τη ροή, μέσω της πτώσης πίεσης ή της ροπής που μετριέται από το όργανο (R.A. Secco, J.R. deBruyn, 2013).

Στη συγκεκριμένη περίπτωση μετρήθηκε το ιξώδες με χρήση ιξωδομέτρου παράλληλων πλακών. Το δείγμα τοποθετείται σε μια πλάκα και στη συνέχεια μια άλλη πλάκα από πάνω από το δείγμα εφάπτεται σε αυτό (εικόνα 14). Η πάνω πλάκα κινείται με μια γωνιακή ταχύτητα ω και ο ρυθμός μεταβολής της διατμητικής τάσης υπολογίζεται από τον τύπο:

$$\gamma'(r) = \frac{r\omega}{h}$$

όπου γ' : ρυθμός μεταβολής της διατμητικής τάσης, r : ακτίνα, ω : γωνιακή ταχύτητα και h : ύψος δείγματος ανάμεσα στις πλάκες (Leblanc, 1999).



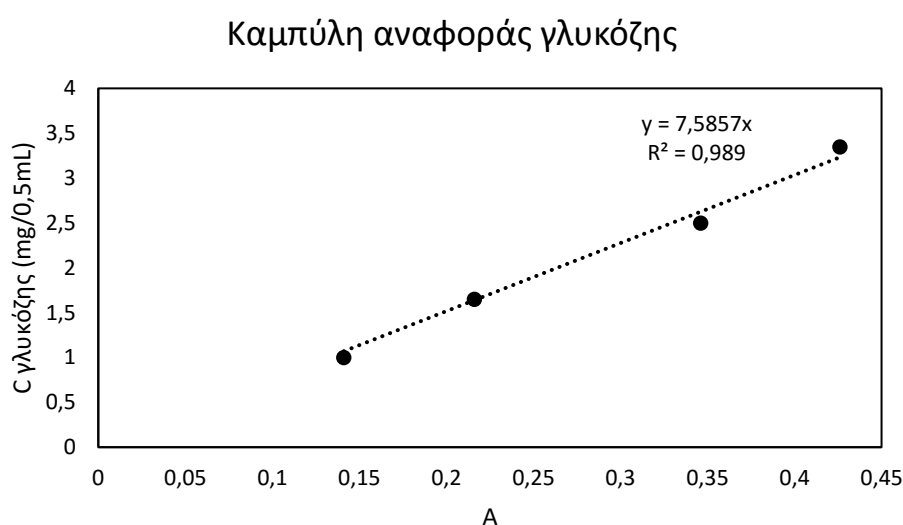
Εικόνα 14 Σχηματική παρουσίαση της ιξωδομετρίας παράλληλων πλακών

Στη συγκεκριμένη περίπτωση, μετρήθηκε το ιξώδες στα δείγματα που λήφθηκαν από την προϋδρόλυση των στελεχών αραβοσίτου στον αναμεικτήρα ελεύθερης πτώσεως. Τα δείγματα που μετρήθηκαν λήφθηκαν στις 0, 2, 6 και 12 h. Οι μετρήσεις λήφθηκαν στους 26 °C, με γωνιακή ταχύτητα ω από 10 έως 100 rad/s με βήμα 10 rad/s και ασκούμενη δύναμη από τις πλάκες ρυθμισμένη στο 0 N (Katsimpouras, Christakopoulos, & Topakas, 2016).

3. Αποτελέσματα

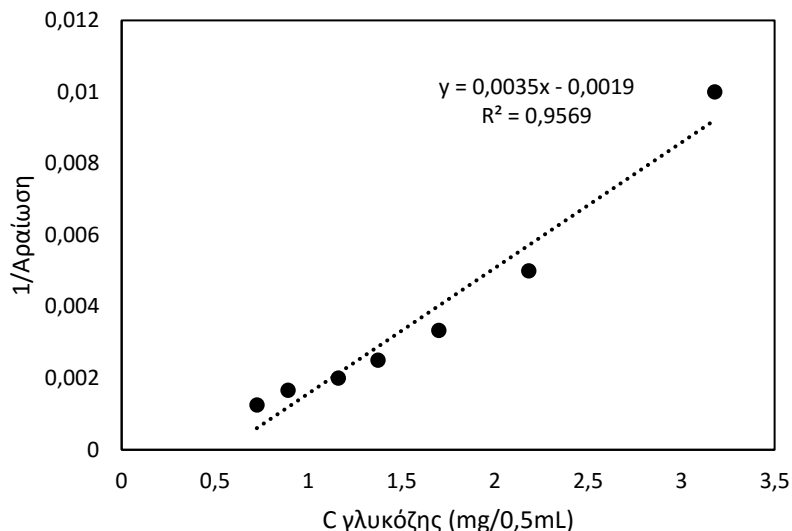
3.1. Μέτρηση ενζυμικής ενεργότητας κυτταρίνης

Μετρήθηκε η ενεργότητα του ενζυμικού σκευάσματος Cellic CTec2 σε FPU/mL διαλύματος, με χρήση της μεθόδου των Adney & Nrel, 2008. Για τον υπολογισμό των FPU (filter paper units) πρέπει να βρεθεί η κατάλληλη αραιώση στο ενζυμικό σκεύασμα ώστε να παραχθούν 2 mg γλυκόζης κατά την υδρόλυση 50 mg διηθητικού χαρτιού για 60 min. Για τον υπολογισμό της γλυκόζης κατασκευάστηκε μια καμπύλη αναφοράς με πρότυπα γλυκόζης τα οποία ακολούθησαν την ίδια διαδικασία της ενεργότητας κυτταρίνης. Το διάγραμμα της καμπύλης αναφοράς φαίνεται παρακάτω.



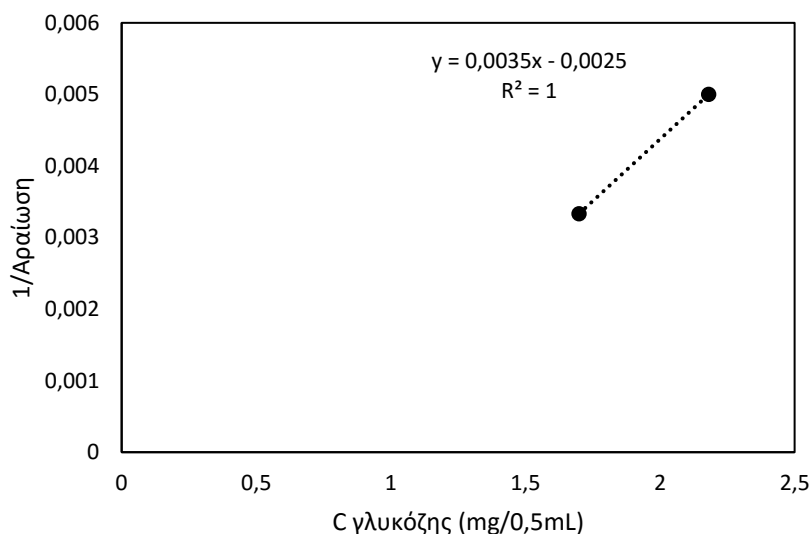
Διάγραμμα 3 Καμπύλη αναφοράς γλυκόζης

Για να βρεθεί η κατάλληλη αραιώση του ενζυμικού σκευάσματος Cellic CTec2 πραγματοποιήθηκαν πολλές αραιώσεις ώστε να βρεθεί μια αραιώση που παράγει λίγο περισσότερο από 2 mg γλυκόζης και μία που παράγει λίγο λιγότερο. Η διαδικασία αυτή φαίνεται στα παρακάτω διαγράμματα.



Διάγραμμα 4 Συγκέντρωση γλυκόζης στα δείγματα ως προς 1/αραίωση του ενζυμικού σκευάσματος Cellic Ctec2

Όπως φαίνεται στο παραπάνω διάγραμμα οι αραιώσεις του ενζύμου που βρίσκονται πιο κοντά στην παραγωγή 2 mg γλυκόζης είναι οι 1/200 (2,18 mg γλυκόζης) και η 1/300 (1,70 mg γλυκόζης). Έτσι από την εξίσωση της ευθείας που ενώνει τα δύο αυτά σημεία βρίσκεται η κατάλληλη αραιώση.



Διάγραμμα 5 Συγκέντρωση γλυκόζης στα δείγματα ως προς 1/αραίωση του ενζυμικού σκευάσματος Cellic Ctec2 για τις δύο αραιώσεις που βρίσκονται πιο κοντά στην παραγωγή 2 mg γλυκόζης

Έτσι από την εξίσωση της παραπάνω ευθείας βρίσκεται η επιθυμητή αραιώση:

$$\frac{1}{\text{Αραίωση}} = 0,0035 \cdot C_{\text{γλυκ}} - 0,0025 \Rightarrow \frac{1}{\text{Αραίωση}} = 0,0035 \cdot 2 - 0,0025 \Rightarrow$$

$$\frac{1}{\text{Αραίωση}} = 0,004374 \Rightarrow \text{Αραίωση} = 228,6$$

Ο υπολογισμός των FPU/mL γίνεται με χρήση της εξίσωσης:

$$\text{Filter Paper Activity} = \frac{0.37}{1/(\text{Αραιώση ενζύμου που παράγει } 2\text{mg γλυκόζης})} = 85 \text{ FPU/mL}$$

Επίσης υπολογίστηκε και η συγκέντρωση του ενζυμικού σκευάσματος και στη συνέχεια τα FPU/g αυτού. Για τον υπολογισμό της συγκέντρωσης χρησιμοποιήθηκε η μέθοδος Bradford. Έτσι η συγκέντρωση του Cellic CTec2 βρέθηκε 89,66 mg/mL. Έτσι με απλή διαίρεση μπορούν να βρεθούν τα FPU/mg_{ενζ}. Οπότε για το Cellic CTec2 έχουμε 0,948 FPU/mg.

Σε παλαιότερες μετρήσεις ενεργότητας του ενζυμικού σκευάσματος Cellic CTec2 βρέθηκαν μεγαλύτερες τιμές FPU/mL. Για παράδειγμα οι McIntosh, Vancov, Palmer, & Spain, 2012 μέτρησαν ενεργότητα για το Cellic CTec2 132 FPU/mL και οι Reye, Lu, Maxwell, & Banerjee, 2011 μέτρησαν 119 FPU/mL. Αυτές οι ενεργότητες είναι αρκετά μεγαλύτερες από την ενεργότητα που μετρήθηκε στην συγκεκριμένη εργασία (85 FPU/mL). Όμως τα FPU/mL ενζυμικού σκευάσματος εξαρτώνται άμεσα από την συγκέντρωση αυτού η οποία μπορεί να διαφέρει στα πειράματα που διεξάγονται με το ίδιο εμπορικό προϊόν αλλά διαφορετική παρτίδα. Κάποιοι από τους λόγους διαφορετικής συγκέντρωσης είναι ο διαφορετικός χρόνος παραμονής του ενζύμου στο εργαστήριο οι διαφορετικές συνθήκες φύλαξης και άλλα. Έτσι είναι αντικειμενικότερη η μέτρηση ενεργότητας σε FPU ανά mg ενζυμικού σκευάσματος.

Στους παρακάτω πίνακες συνοψίζονται τα μεγέθη του ενζυμικού σκευάσματος που υπολογίστηκαν προηγουμένως (πίνακας 11) και γίνεται σύγκριση ενεργότητας του Cellic CTec2 αυτής της εργασίας με μια άλλη (πίνακας 12):

Πίνακας 12 Ενεργότητα και συγκέντρωση Cellic CTec2

Ενζυμικό σκεύασμα	FPU/mL ενζύμου	Συγκέντρωση (g/L)	FPU/mg ενζύμου
Cellic CTec2	85	90	0,948

Πίνακας 13 Σύγκριση ενεργότητας Cellic CTec2 παρούσας εργασίας με μια άλλη

Εργασίες	FPU/mL ενζύμου	Συγκέντρωση (g/L)	FPU/mg ενζύμου
McIntosh et al., 2012	132	160	0,83
Παρούσα	85	90	0,95

Παρατηρείται ότι παρότι η ενεργότητα σε FPU/mL ενζυμικού σκευάσματος είναι σχετικά μικρότερη σε σχέση με άλλες εργασίες, η ενεργότητα σε FPU/mg ενζυμικού σκευάσματος είναι λίγο μεγαλύτερη σε σχέση με αυτή των McIntosh et al., 2012.

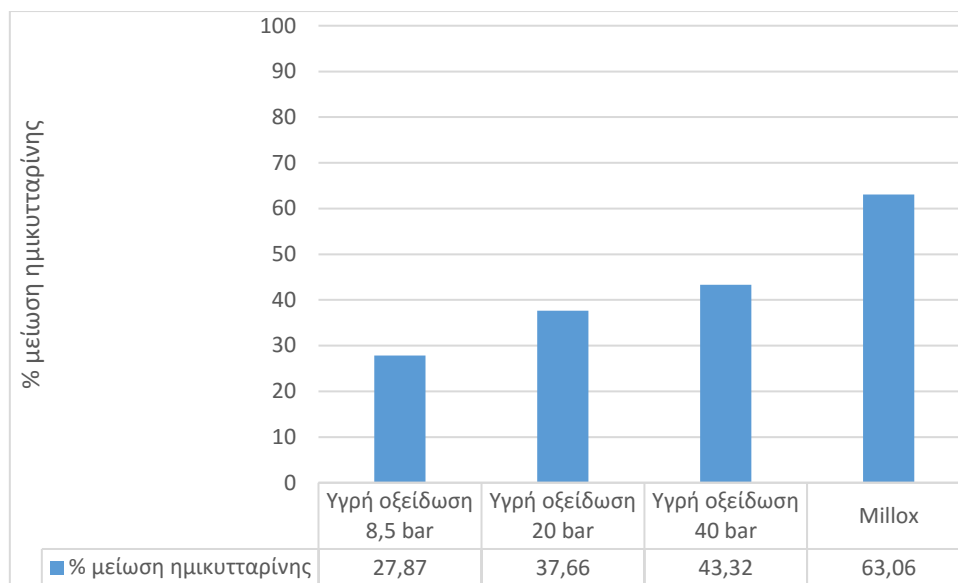
3.2. Ανάλυση σύστασης των προκατεργασμένων στελεχών αραβοσίτου

Η ανάλυση σύστασης πραγματοποιήθηκε για να διαπιστωθεί πόσο αποδοτική ήταν η κάθε προκατεργασία ως προς την μείωση της ημικυτταρίνης και της λιγνίνης και ως συνέπεια την αύξηση της ποσοστιαίας κυτταρίνης στην βιομάζα. Στον παρακάτω πίνακα φαίνονται η % σύσταση των υλικών με διαφορετικές προκατεργασίες.

Πίνακας 14 % Σύσταση της λιγνινοκυτταρινούχου βιομάζας (στελέχη αραβοσίτου) για το ακατέργαστο υλικό και τις διάφορες προκατεργασίες

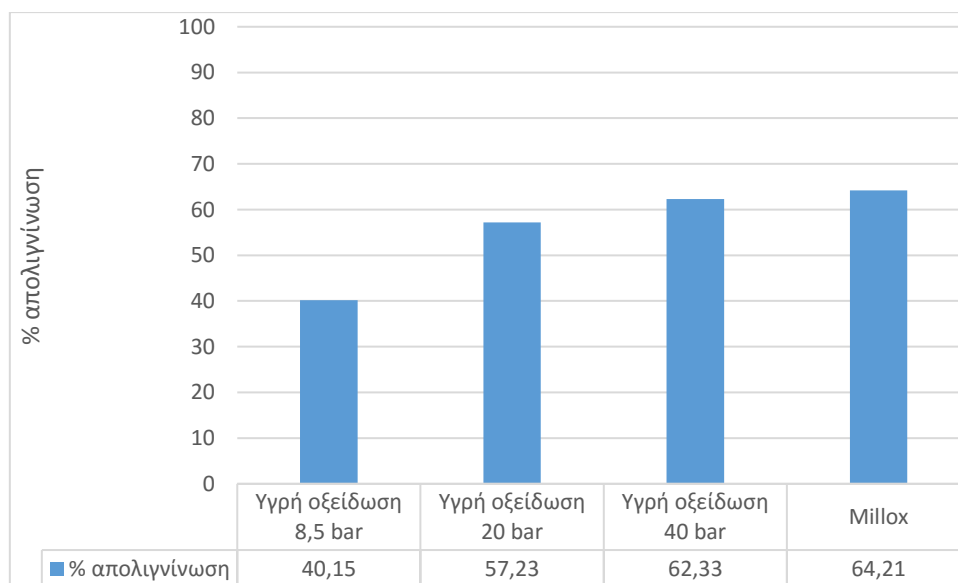
Στελέχη αραβοσίτου	Κυτταρίνη	Ημικυτταρίνη	Διαλυτή σε οξύ λιγνίνη	Αδιάλυτη λιγνίνη	Λιγνίνη	Συνολικά
Ακατέργαστη βιομάζα	38,8	23,5			20,2	82,5
Υγρή οξείδωση 8,5 bar	66,78	16,95	1,48	10,61	12,09	95,82
Υγρή οξείδωση 20 bar	71,41	14,65	1,32	7,32	8,64	94,7
Υγρή οξείδωση 40 bar	74,63	13,32	1,29	6,32	7,61	95,56
Milox	70,08	8,68	1,33	5,9	7,23	85,99

Παρατηρείται ότι η προκατεργασία Milox είναι η πιο αποτελεσματική προκατεργασία στην απομάκρυνση ημικυτταρίνης και λιγνίνης. Όμως υπάρχουν και άλλοι παράγοντες αξιολόγησης μιας προκατεργασίας όπως η παραγωγή παρεμποδιστών της ζύμωσης και της υδρόλυσης, αλλά και το κόστος και οι περιβαλλοντικές επιπτώσεις. Στα παρακάτω διαγράμματα φαίνεται η επί τις % μείωση της ημικυτταρίνης και της λιγνίνης αλλά και η συνεπαγόμενη επί τις % αύξηση της κυτταρίνης.



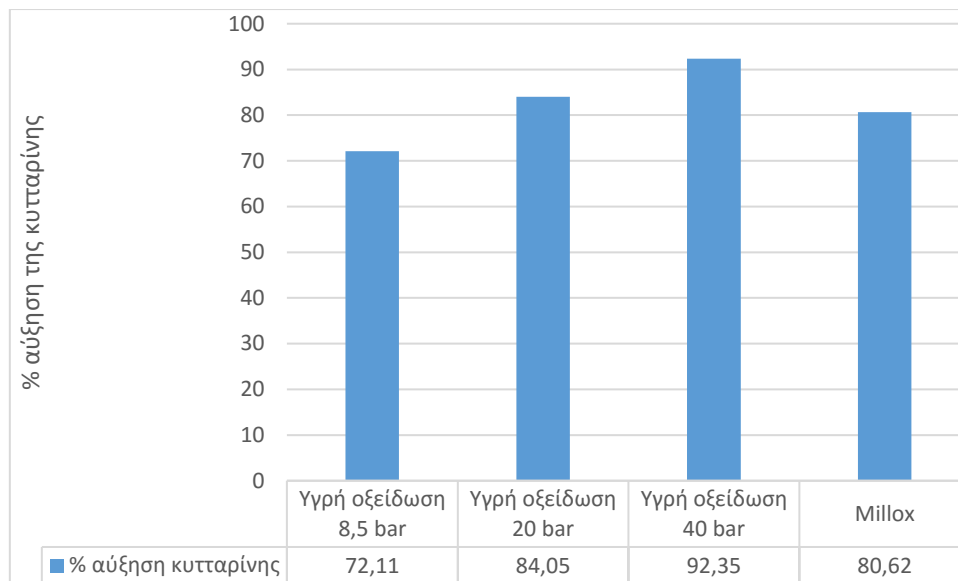
Διάγραμμα 6 %μείωση ημικυτταρίνης κατά τις 4 προκατεργασίες

Παρατηρείται ότι η ποσοστιαία μείωση της ημικυτταρίνης είναι αρκετά μεγαλύτερη κατά την προκατεργασία Millox. Στην υγρή οξείδωση όσο αυξάνεται η πίεση μειώνεται η ημικυτταρίνη.



Διάγραμμα 7 %απολιγνίνωση κατά τις 4 προκατεργασίες

Ομοίως αποτελεσματικότερη διεργασία για απολιγνίνωση είναι η Millox αλλά η διαφορά της αυτή τη φορά είναι μικρή σε σχέση με τις υπόλοιπες προκατεργασίες, όπως φαίνεται και στο παραπάνω διάγραμμα. Όπως και στην απομάκρυνση της ημικυτταρίνης, κατά την υγρή οξείδωση με αύξηση της πίεσης απομακρύνεται περισσότερο λιγνίνη.

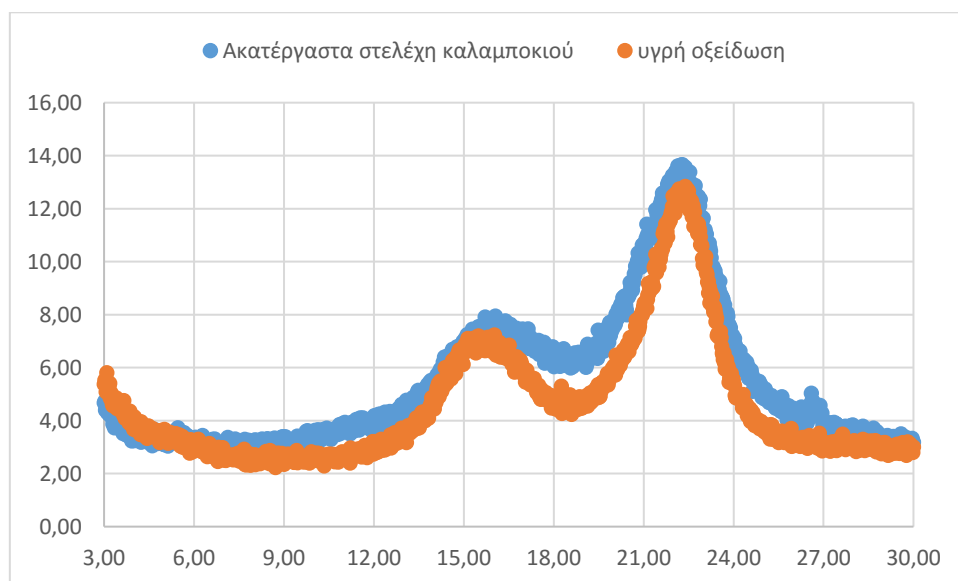


Διάγραμμα 8 %αύξηση της κυτταρίνης στις 4 προκατεργασίες

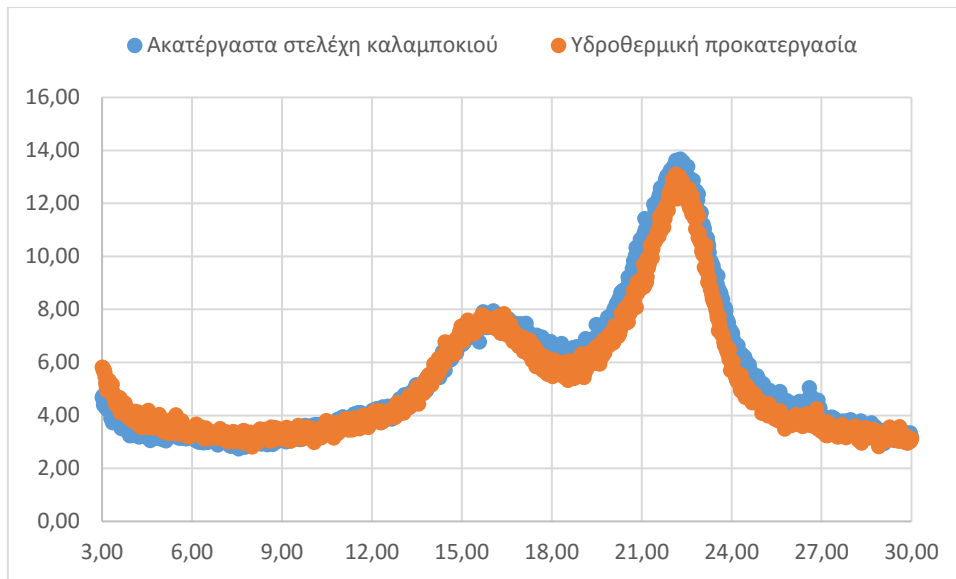
Στην ποσοστιαία αύξηση της κυτταρίνης υπερτερεί η υγρή οξείδωση στα 40 bar. Παρόλο που η μείωση της ημικυτταρίνης και της λιγνίνης ήταν μεγαλύτερη στην προκατεργασία Millox, η ποσοστιαία αύξηση της κυτταρίνης δεν είναι μεγαλύτερη. Αυτό μπορεί να οφείλεται σε πολλά υποπροϊόντα που παράγονται κατά την συγκεκριμένη προκατεργασία.

3.2.1. Υπολογισμός κρυσταλλικής κυτταρίνης με XRD

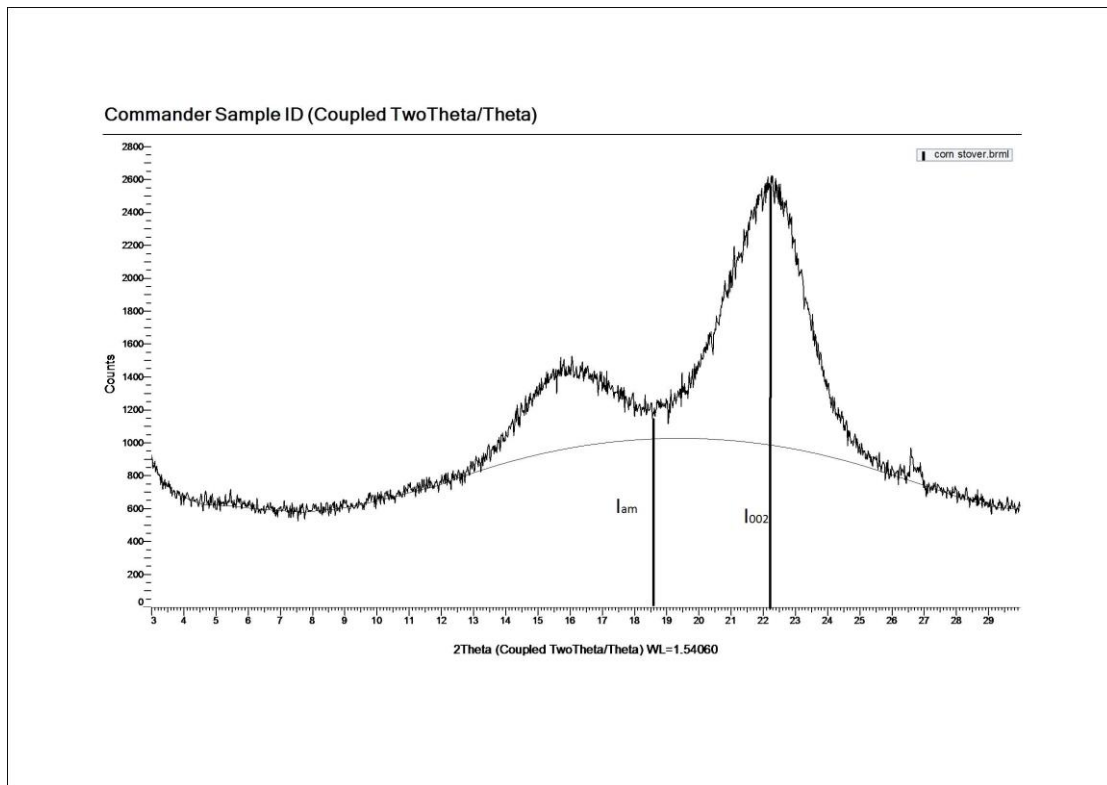
Μετρήθηκε η ποσότητα της κρυσταλλικής κυτταρίνης με το όργανο περίθλασης ακτίνων Χ (XRD) σε δείγμα ακατέργαστων στελεχών αραβοσίτου, προκατεργασμένων στελεχών με υγρή οξείδωση και προκατεργασμένων στελεχών με υδροθερμική προκατεργασία, για να φανεί η διαφορά στην κρυσταλλική κυτταρίνη. Στο παρακάτω διάγραμμα φαίνεται η καμπύλη του οργάνου XRD για τα διαφορετικά δείγματα.



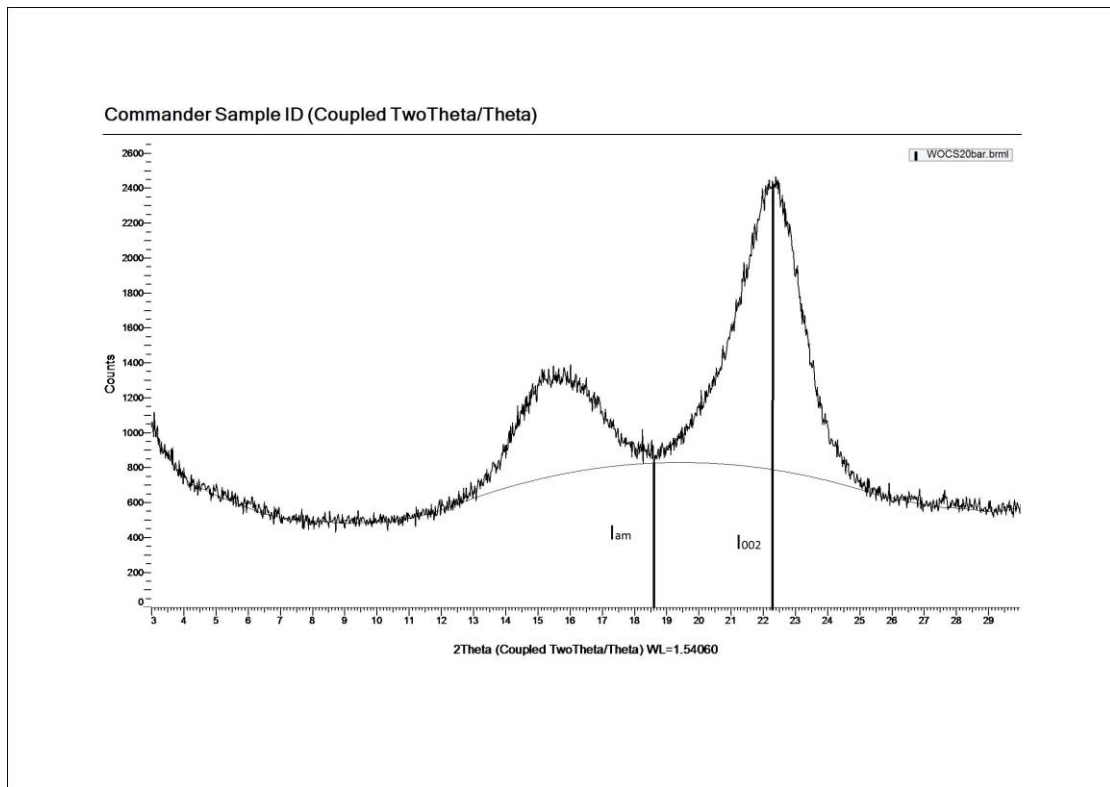
Διάγραμμα 9 Καμπύλη του οργάνου XRD για την ακατέργαστη και προκατεργασμένη με υγρή οξείδωση βιομάζα



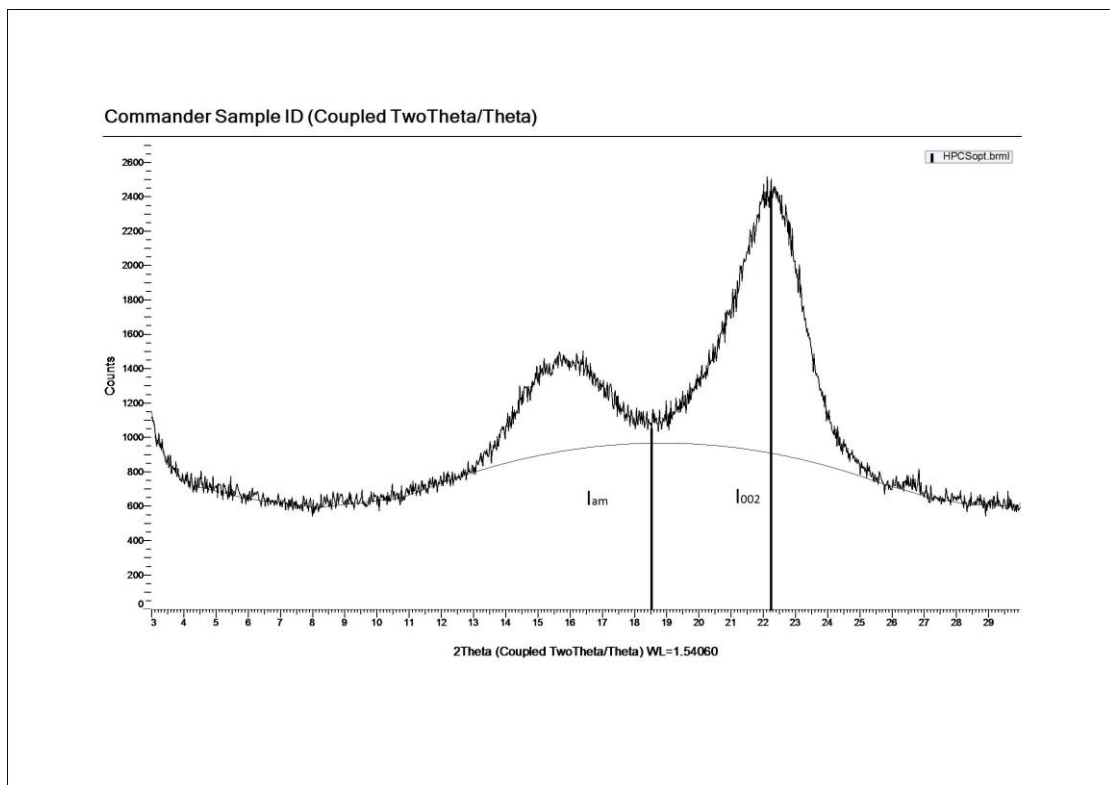
Διάγραμμα 10 Καμπύλη του οργάνου XRD για την ακατέργαστη και προκατεργασμένη με υδροθερμική προκατεργασία βιομάζα



Διάγραμμα 11 Καμπύλη του οργάνου XRD για τα ακατέργαστα στελέχη αραβοσίτου



Διάγραμμα 12 Καμπύλη του οργάνου XRD για τα προκατεργασμένα με υγρή οξείδωση στελέχη αραβοσίτου



Διάγραμμα 13 Καμπύλη του οργάνου XRD για τα προκατεργασμένα με υδροθερμική προκατεργασία στελέχη αραβοσίτου

Τα βασικά χαρακτηριστικά των παραπάνω διαγραμμάτων είναι η γωνία στην οποία βρίσκεται η κορυφή κάθε καμπύλης, η οποία είναι και χαρακτηριστική για την κάθε κρυσταλλική ένωση

(περίπου 22° για την κυτταρίνη), το ύψος της κορυφής (I_{002}) και της κοιλάδας (I_{am}) και ο δείκτης κρυσταλλικότητας (CI). Στον παρακάτω πίνακα φαίνονται τα βασικά αυτά χαρακτηριστικά για τα 3 δείγματα.

Πίνακας 15 Βασικά χαρακτηριστικά του διαγράμματος 7

Υλικό	Κορυφή		Κοιλάδα		Δείκτης κρυσταλλικότητας
	Μοίρες	Ύψος	Μοίρες	Ύψος	%
Ακατέργαστο	22,39	13,67	18,60	5,99	56,17
Υγρή οξείδωση	22,29	12,84	18,56	4,24	66,95
Υδροθερμική	22,12	13,10	18,53	5,33	59,32

Ο δείκτης κρυσταλλικότητας των προκατεργασμένων δειγματος είναι μεγαλύτερος από αυτόν του ακατέργαστου. Όσο πιο κρυσταλλική είναι η κυτταρίνη τόσο δυσκολότερο για το ενζυμικό σκεύασμα να την υδρολύσει οπότε κατά την προκατεργασία στόχος είναι η μείωση και όχι η αύξηση της κρυσταλλικότητας. Αυτή η αύξηση οφείλεται στην υδρόλυση των άμορφων περιοχών της κυτταρίνης κατά την προκατεργασία με αποτέλεσμα να αυξάνεται το ποσοστό της κρυσταλλικής κυτταρίνης (S. Park, Baker, Himmel, Parilla, & Johnson, 2010). Ο δείκτης κρυσταλλικότητας υπολογίζεται από τον παρακάτω τύπο: (Segal, Creely, Martin, & Conrad, 1962)

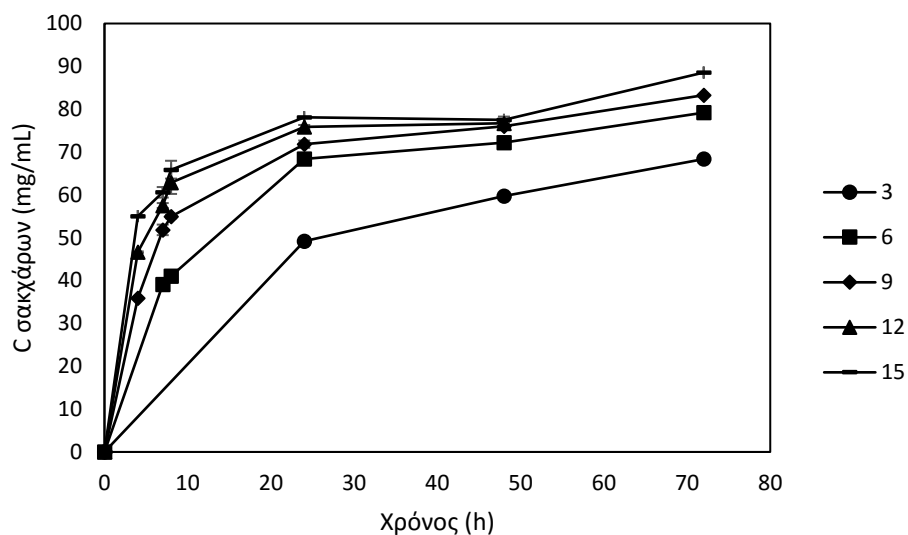
$$CI = \frac{I_{002} - I_{am}}{I_{002}} \times 100$$

Όμως η αύξηση του δείκτη κρυσταλλικότητας δεν οφείλεται απαραίτητα στην αύξηση της κρυσταλλικότητας της κυτταρίνης μετά την προκατεργασία, αλλά μπορεί να οφείλεται και στη μείωση της ημικυτταρίνης ή και της λιγνίνης. Η ημικυτταρίνη και η λιγνίνη αποτελούνται από άμορφες περιοχές οπότε κατά τη μέτρηση στο XRD της ακατέργαστης και της προκατεργασμένης βιομάζας μπορεί ο δείκτης κρυσταλλικότητας να είναι μεγαλύτερος στην κατεργασμένη βιομάζα γιατί οι άμορφες ουσίες έχουν μειωθεί (T. H. Kim, Kim, Sunwoo, & Lee, 2003).

3.3. Ενζυμική υδρόλυση

Ενζυμική υδρόλυση των δειγμάτων αραβοσίτου πραγματοποιήθηκε για την εύρεση της κατάλληλης ποσότητας ενζυμικού σκευάσματος που χρησιμοποιήθηκε αργότερα στη ζύμωση. Από τα προκατεργασμένα στελέχη αραβοσίτου επιλέχτηκε το δείγμα που υπέστη προκατεργασία σε πίεση 40 bar για να βρεθεί η κατάλληλη συγκέντρωση ενζυμικού σκευάσματος και στα υπόλοιπα πραγματοποιήθηκε υδρόλυση με την συγκέντρωση αυτή για λόγους σύγκρισης.

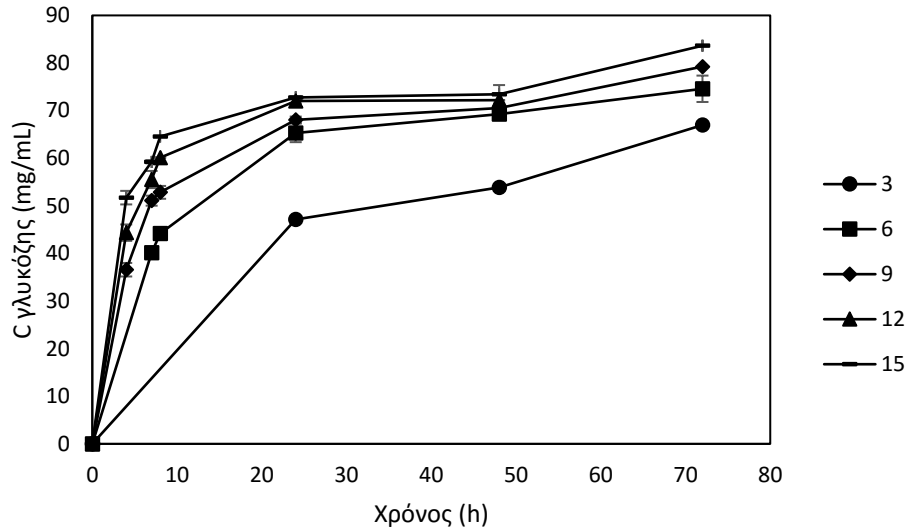
Στα παρακάτω διαγράμματα φαίνονται τα αποτελέσματα των συγκεντρώσεων σακχάρων (DNS) και γλυκόζης (GOD/PAP) από τις ενζυμικές υδρολύσεις των στελεχών αραβοσίτου (40 bar) για διαφορετικές συγκεντρώσεις ενζυμικού σκευάσματος (enzyme loading, οι συγκεντρώσεις μετριοούνται σε mg/g ξηρής βιομάζας (Ξ.Β.)).



Διάγραμμα 14 Συγκέντρωση σακχάρων ως προς το χρόνο μετά από ενζυμική υδρόλυση των στελεχών αραβοσίτου (enzyme loading)

Πίνακας 16 Παραγωγή ολικών αναγωγικών σακχάρων κατά την ενζυμική υδρόλυση των προκατεργασμένων στελεχών αραβοσίτου με υγρή οξείδωση σε 40 bar. (όπου έχει κενά κελιά δεν λήφθηκαν τα αντίστοιχα δείγματα)

Ώρες	3 mg/g	6 mg/g	9 mg/g	12 mg/g	15 mg/g
4	-	-	35,92 ± 0,28	46,62 ± 0,09	55,05 ± 0,47
7	-	39,13 ± 0,47	51,84 ± 0,09	57,53 ± 0,19	60,60 ± 0,19
8	-	41,07 ± 0,00	54,92 ± 1,23	62,88 ± 0,57	65,89 ± 1,23
24	49,23 ± 0,00	68,36 ± 1,32	71,84 ± 0,38	75,85 ± 2,65	78,13 ± 2,08
48	59,73 ± 0,09	72,24 ± 1,32	76,05 ± 0,85	76,72 ± 0,47	77,53 ± 0,09
72	68,36 ± 0,76	79,20 ± 0,95	83,28 ± 0,85		88,56 ± 0,76

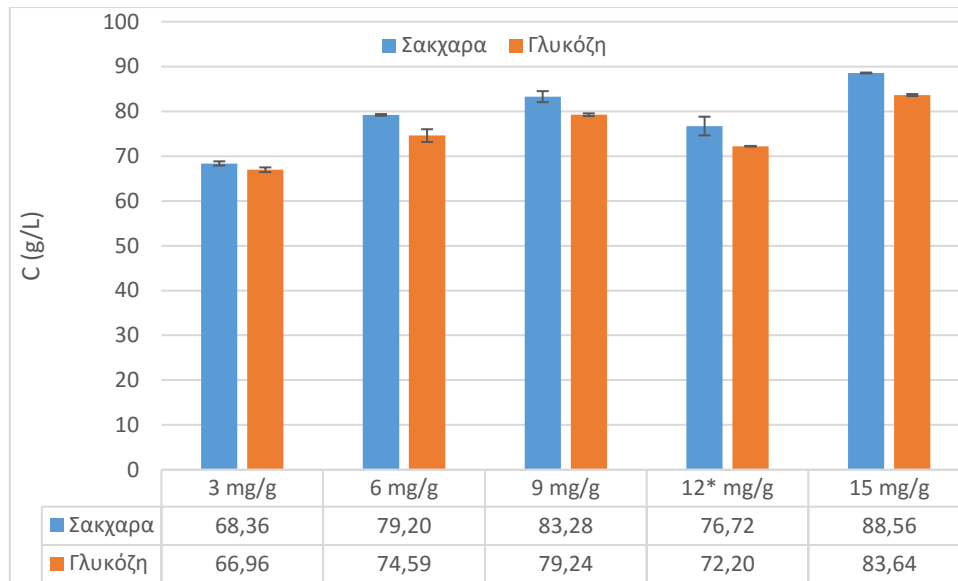


Διάγραμμα 15 Συγκέντρωση γλυκόζης ως προς το χρόνο μετά από ενζυμική υδρόλυση των στελεχών αραβοσίτου (enzyme loading)

Πίνακας 17 Παραγωγή γλυκόζης κατά την ενζυμική υδρόλυση των προκατεργασμένων στελεχών αραβοσίτου με γρήγη οξείδωση σε 40 bar. (όπου έχει κενά κελιά δεν λήφθηκαν τα αντίστοιχα δείγματα)

Ώρες	3 mg/g	6 mg/g	9 mg/g	12 mg/g	15 mg/g
4	-	-	36,58 ± 1,42	44,36 ± 0,90	51,72 ± 0,52
7	-	40,12 ± 0,45	51,08 ± 1,42	55,53 ± 1,72	59,23 ± 1,42
8	-	44,20 ± 0,37	52,83 ± 1,05	60,13 ± 1,80	64,58 ± 0,30
24	47,17 ± 0,22	65,32 ± 1,95	68,07 ± 1,35	71,99 ± 0,00	72,79 ± 0,07
48	53,89 ± 0,00	69,29 ± 0,37	70,56 ± 0,67	72,20 ± 0,45	73,42 ± 0,22
72	66,96 ± 1,57	74,59 ± 2,77	79,24 ± 0,22	--	83,64 ± 1,95

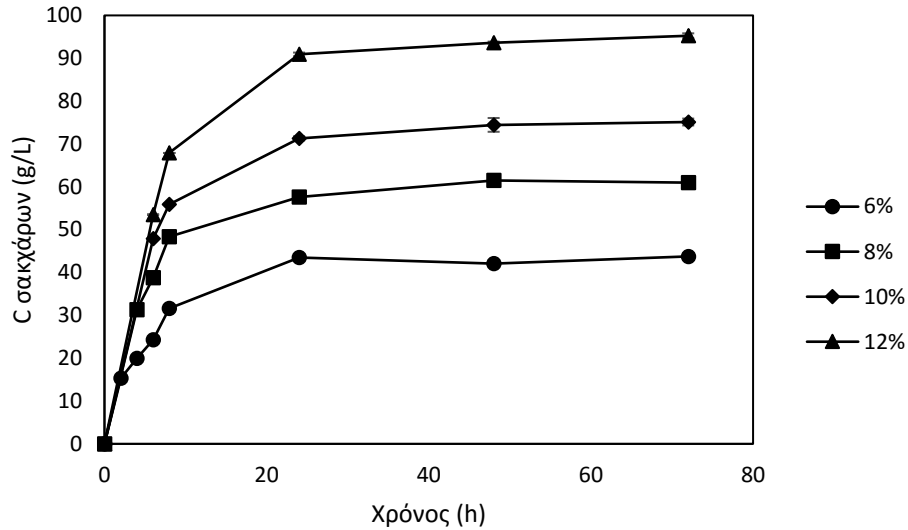
Στις 2 h ενώ θα έπρεπε να ληφθεί δείγμα δεν λήφθηκε γιατί η βιομάζα δεν είχε ρευστοποιηθεί επαρκώς. Για την συγκέντρωση ενζυμικού σκευάσματος (ΕΣ) 3 mg/g λήφθηκε πρώτο δείγμα στις 24 h, και για αυτή των 6 mg/g ΞΒ στις 7 h, εξαιτίας του ίδιου προβλήματος. Το τελευταίο δείγμα (72 h) των 12 mg/g δεν λήφθηκε.



Διάγραμμα 16 Ραβδόγραμμα σύγκρισης τελικών συγκεντρώσεων γλυκόζης και αναγωγικών σακχάρων (enzyme loading). *για τα 12 mg/g δεν είχε ληφθεί μέτρηση στις 72 h γι' αυτό χρησιμοποιήθηκε η μέτρηση των 48 h.

Από τα παραπάνω διαγράμματα παρατηρείται ότι η μικρότερη συγκέντρωση ΕΣ (3 mg/g) δεν είναι αρκετή σε σχέση με τις υπόλοιπες ώστε η υδρόλυση να φτάσει σε πλατό στις 72 h. Επίσης οι υπόλοιπες συγκεντρώσεις ΕΣ έχουν μικρή διαφορά (οι συγκεντρώσεις ΕΣ 6, 9 mg/g έχουν διαφορά περίπου 5,9% ενώ οι 9, 15 mg/g έχουν διαφορά περίπου 5,3%, με μεγαλύτερη πάντα παραγωγή γλυκόζης στη μεγαλύτερη συγκέντρωση ΕΣ) στην παραγωγή γλυκόζης, οπότε ως καταλληλότερη για την ζύμωση επιλέγεται η συγκέντρωση 9 mg/g έτσι ώστε να γίνει οικονομία στο ΕΣ. Η συγκέντρωση 6 mg/g δίνει αποτελέσματα παραπλήσια (5,9% λιγότερη γλυκόζη) με τα 9 mg/g, αλλά δεν επιλέγεται γιατί δεν είναι αρκετά αποτελεσματική στις 12 h (όπου είναι και ο χρόνος της μετέπειτα προϋδρόλυσης) αλλά και στη βιβλιογραφία συνήθως χρησιμοποιούνται μεγαλύτερες συγκεντρώσεις, οπότε θα ήταν ριψοκίνδυνη η χρήση της ενζυμικής συγκέντρωσης των 6 mg/g. Στο παραπάνω ραβδόγραμμα φαίνεται σε όλες τις διαφορετικές συγκεντρώσεις ενζύμου ότι η συγκέντρωση της γλυκόζης είναι μικρότερη αυτής των αναγωγικών σακχάρων. Αυτό είναι λογικό αφού και η γλυκόζη αποτελεί αναγωγικό σάκχαρο.

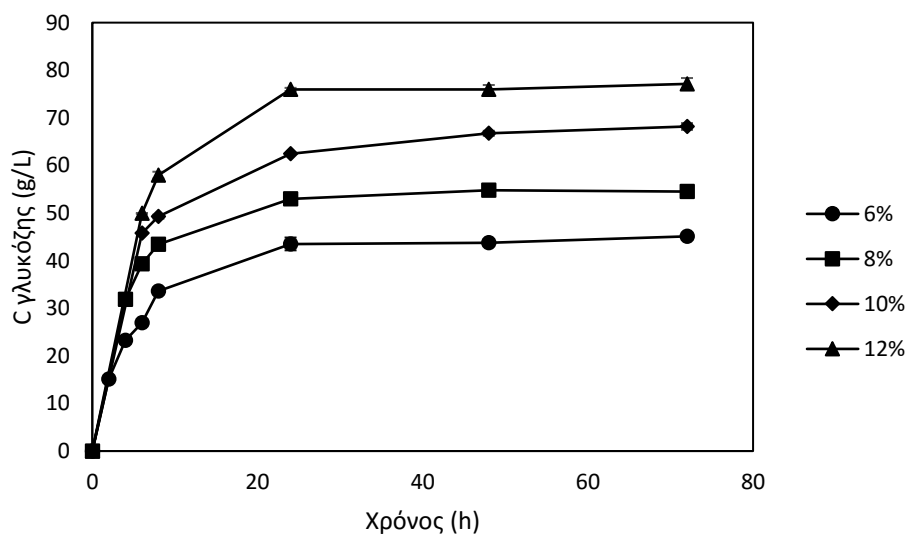
Στη συνέχεια ακολουθούν τα αντίστοιχα διαγράμματα ενζυμικής υδρόλυσης με σταθερή συγκέντρωση ΕΣ (9 mg/g ΞΒ) και διαφορετική περιεκτικότητα σε στερεά, ώστε να φανεί κατά πόσο αλλάζει η παραγωγή γλυκόζης αλλά και η ποσοστιαία μετατροπή της κυτταρίνης σε γλυκόζη.



Διάγραμμα 17 Συγκέντρωση σακχάρων ως προς το χρόνο μετά από ενζυμική υδρόλυση των στελεχών αραβοσίτου (διαφορετικά ποσοστά w/v στερεά)

Πίνακας 18 Παραγωγή ολικών αναγωγικών σακχάρων (g/L) κατά την ενζυμική υδρόλυση των προκατεργασμένων στελεχών αραβοσίτου με υγρή οξείδωση σε 40 bar

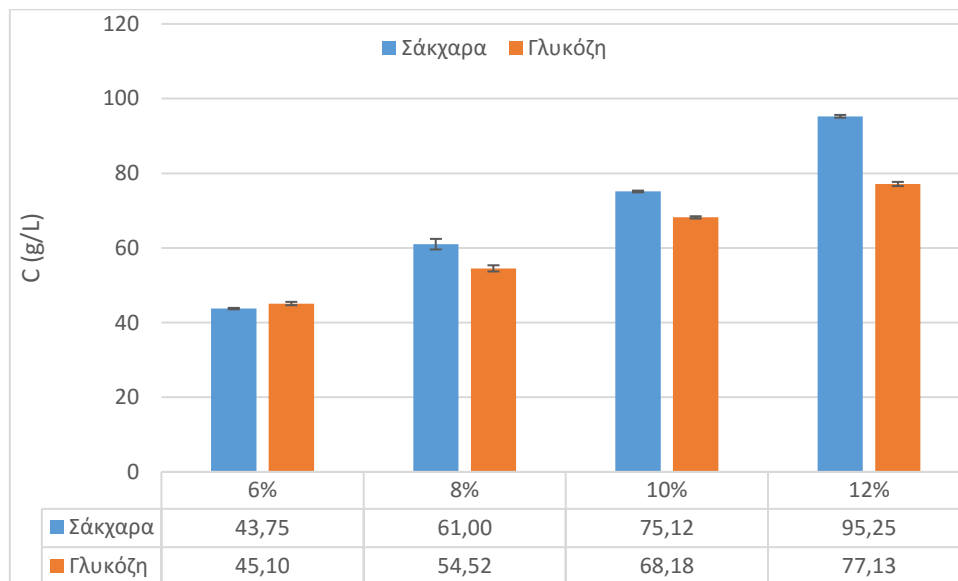
Ώρες	6	8	10	12
2	15,32 ± 0,19	-	-	-
4	19,93 ± 0,09	31,30 ± 0,00	-	-
6	24,28 ± 0,24	38,80 ± 0,00	47,89 ± 0,19	53,51 ± 0,00
8	31,64 ± 0,33	48,36 ± 0,99	55,92 ± 0,47	67,89 ± 0,43
24	43,48 ± 0,47	57,59 ± 0,24	71,30 ± 1,61	90,90 ± 0,24
48	42,07 ± 0,24	61,47 ± 1,28	74,45 ± 0,80	93,65 ± 0,57
72	43,75 ± 0,19	61,00 ± 1,42	75,12 ± 0,24	95,25 ± 0,38



Διάγραμμα 18 Συγκέντρωση γλυκόζης ως προς το χρόνο μετά από ενζυμική υδρόλυση των στελεχών αραβοσίτου (διαφορετικά ποσοστά w/v στερεά)

Πίνακας 19 Παραγωγή γλυκόζης (g/L) κατά την ενζυμική υδρόλυση των προκατεργασμένων στελεχών αραβοσίτου, με διαφορετικά ποσοστά στερεών, με υγρή οξείδωση σε 40 bar

Ώρες	6	8	10	12
2	15,11 ± 0,04	-	-	-
4	23,24 ± 0,26	31,87 ± 0,15	-	-
6	26,94 ± 0,04	39,33 ± 0,19	45,79 ± 0,41	49,92 ± 0,71
8	33,61 ± 0,11	43,41 ± 0,90	49,23 ± 0,07	57,96 ± 0,34
24	43,51 ± 0,15	52,99 ± 1,01	62,46 ± 0,52	75,96 ± 0,94
48	43,72 ± 1,35	54,79 ± 0,19	66,75 ± 0,71	75,96 ± 1,24
72	45,10 ± 0,45	54,52 ± 0,82	68,18 ± 0,30	77,13 ± 0,56



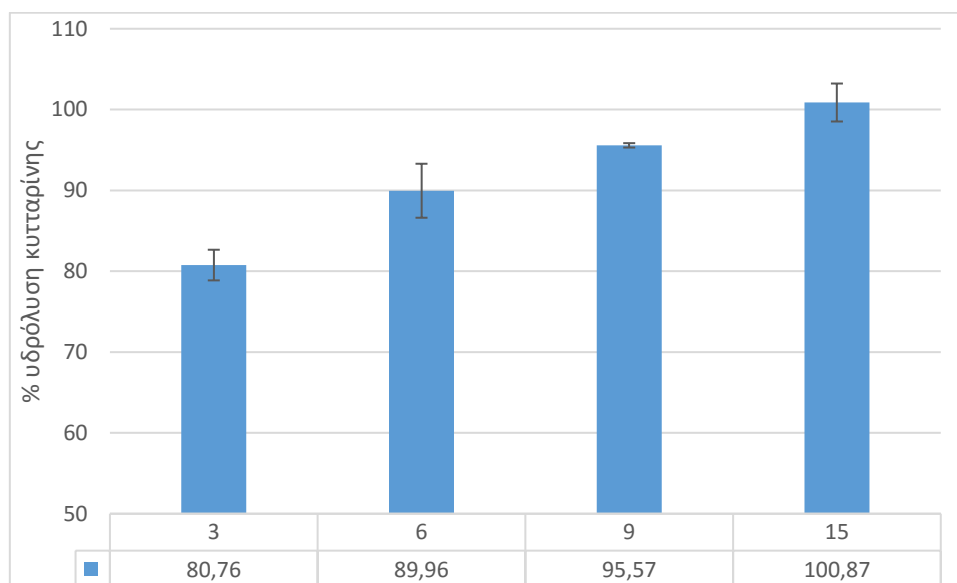
Διάγραμμα 19 Ραβδόγραμμα σύγκρισης τελικών συγκεντρώσεων γλυκόζης και αναγωγικών σακχάρων (διαφορετικά ποσοστά w/v στερεά).

Στους παραπάνω πίνακες όπου έχει – δεν έχει ληφθεί δείγμα γιατί δεν έχει υδρολύθει αρκετά η βιομάζα λόγω μεγάλης % w/v περιεκτικότητας σε στερεά, με αποτέλεσμα να μην είναι αρκετά ρευστή και η λήψη δείγματος να είναι δύσκολη και να μην έχει ιδιαίτερο νόημα αφού οι συγκέντρωση γλυκόζης θα είναι αρκετά χαμηλή. Από τα παραπάνω διαγράμματα παρατηρείται ότι όσο αυξάνεται η % w/v περιεκτικότητα σε στερεά αυξάνεται και η παραγωγή γλυκόζης, όπως και ήταν αναμενόμενο, αλλά μειώνεται το ποσοστό μετατροπής της κυτταρίνης σε γλυκόζη. Επίσης όσο αυξάνεται η συγκέντρωση του ενζύμου, όπως φάνηκε και στα διαγράμματα υδρόλυσης με διαφορετικές συγκεντρώσεις ενζύμου (Διάγραμμα 11-13), αυξάνεται και η μετατροπή της κυτταρίνης σε γλυκόζη. Για να υπολογιστεί η μετατροπή της κυτταρίνης σε γλυκόζη χρησιμοποιείται ο παρακάτω τύπος:

$$Eh = \frac{Cs}{F \left(\frac{CPno}{WSR} \right) \rho}$$

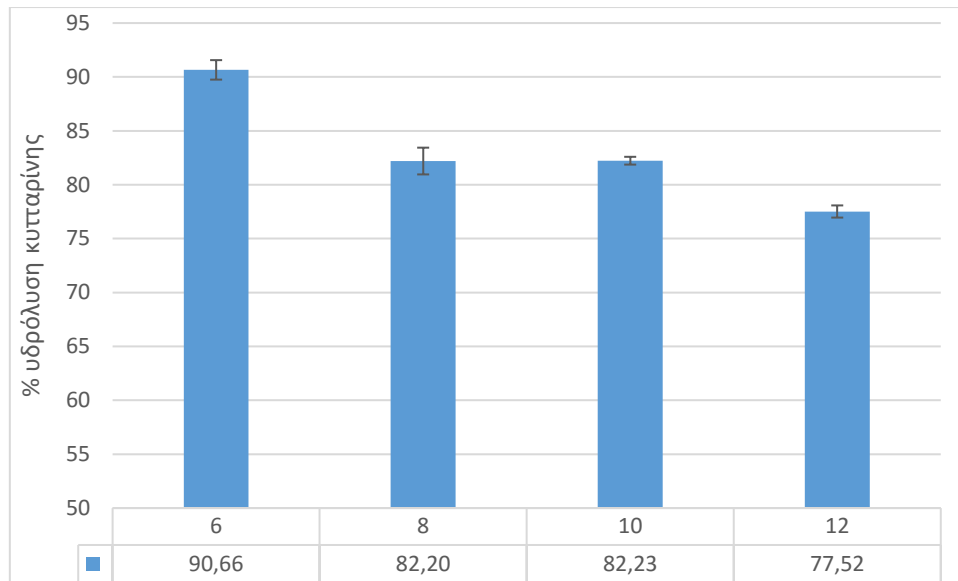
όπου Eh: % υδρόλυση της κυτταρίνης, Cs: συγκέντρωση γλυκόζης (g/L), F: στοιχειομετρικός συντελεστής της υδρόλυσης των μορίων ($F = 1.111$ για τις εξόζες), CPno: περιεκτικότητα κυτταρίνης ανά ξηρή βάση στη βιομάζα και ρ : πυκνότητα του υδρολύματος ($\rho = 1025$ g/L).

Στα παρακάτω ραβδογράμματα φαίνεται η μετατροπή της κυτταρίνης σε γλυκόζη για τις υδρολύσεις των διαφόρων υλικών.



Διάγραμμα 20 % υδρόλυση κυτταρίνης σε γλυκόζη μετά από 72 h υδρόλυσης με διαφορετική συγκέντρωση ενζύμων (3, 6, 9, 15 mg/g \pm B)

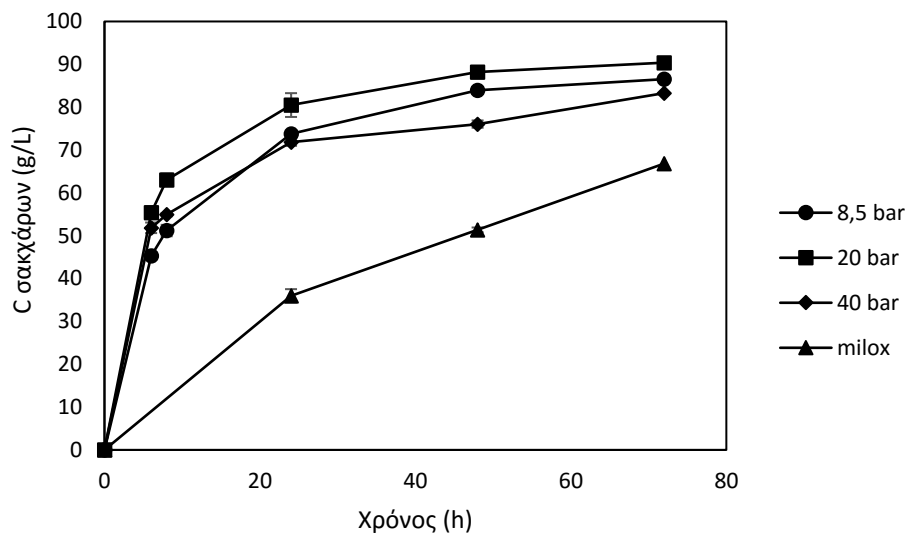
Στο συγκεκριμένο ραβδόγραμμα δεν έχει τοποθετηθεί η ενζυμική συγκέντρωση των 12 mg/g γιατί η τελευταία μέτρηση που λήφθηκε ήταν στις 48 h. Φαίνεται ότι η υδρόλυση της κυτταρίνης έχει φτάσει σε πολύ υψηλό ποσοστό με χρήση συγκέντρωσης ενζύμου 9 mg/g οπότε η συγκεκριμένη συγκέντρωση κρίνεται ως η βέλτιστη για την υδρόλυση. Με χρήση συγκέντρωσης 15 mg/g η υδρόλυση της κυτταρίνης ξεπερνάει το 100%, γεγονός που είναι παράλογο και οφείλεται σε πειραματικά σφάλματα όπως φαίνεται και από την γραμμή σφαλμάτων. Πάντως από τα 15 mg/g η υδρόλυση της κυτταρίνης είναι πλήρης για 10% w/v στερεού υλικού.



Διάγραμμα 21 % υδρόλυση κυτταρίνης σε γλυκόζη μετά από 72 h υδρόλυσης με διαφορετική ποσότητα στερεών (6, 8, 10, 12 % w/v)

Όπως είναι λογικό με την αύξηση της περιεκτικότητας των στερεών μειώνεται η % υδρόλυση της κυτταρίνης. Στα 8 και 10 % w/v στερεά η διαφορά στην υδρόλυση είναι αρκετά μικρή και γι' αυτό είναι και προτιμότερη η χρήση των 10 % w/v στερεών.

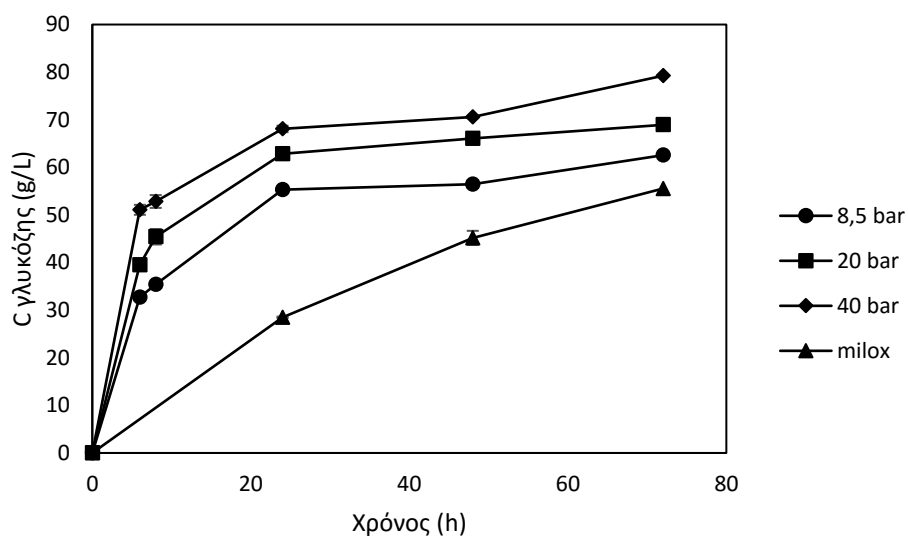
Τελικά, για τη διεξαγωγή της ζύμωσης, επιλέγεται η συγκέντρωση ενζύμου 9 mg/g ΞΒ με 10% w/v συγκέντρωσης στερεών. Με αυτές τις παραμέτρους πραγματοποιήθηκε και ενζυμική υδρόλυση στα υπόλοιπα στελέχη αραβοσίτου (8.5 και 20 bar και Milox) ώστε να γίνει σύγκριση.



Διάγραμμα 22 Συγκριτικό διάγραμμα παραγωγής σακχάρων από στελέχη αραβοσίτου διαφορετικής προκατεργασίας ως προς το χρόνο

Πίνακας 20 Παραγωγή ολικών αναγωγικών σακχάρων κατά την ενζυμική υδρόλυση των προκατεργασμένων με τις 4 διαφορετικές προκατεργασίες στελεχών αραβοσίτου

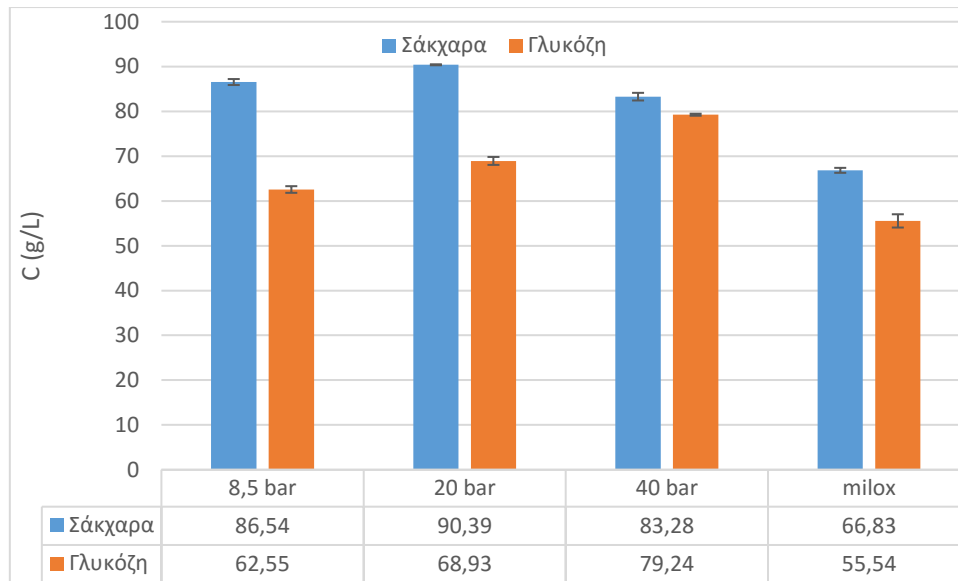
Ώρες	8,5 bar	20 bar	40 bar	Milox
6	45,31 ± 1,11	55,40 ± 0,17	51,84 ± 0,09	-
8	51,20 ± 0,44	63,06 ± 0,33	54,92 ± 1,23	-
24	73,82 ± 1,33	80,49 ± 1,44	71,84 ± 0,38	35,97 ± 1,33
48	83,95 ± 0,56	88,19 ± 2,78	76,05 ± 0,85	51,36 ± 1,55
72	86,54 ± 0,67	90,39 ± 0,11	83,28 ± 0,85	66,83 ± 0,56



Διάγραμμα 23 Συγκριτικό διάγραμμα παραγωγής γλυκόζης από στελέχη αραβοσίτου διαφορετικής προκατεργασίας ως προς το χρόνο

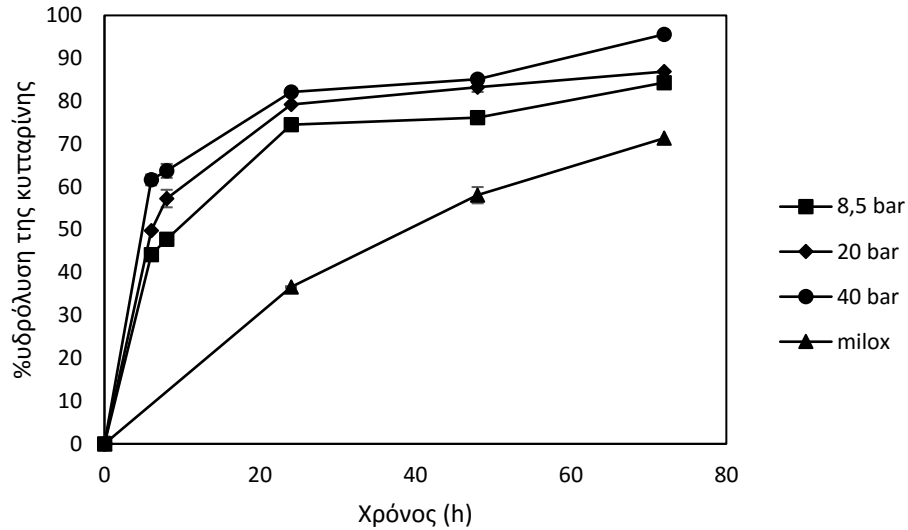
Πίνακας 21 Παραγωγή γλυκόζης (g/L) κατά την ενζυμική υδρόλυση των προκατεργασμένων με τις 4 διαφορετικές προκατεργασίες στελεχών αραβοσίτου

Ώρες	8,5 bar	20 bar	40 bar	Milox
6	32,74 ± 0,96	39,49 ± 0,22	51,08 ± 1,42	-
8	35,41 ± 0,22	45,42 ± 0,11	52,83 ± 1,05	-
24	55,28 ± 0,07	62,86 ± 1,63	68,07 ± 1,35	28,50 ± 0,96
48	56,48 ± 0,30	66,05 ± 0,07	70,56 ± 0,67	45,19 ± 0,15
72	62,55 ± 0,74	68,93 ± 0,89	79,24 ± 0,22	55,54 ± 1,48

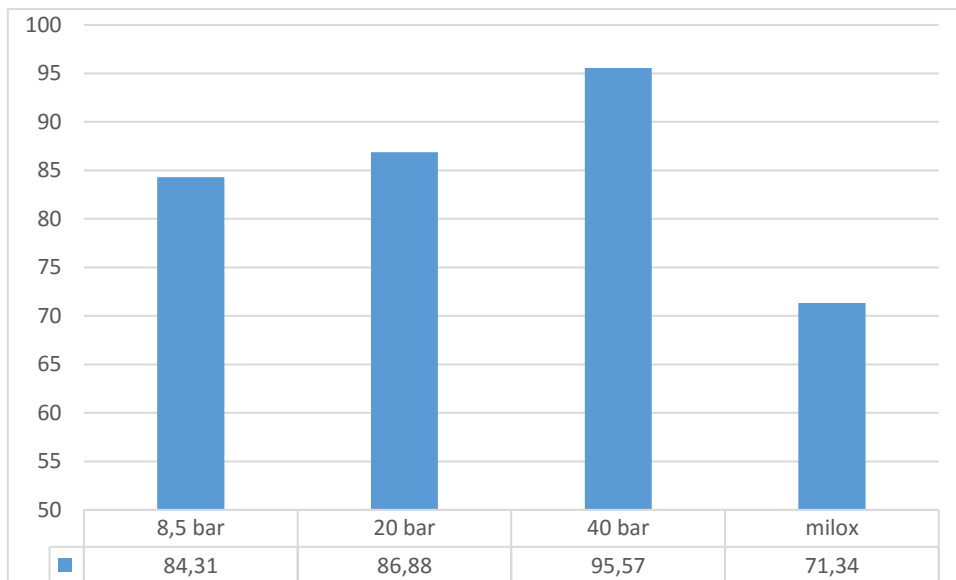


Διάγραμμα 24 Συγκριτικό ραβδόγραμμα παραγωγής γλυκόζης από στελέχη αραβοσίτου διαφορετικής προκατεργασίας μετά από 72 h

Στους πίνακες όπου έχει – δεν λήφθηκε μέτρηση γιατί η βιομάζα δεν είχε γίνει ακόμα αρκετά ρευστή για να είναι εύκολη η παραλαβή δείγματος και ικανοποιητική συγκέντρωση γλυκόζης. Από τα παραπάνω διαγράμματα φαίνεται ότι η αποδοτικότερη, σε παραγωγή αιθανόλης, διεργασία είναι η υγρή οξείδωση στα 40 bar. Όμως παρατηρείται ότι σε παραγωγή σακχάρων υστερεί σε σχέση με την υγρή οξείδωση σε χαμηλότερες πιέσεις. Αυτό οφείλεται στο γεγονός ότι σε αυτή την πίεση (40 bar) η μείωση της ημικυτταρίνης είναι μεγαλύτερη (στα 40 bar έχουμε 13,32% ημικυτταρίνη στην ξηρή βιομάζα, μετά την προκατεργασία, στα 20 bar 14,65% και στα 8,5 bar 16,95%) σε σχέση με τις χαμηλότερες πιέσεις (20 bar και 8,5 bar) κατά την προκατεργασία, με αποτέλεσμα στην υδρόλυση να παράγονται λιγότερα αναγωγικά σάκχαρα (7,9% λιγότερα από τα 20 bar και 3,8% λιγότερα από τα 8,5 bar) διαφορετικά της γλυκόζης. Αυτό φαίνεται και στην μικρή διαφορά μεταξύ συγκέντρωσης γλυκόζης (79,24 g/L) και αναγωγικών σακχάρων (83,28 mg/mL) μετά από 72 h υδρόλυση. Η προκατεργασία με τη μέθοδο Milox δεν ήταν αποδοτική καθώς η παραγωγή γλυκόζης ήταν πολύ χαμηλή (55.54 g/L) και αργούσε πολύ να ξεκινήσει η υδρόλυση σε υψηλούς ρυθμούς (στις 8 h δεν είχε νόημα η παραλαβή δείγματος καθώς δεν είχε ρευστοποιηθεί και υδρολυθεί αρκετά). Τέλος, στα παρακάτω διαγράμματα φαίνεται και η %υδρόλυση της κυτταρίνης για την κάθε προκατεργασία.



Διάγραμμα 25 % υδρόλυση κυτταρίνης ως προς χρόνο για τις διαφορετικές προκατεργασίες

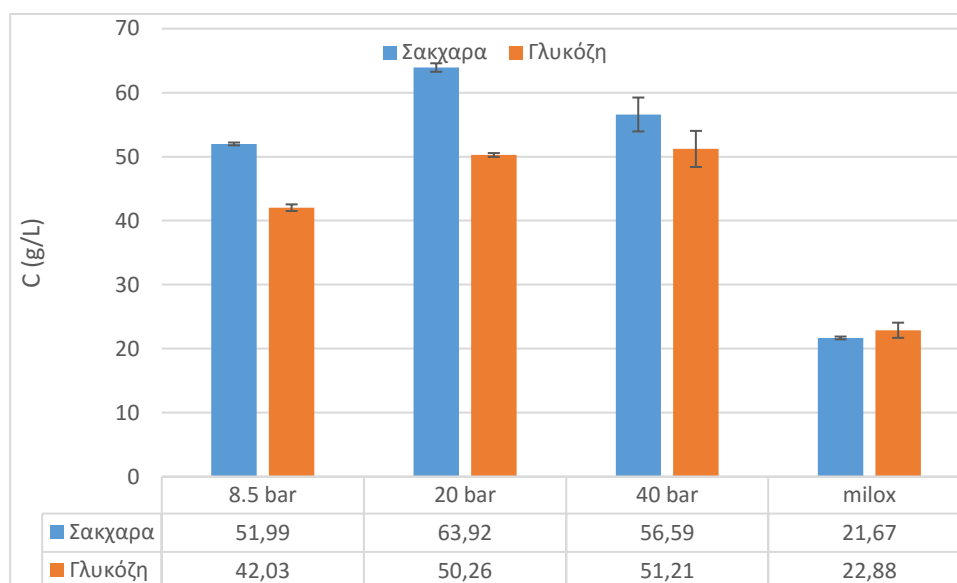


Διάγραμμα 26 % υδρόλυση κυτταρίνης μετά από 72 h για της διάφορες προκατεργασίες

Στα παραπάνω διαγράμματα φαίνεται ότι η προκατεργασία της υγρής οξείδωσης με 40 bar είναι η αποτελεσματικότερη στην υδρόλυση της κυτταρίνης. Η προκατεργασία Milox ενώ έχει ως αποτέλεσμα στην βιομάζα να επικρατεί υψηλό ποσοστό κυτταρίνης και χαμηλά ποσοστά ημικυτταρίνης και λιγνίνης, φαίνεται ότι κατά την υδρόλυση δεν είναι τόσο αποτελεσματική. Αυτό ίσως οφείλεται σε παρεμποδιστές της υδρόλυσης που παράγονται κατά την προκατεργασία.

3.4. Αλκοολική ζύμωση

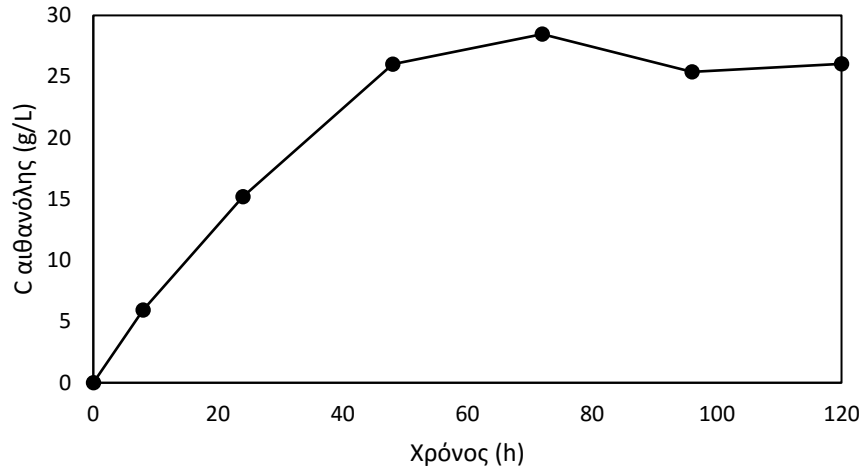
Στην αλκοολική ζύμωση αναμένεται το προκατεργασμένο υλικό στα 40 bar να έχει τη μεγαλύτερη απόδοση σε αιθανόλη αφού κατά την υδρόλυση παράχθηκε περισσότερη γλυκόζη. Για να ξεκινήσει η ζύμωση κατευθείαν με το που προστεθεί ο μικροοργανισμός, πραγματοποιήθηκε προϋδρόλυση για 12 h. Στο παρακάτω διάγραμμα φαίνεται η παραγωγή σακχάρων και γλυκόζης σε αυτές τις 12 h για τα τέσσερα στελέχη αραβοσίτου (8.5, 20, 40 bar και Milox).



Διάγραμμα 27 Συγκριτικό ραβδόγραμμα παραγωγής γλυκόζης και αναγωγικών σακχάρων μετά από 12 h προϋδρόλυση

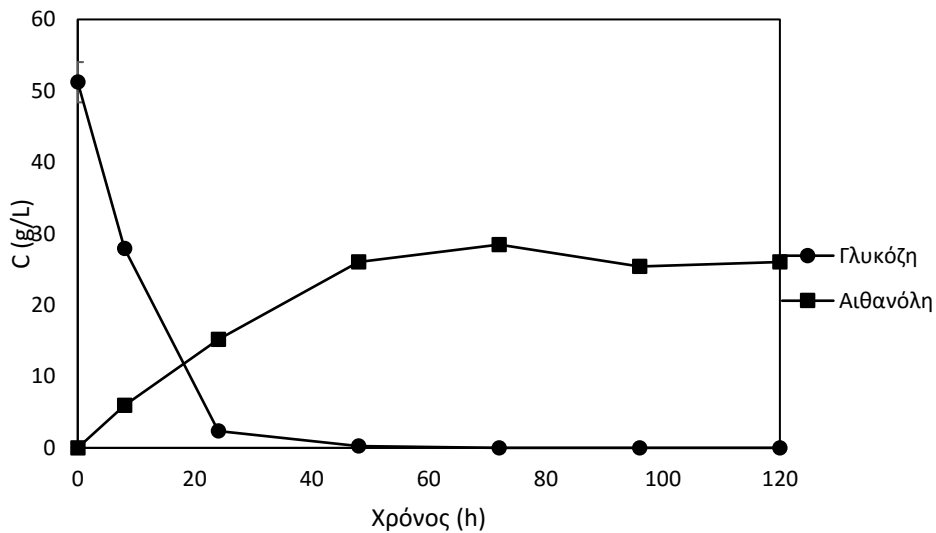
Στο παραπάνω ραβδόγραμμα παρατηρείται ότι περισσότερη γλυκόζη παράγεται στην προκατεργασμένη βιομάζα στα 40 bar όπως και ήταν αναμενόμενο. Όμως, η γλυκόζη των 20 bar έχει παραπλήσια τιμή (50,26 g/L για τα 20 bar και 51,21 g/L για τα 40 bar), η οποία κατά την ενζυμική υδρόλυση προηγουμένως, παρήγαγε σχετικά λιγότερη γλυκόζη από τα 40 bar (68,93 g/L για τα 20 bar και 79,24 g/L για τα 40 bar). Αυτό μπορεί να οφείλεται σε μικρές διαφορές στις συνθήκες αφού η προϋδρόλυση των δύο υλικών δεν διεξάχθηκε ταυτόχρονα.

Στη συνέχεια φαίνονται τα διαγράμματα παραγωγής αιθανόλης και γλυκόζης κατά την αλκοολική ζύμωση με ταυτόχρονη υδρόλυση του στελέχους αραβοσίτου προκατεργασμένο στα 40 bar.



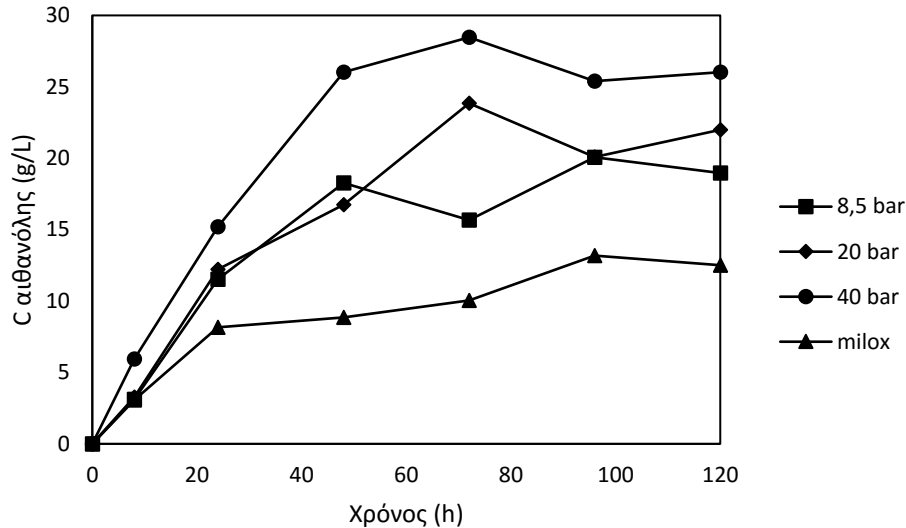
Διάγραμμα 28 Παραγωγή αιθανόλης από στελέχη αραβοσίτου προκατεργασμένα με υγρή οξείδωση στα 40 bar

Όπως φαίνεται στο παραπάνω διάγραμμα η παραγωγή της αιθανόλης αυξάνεται μέχρι τις 48 h και στη συνέχεια πιάνει ένα πλατό σε συγκέντρωση περίπου 26-28 mg/mL.



Διάγραμμα 29 Διάγραμμα παραγωγής αιθανόλης και κατανάλωσης γλυκόζης ως προς χρόνο κατά την ζύμωση

Σε αυτό το διάγραμμα παρατηρείται η μείωση της γλυκόζης σε σχέση με την αύξηση της αιθανόλης. Στις 24 h φαίνεται η γλυκόζη να έχει σχεδόν τελειώσει. Παρόλα αυτά από τις 24 έως τις 48 h η αιθανόλη αυξάνεται αρκετά. Αυτό οφείλεται στην ταυτόχρονη σακχαροποίηση και ζύμωση. Ο λόγος που δε μετριούνται υπολογίσιμες ποσότητες γλυκόζης είναι η άμεση κατανάλωσή της, από τον μικροοργανισμό, μετά την παραγωγή της. Παρακάτω φαίνεται και η μεγαλύτερη απόδοση σε αιθανόλη της προκατεργασίας των 40 bar από τις άλλες 3 προκατεργασίες.

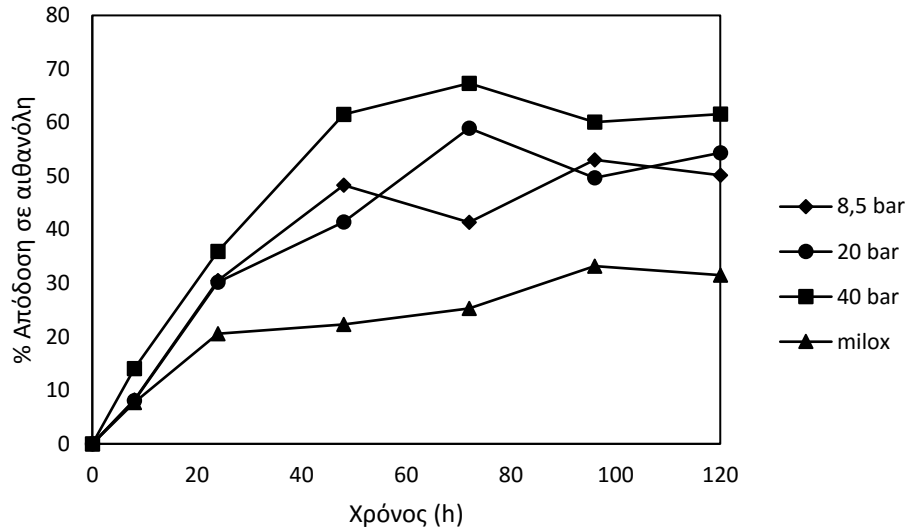


Διάγραμμα 30 Συγκριτικό διάγραμμα παραγωγής αιθανόλης από τα στελέχη αραβοσίτου ως προς χρόνο

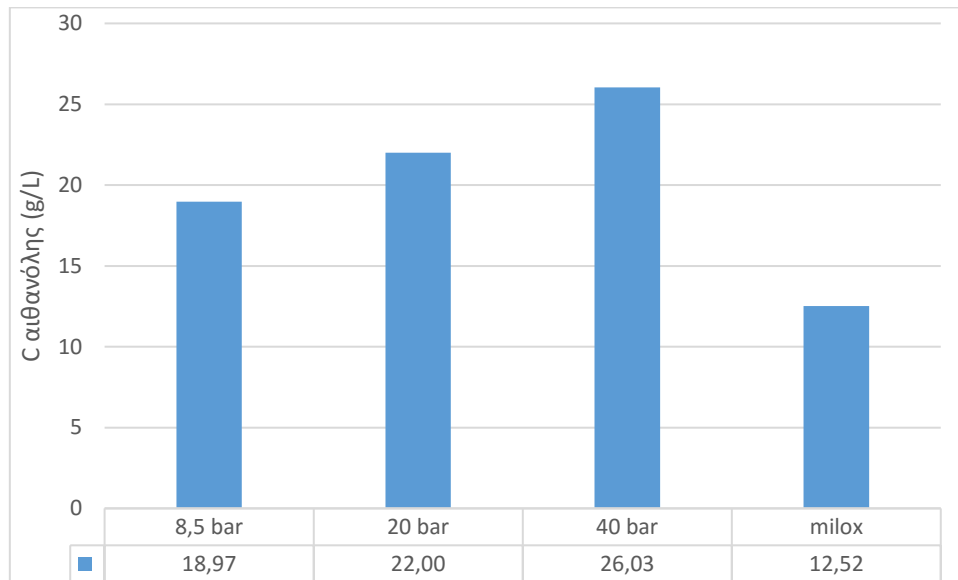
Από το παραπάνω διάγραμμα φαίνεται ότι η προκατεργασία με τα 40 bar είναι η αποδοτικότερη σε αιθανόλη και γι' αυτό επιλέγεται και για ζύμωση με προϋδρόλυση σε αναμεικτάρια ελεύθερης πτώσης. Εν συνεχεία μεγαλύτερη παραγωγή αιθανόλης έχει η προκατεργασία με τα 20 bar μετά με τα 8,5 bar και τέλος η προκατεργασία Milox. Αυτό είναι λογικό γιατί οι προκατεργασίες με υγρή οξείδωση σε υψηλότερες πιέσεις έχουν ως αποτέλεσμα το υλικό στη συνέχεια να έχει μεγαλύτερο ποσοστό κυτταρίνης σε σχέση με χαμηλότερες πιέσεις, οπότε παράγεται περισσότερη γλυκόζη και κατ' επέκταση και περισσότερη αιθανόλη. Ένας τρόπος για αξιολόγηση της ζύμωσης είναι ο υπολογισμός της θεωρητικά παραγόμενης αιθανόλης η οποία υπολογίζεται ως: 100% μετατροπή της κυτταρίνης σε γλυκόζη και η μετατροπή της γλυκόζης σε αιθανόλη ($0,51 \cdot \text{γλυκόζη} = \text{αιθανόλη}$ όπου 0,51 είναι ο στοιχειομετρικός συντελεστής της μετατροπής της γλυκόζης σε αιθανόλη). Έτσι μπορεί να υπολογιστεί η απόδοση σε αιθανόλη.

Πίνακας 22 Υπολογισμός της απόδοσης σε αιθανόλη για τα 4 υλικά διαφορετικών προκατεργασιών κατά τη ζύμωση με 10% w/v στερεά

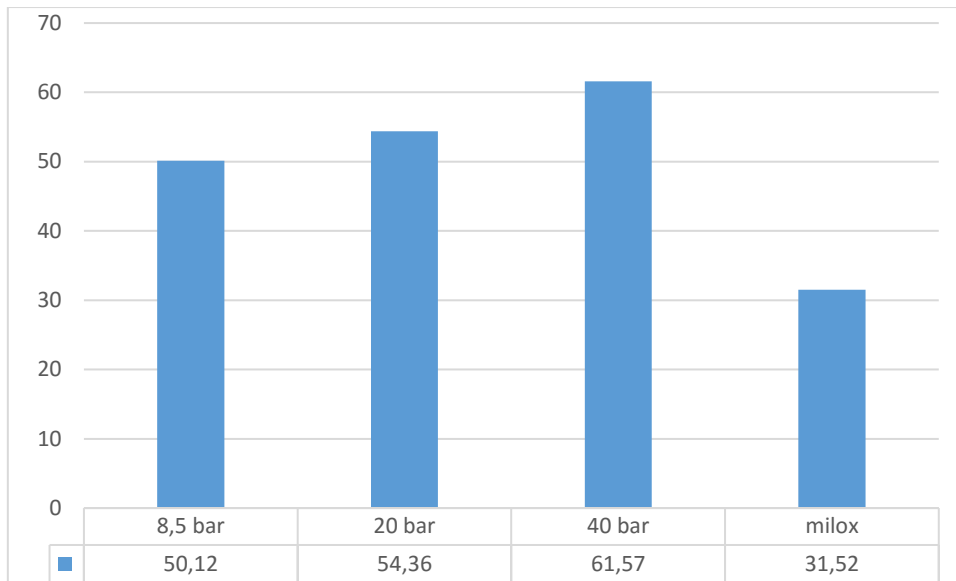
Προκατεργασία	Γλυκόζη (g/L) (100% υδρόλυση)	Θεωρητική αιθανόλη (g/L)	Παραγόμενη αιθανόλη (g/L)	% Απόδοση σε αιθανόλη	% w/w περιεκτικότητα σε αιθανόλη
Υ.Ο 8,5 bar	74,19	37,84	18,97	50,12	1,90
Υ.Ο 20 bar	79,34	40,46	22,00	54,36	2,15
Υ.Ο 40 bar	82,91	42,29	26,03	61,57	2,54
Milox	77,86	39,71	12,52	31,52	1,22



Διάγραμμα 31 % απόδοση αιθανόλης των 4 προκατεργασμένων υλικών κατά τη ζύμωση

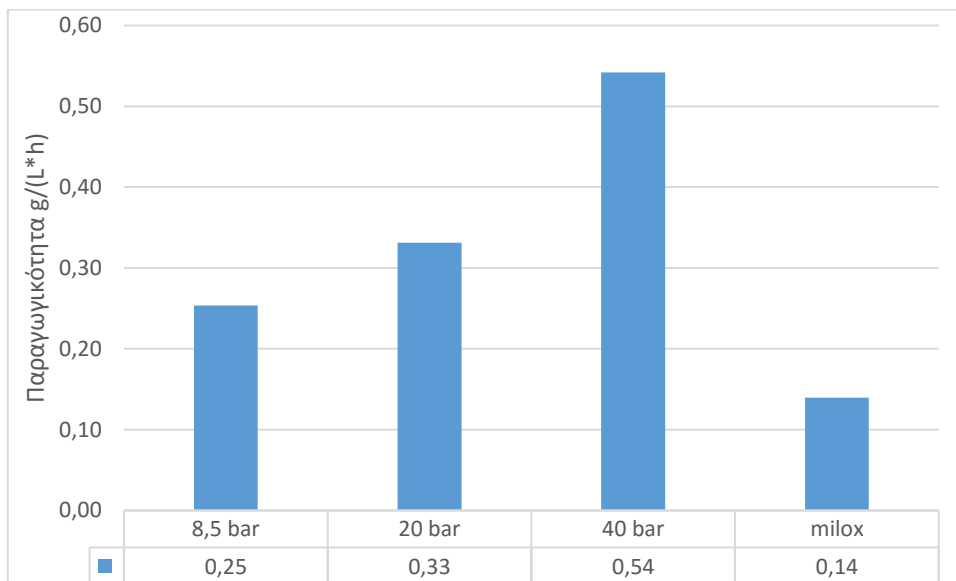


Διάγραμμα 32 Συγκέντρωση παραγόμενης βιοαιθανόλης για τα 4 υλικά διαφορετικής προκατεργασίας μετά από 120 h ζύμωσης



Διάγραμμα 33 % απόδοση αιθανόλης των 4 υλικών διαφορετικής προκατεργασίας μετά από 72 h

Και στην απόδοση της αιθανόλης, όπως φαίνεται και στο παραπάνω διάγραμμα, η καλύτερη προκατεργασία είναι η υγρή οξείδωση στα 40 bar. Τέλος υπολογίζεται και η παραγωγικότητα της αιθανόλης που ορίζεται ως η συγκέντρωση αιθανόλης τη χρονική στιγμή που η διεργασία φτάνει σ' ένα πλατό διαιρεμένη με τη χρονική διάρκεια αυτή και μετριέται σε g/(L*h).



Διάγραμμα 34 Παραγωγικότητα σε αιθανόλη της αλκοολικής ζύμωσης των 4 υλικών διαφορετικής προκατεργασίας

Φαίνεται ότι η παραγωγικότητα σε αιθανόλη είναι αρκετά μεγαλύτερη στο υλικό προκατεργασίας 40 bar, όπως και ήταν αναμενόμενο. Αυτή η μεγάλη διαφορά στην παραγωγικότητα (38,9% μεγαλύτερη από την παραγωγικότητα των 20 bar, η οποία είναι η δεύτερη μεγαλύτερη) οφείλεται στην γρήγορη παραγωγή αιθανόλης από το υλικό στα 40 bar όπου από τις 48 h ζύμωσης έχει φτάσει σε πλατό.

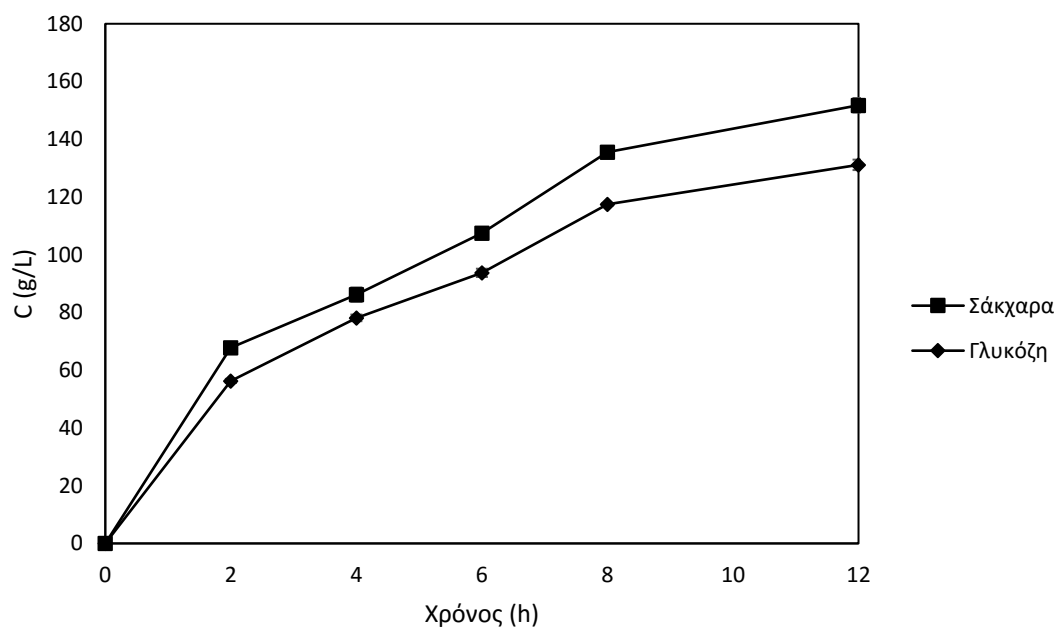
3.5. Προϋδρόλυση με αναμεικτήρα ελεύθερης πτώσης για μετέπειτα ζύμωση

Το υλικό που είχε υποστεί υγρή οξείδωση στα 40 bar επιλέχθηκε για την διεξαγωγή προϋδρόλυσης σε αναμεικτήρα ελεύθερης πτώσης και στη συνέχεια ταυτόχρονη σακχαροποίηση και ζύμωση. Ο αναμεικτήρας ελεύθερης πτώσης έχει το πλεονέκτημα ότι εκμεταλλεύεται τη βαρύτητα για να μπορέσει να αναμείξει καλύτερα το υλικό με αποτέλεσμα να είναι δυνατή η υδρόλυση μεγαλύτερου ποσοστού στερεών (25% w/v) και έτσι είναι δυνατή η παραγωγή αιθανόλης σε μεγαλύτερες συγκεντρώσεις (>4% w/w). Παρακάτω φαίνεται η παραγωγή αναγωγικών σακχάρων και γλυκόζης κατά την υδρόλυση στον αναμεικτήρα ελεύθερης πτώσης.

Πίνακας 23 Παραγωγή αναγωγικών σακχάρων και γλυκόζης (g/L) κατά την προϋδρόλυση σε αναμεικτήρα ελεύθερης πτώσης, *ΟΑΣ: Ολικά Αναγωγικά Σάκχαρα

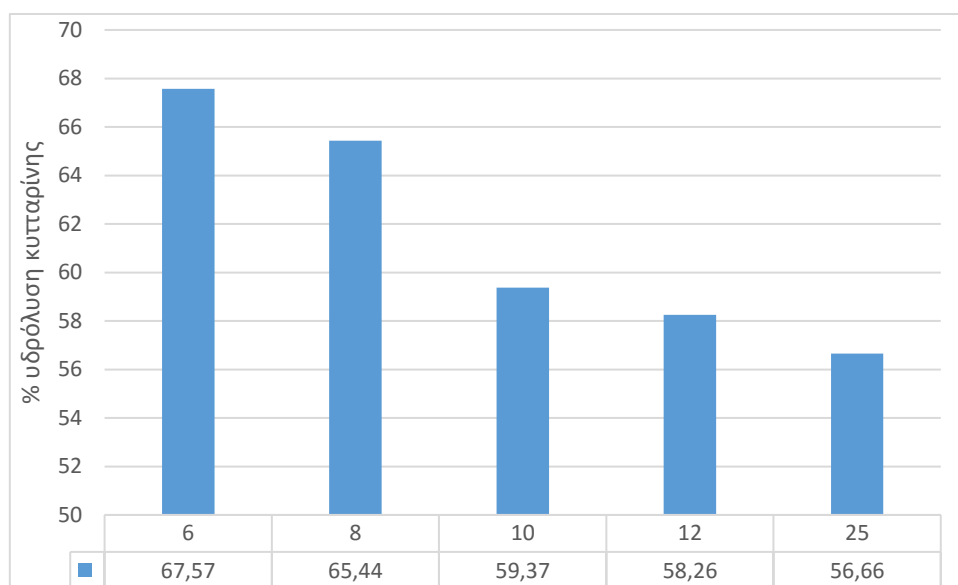
Χρόνος (h)	ΟΑΣ (g/L)	Γλυκόζη (g/L)	% Γλυκόζη ως προς ΟΑΣ
2	67,79 ± 0,72	56,29 ± 0,72	83,0
4	86,19 ± 2,48	78,13 ± 1,14	90,6
6	107,47 ± 1,04	93,73 ± 1,43	87,2
8	135,58 ± 0,21	117,45 ± 0,48	86,6
12	151,77 ± 2,48	131,14 ± 1,80	86,4

Το ποσοστό της γλυκόζης ως προς τα ολικά αναγωγικά σάκχαρα είναι μεταξύ 80-90%. Αυτό είναι λογικό αφού το ποσοστό της κυτταρίνης στο υλικό είναι μεγαλύτερο του 80% της ποσότητας της κυτταρίνης και της ημικυτταρίνης μαζί.



Διάγραμμα 35 Παραγωγή αναγωγικών σακχάρων και γλυκόζης κατά την προϋδρόλυση σε αναμεικτήρα ελεύθερης πτώσης ως προς το χρόνο

Από το διάγραμμα φαίνεται πως υπάρχει μια σχετικά γραμμική αύξηση των σακχάρων από τις 2 έως τις 8 h. Στις 12 h η αύξηση αυτή μειώνεται, γεγονός που είναι λογικό αφού η μεγάλη συγκέντρωση των σακχάρων παρεμποδίζει την δράση του ενζύμου και επίσης η κυτταρίνη έχει υδρολυθεί αρκετά με αποτέλεσμα να είναι δυσκολότερο για το ενζυμικό σκεύασμα να προσδεθεί σε αυτήν αφού υπάρχει σε μικρότερες ποσότητες. Στη συνέχεια, για να γίνει σύγκριση του ποσοστού υδρόλυσης της κυτταρίνης διαφορετικών συγκεντρώσεων στερεών, με τη συγκέντρωση στον αναμεικτήρα ελεύθερης πτώσης (25% w/v) παρατίθεται το παρακάτω διάγραμμα.



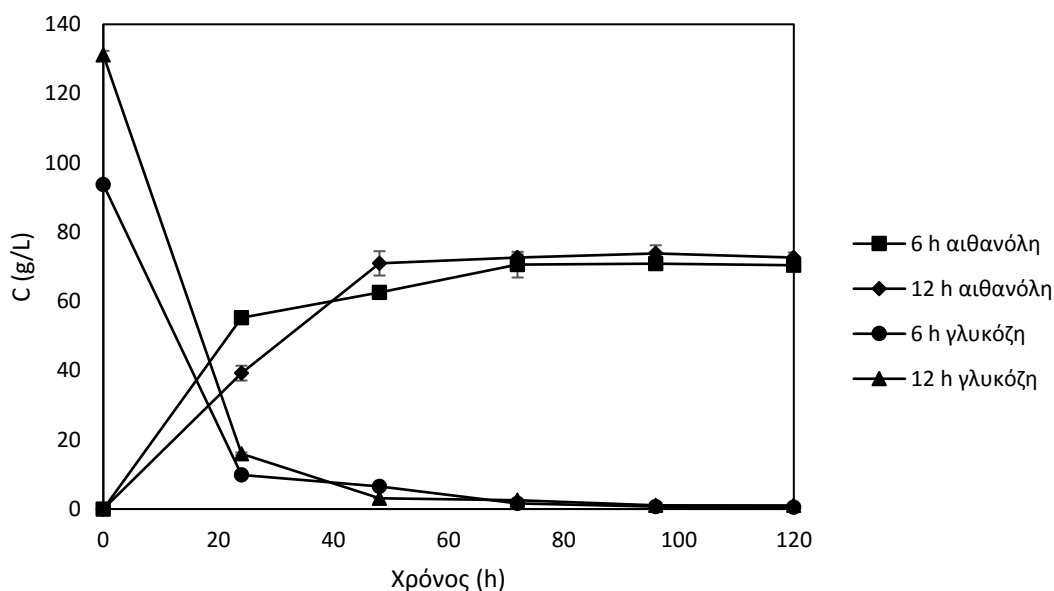
Διάγραμμα 36 Σύγκριση της ποσοστιαίας % υδρόλυσης της κυτταρίνης, μετά από 8 h υδρόλυσης, ως προς διαφορετικές περιεκτικότητες στερεών (η υδρόλυση της μεγαλύτερη περιεκτικότητας σε στερεά πραγματοποιήθηκε σε αναμεικτήρα ελεύθερης πτώσης)

Όπως είναι λογικό με την αύξηση της περιεκτικότητας της στερεής βιομάζας μειώνεται η ποσοστιαία υδρόλυσή της. Όμως στον αναμεικτήρα ελεύθερης πτώσης ενώ μειώνεται η % υδρόλυση, αυτή η μείωση είναι πολύ μικρή σε σχέση με την αύξηση της περιεκτικότητας σε στερεή βιομάζα (2,9% μείωση της % υδρόλυσης της κυτταρίνης, ενώ η αύξηση της περιεκτικότητας των στερεών είναι λίγο παραπάνω από 100%, από 12 % w/v σε 25% w/v).

Στη συνέχεια δείγματα από τις προϋδρολύσεις των 6 και 12 h τοποθετήθηκαν για ζύμωση προκειμένου να μελετηθεί η επίδραση του χρόνου προϋδρόλυσης στην παραγωγή αιθανόλης. Η παραγωγή αιθανόλης καθώς και η κατανάλωση γλυκόζης φαίνονται παρακάτω.

Πίνακας 24 Παραγωγή αιθανόλης και κατανάλωση γλυκόζης κατά την SSF μετά από 6 και 12 h προϋδρόλυση σε αναμεικτήρα ελεύθερης πτώσης

Χρόνος (h)	6 h προϋδρόλυσης		12 h προϋδρόλυσης	
	C αιθανόλης (g/L)	C γλυκόζης (g/L)	C αιθανόλης (g/L)	C γλυκόζης (g/L)
0	0	93,73 ± 0,95	0	131,14 ± 1,20
8	16,27 ± 0,05	27,18 ± 0,11	-	-
24	55,23 ± 0,17	9,84 ± 0,12	39,25 ± 2,15	15,93 ± 0,37
48	62,52 ± 3,71	6,49 ± 0,27	70,95 ± 3,51	3,10 ± 0,06
72	70,58 ± 0,44	1,62 ± 0,02	72,60 ± 0,94	2,50 ± 0,05
96	70,87 ± 0,22	0,67 ± 0,04	73,82 ± 2,36	1,05 ± 0,00
120	70,38 ± 0,56	0,52 ± 0,01	72,65 ± 1,44	1,04 ± 0,02



Διάγραμμα 37 Παραγωγή αιθανόλης και κατανάλωση γλυκόζης κατά την SSF μετά από 6 και 12 h προϋδρόλυση σε αναμεικτήρα ελεύθερης πτώσης ως προς το χρόνο

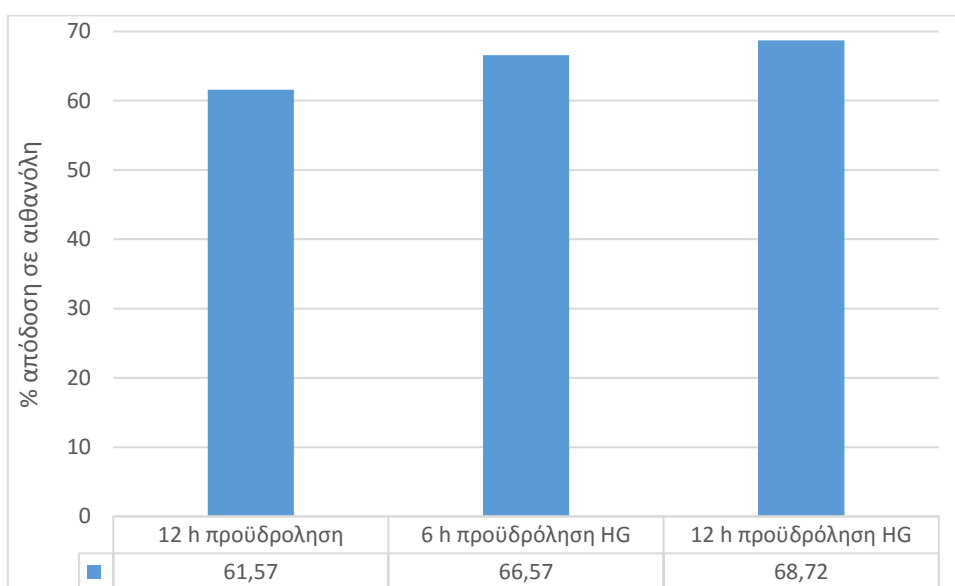
Όπως φαίνεται και στο παραπάνω διάγραμμα, οι 6 h παραπάνω προϋδρόλυσης δεν αποφέρουν πολύ μεγάλη διαφορά στην παραγωγή γλυκόζης. Για διπλασιασμό του χρόνου προϋδρόλυσης παράγεται αιθανόλη κατά 3,1% μεγαλύτερη. Επίσης ενώ υπάρχει μεγάλη διαφορά στην παραγωγή γλυκόζης (28,5% περισσότερη γλυκόζη στην προκατεργασία των 12 h), στις 24 h το υλικό με 6 h προϋδρόλυση είχε παράγει περισσότερο αιθανόλη κατά 28,9%. Αυτό οφείλεται στην πιθανή παρεμπόδιση της ζύμωσης, αλλά και της υδρόλυσης, από την πολύ μεγάλη συγκέντρωση γλυκόζης στη διεργασία με 12 h προϋδρόλυση. Στον παρακάτω πίνακα φαίνεται η % w/w περιεκτικότητα σε αιθανόλη των 3 ζυμώσεων που πραγματοποιήθηκαν (12 h προϋδρόλυσης χωρίς αναμεικτήρα ελεύθερης πτώσης (ΑΕΠ), με 6 h προϋδρόλυση στον ΑΕΠ και με 12 h προϋδρόλυση στον ΑΕΠ).

Πίνακας 25 % w/w περιεκτικότητα σε αιθανόλη των 3 ζυμώσεων που πραγματοποιούνται

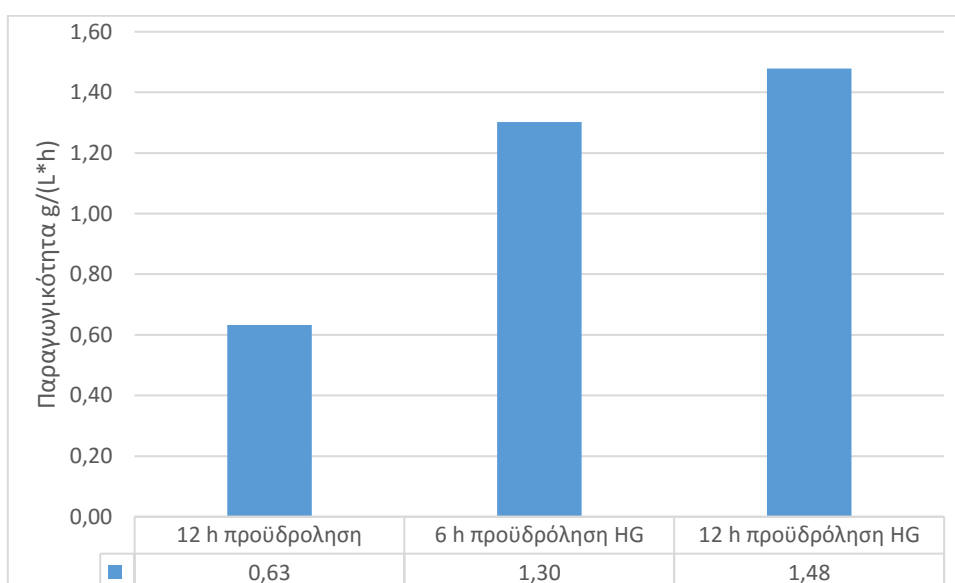
12 h προϋδρόλυση χωρίς ΑΕΠ (% w/w αιθανόλης)	6 h προϋδρόλυση με ΑΕΠ (% w/w αιθανόλης)	12 h προϋδρόλυση με ΑΕΠ (% w/w αιθανόλης)
2,54	6,87	7,09

Από τον πίνακα φαίνεται ότι με τη χρήση του ΑΕΠ αυξάνεται κατά πολύ (περισσότερο από 100%) η παραγωγή της αιθανόλης.

Επίσης στα παρακάτω ραβδογράμματα φαίνεται η απόδοση σε αιθανόλη (Διάγραμμα 34) καθώς και η παραγωγικότητα (Διάγραμμα 35) της ζύμωσης χωρίς χρήση του ΑΕΠ, της ζύμωσης των 6 h προϋδρόλυσης στον ΑΕΠ και της ζύμωσης των 12 h προϋδρόλυσης στον ΑΕΠ.



Διάγραμμα 38 Σύγκριση %απόδοση αιθανόλης για τις 3 ζυμώσεις που πραγματοποιήθηκαν



Διάγραμμα 39 Παραγωγικότητα αιθανόλης για τις 3 ζυμώσεις που πραγματοποιήθηκαν

Και από τα ραβδόγραμμα αυτά φαίνεται ότι είναι αρκετά αποτελεσματικότερη η ζύμωση με προϋδρόλυση στον ΑΕΠ αφού η απόδοση σε αιθανόλη είναι μεγαλύτερη αλλά και η περιεκτικότητα σε στερεά είναι παραπάνω από το διπλάσιο (10% με 25%) οπότε παράγεται πολύ περισσότερη αιθανόλη. Επίσης όπως αναφέρθηκε και προηγουμένως, η διαφορά στην παραγωγή αιθανόλης μεταξύ των 6 και 12 h προϋδρόλυσης είναι πολύ μικρή οπότε κρίνεται ότι οι 6 h προϋδρόλυσης είναι προτιμότερες από τις 12 h. Η παραγωγικότητα μετρήθηκε στις 48 h όπου φτάνει σε πλατό η ζύμωση της προϋδρόλυσης των 12 h.

3.6. Μέτρηση ιξώδους σε δείγματα της προϋδρόλυσης

Για να διαπιστωθεί η ρευστοποίηση που πραγματοποιείται στη βιομάζα κατά την προϋδρόλυση στον ΑΕΠ μετρήθηκε το ιξώδες της βιομάζας πριν την προϋδρόλυση, μετά από 2 h προϋδρόλυσης και μετά από 6 h προϋδρόλυσης. Η μείωση του ιξώδους πραγματοποιείται εξαιτίας της μετατροπής της βιομάζας από τη στερεή φάση στην υγρή εξαιτίας της σακχαροποίησης. Η μέτρηση του ιξώδους πραγματοποιήθηκε όπως αναφέρεται στο πειραματικό μέρος. Στις παρακάτω εικόνες φαίνεται η βιομάζα μέσα στον ΑΕΠ πριν ξεκινήσει η υδρόλυση και μετά από 6 και 12 h προϋδρόλυσης.



Εικόνα 15 Βιομάζα στον ΑΕΠ πριν την προϋδρόλυση



Εικόνα 16 Βιομάζα μετά από 6 h προϋδρόλυσης



Εικόνα 17 Βιομάζα μετά από 12 h προϋδρόλυσης

Όπως φαίνεται από τις εικόνες μετά τις 6 h προϋδρόλυσης η βιομάζα έχει ρευστοποιηθεί αρκετά, με αποτέλεσμα να είναι δύσκολη η μέτρηση του ιξώδους με τη μέθοδο των παραλλήλων πλακών, γι' αυτό δε μετρήθηκαν οι 12 h προϋδρόλυσης. Όπως φαίνεται και στην εικόνα 17 η τοποθέτηση του δείγματος στο όργανο μέτρησης ιξώδους θα ήταν πολύ δύσκολη και οι μετρήσεις δε θα είχαν ιδιαίτερο νόημα. Από τις μετρήσεις που πραγματοποιήθηκαν στις 0 και 2 h προϋδρόλυσης υπολογίστηκαν τα αντίστοιχα ιξώδη. Στο μη υδρολυμένο δείγμα το ιξώδες υπολογίστηκε στα 1356,2 Pa·s και μετά από 2 h προϋδρόλυσης το ιξώδες μειώθηκε στα 176,2 Pa·s. Η μείωση αυτή του ιξώδους είναι σχετικά μεγάλη (87% μείωση) για το μικρό χρονικό διάστημα υδρόλυσης. Ενώ πραγματοποιήθηκε μέτρηση του ιξώδους για τις 6 h προϋδρόλυσης δεν κρίνονται αξιόπιστα τα αποτελέσματα λόγω της μεγάλης ρευστότητας. Η προϋδρόλυση συνεχίστηκε μέχρι τις 12 h παρά το γεγονός ότι η βιομάζα είχε ρευστοποιηθεί αρκετά, πολύ νωρίτερα. Αυτό συνέβη γιατί η σακχαροποίηση συνεχιζόταν έως τις 12 h.

4. Συμπεράσματα

Η βιομάζα που χρησιμοποιήθηκε στη συγκεκριμένη εργασία είναι στελέχη αραβοσίτου με σύσταση 38.8% κυτταρίνη, 23.5% ημικυτταρίνη και 20.2% λιγνίνη. Η σύσταση αυτή είναι σύμφωνη με την γενικότερη σύσταση των στελεχών αραβοσίτου (corn stover, Πίνακας 4, 38-40% κυτταρίνη, 22-28% ημικυτταρίνη και 18-23% λιγνίνη) (Walker, 2011).

Μετά τις προκατεργασίες με υγρή οξείδωση αλλά και τη μέθοδο απολιγνίνωσης, Milox, ποσότητα της ημικυτταρίνης και της λιγνίνης απομακρύνθηκε και συνεπώς αυξήθηκε η ποσοστιαία κυτταρίνη, σε ξηρή βάση. Η αποτελεσματικότερη σε απομάκρυνση ημικυτταρίνης και λιγνίνης προκατεργασία, ήταν η μέθοδος απολιγνίνωσης Milox, όμως η μετέπειτα παραγωγή γλυκόζης και αιθανόλης βρισκόταν σε αρκετά χαμηλά επίπεδα. Αυτό συνέβη, πιθανώς, εξαιτίας παρεμποδιστών της υδρόλυσης και ζύμωσης που παράχθηκαν κατά την προκατεργασία. Συνεπώς αποδοτικότερη προκατεργασία από τις παραπάνω ήταν η υγρή οξείδωση με πίεση 40 bar. Όμως είναι σκόπιμο να συγκριθούν αυτές οι προκατεργασίες με άλλες προκατεργασίες από τη διεθνή βιβλιογραφία, ώστε να γίνει ορθότερη αξιολόγηση.

Πίνακας 26 Σύγκριση προκατεργασιών στελεχών αραβοσίτου αυτής της εργασίας με τη διεθνή βιβλιογραφία

Προκατεργασία, Συνθήκες	Αύξηση Κυτταρίνης (%)	Μείωση Ημικυτταρίνης (%)	Μείωση Λιγνίνης (%)	Πηγές
Υγρή οξείδωση 8.5 bar, 175°C, 120 min, Air (40%O ₂), d.H ₂ O/ακετόνη 1/1	72,11	27,87	40,15	Παρούσα εργασία
Υγρή οξείδωση 20 bar, 175°C, 120 min, Air (40%O ₂), d.H ₂ O/ακετόνη 1/1	84,05	37,66	57,23	Παρούσα εργασία
Υγρή οξείδωση 40 bar, 175°C, 120 min, Air (40%O ₂), d.H ₂ O/ακετόνη 1/1	92,35	43,32	62,33	Παρούσα εργασία
Milox 1 bar, 80°C, 60 min, φορμικό οξύ/2% H ₂ O ₂	80,62	63,06	64,21	Παρούσα εργασία

Έκρηξη ατμών 20 bar, 205°C, 6 min (και ξέπλυμα μετά την προκατεργασία)	16,0	27,6	-	Lu et al., 2010
Έκρηξη ατμών 200°C, 5 min, 2% SO ₂	52,6	72,9	-	Öhgren et al., 2007
Υδροθερμική 180°C, 8 min	49,9	71,1	-	Kim, Dien, Tumbleson, Rausch, & Singh, 2016
Με διαλυμένο οξύ 1% w/w H₂SO₄, 150 °C, 4 min	55,8	62,6	-	(S. M. Kim et al., 2016)

Σε κάποιες από τις παραπάνω προκατεργασίες, η % μείωση της λιγνίνης δεν έχει αναγραφεί γιατί είναι αμελητέα σε σχέση με την % μείωση της ημικυτταρίνης. Σε αυτές τις περιπτώσεις ποσοστιαία έχει αυξηθεί η λιγνίνη γιατί μειώνεται η ημικυτταρίνη (ομοίως και το ποσοστό της κυτταρίνης). Από τις παραπάνω προκατεργασίες η υγρή οξείδωση (και Milox) πλεονεκτεί στο γεγονός ότι απομακρύνει και τη λιγνίνη με αποτέλεσμα η ποσοστιαία κυτταρίνη να είναι υψηλότερη μετά την προκατεργασία. Οι υπόλοιπες προκατεργασίες όμως ελαττώνουν αρκετά την ημικυτταρίνη και είναι αρκετά πιο σύντομες (<10 min σε αντίθεση με την υγρή οξείδωση που διαρκεί 2 h). Συνεπώς, ανάλογα με το επιθυμητό αποτέλεσμα μπορεί να επιλεγεί μια πιο αργή και ακριβή αλλά ταυτοχρόνως αποτελεσματικότερη προκατεργασία ή μια πιο γρήγορη και φθηνή αλλά όχι τόσο αποτελεσματική.

Επίσης για την διαπίστωση της κρυσταλλικότητας της κυτταρίνης στην προκατεργασμένη βιομάζα, πραγματοποιήθηκε περίθλαση με ακτίνες Χ (XRD) και διαπιστώθηκε ότι μετά την προκατεργασία με υγρή οξείδωση, αλλά και με υδροθερμική προκατεργασία η κρυσταλλικότητα αυξήθηκε. Το αποτέλεσμα αυτό οφείλεται στην υδρόλυση των άμορφων περιοχών της κυτταρίνης κατά την προκατεργασία. Όσο κρυσταλλικότερη είναι η κυτταρίνη τόσο δυσκολότερο είναι για την κυτταρινάση να προσδεθεί σε αυτήν και να την υδρολύσει. Συνεπώς, δεν είναι επιθυμητή αυτή η αύξηση της κρυσταλλικότητας κατά την προκατεργασία.

Κατά την μελέτη ενζυμικού φορτίου που πραγματοποιήθηκε δοκιμάστηκαν διαφορετικές συγκεντρώσεις ενζυμικού σκευάσματος ώστε να βρεθεί η βέλτιστη συγκέντρωση. Οι συγκεντρώσεις που δοκιμάστηκαν ήταν 3, 6, 9, 12, 15 mg/g ΞΒ. Τα 3 mg/g ΞΒ δεν ήταν επαρκή για να καταλήξει σε ένα πλατό η υδρόλυση μετά από 72 h, αλλά οι υπόλοιπες συγκεντρώσεις κατέληξαν σ' ένα πλατό σε παραπλήσιες συγκεντρώσεις γλυκόζης (74.59 g/L, 79.24 g/L, για τη συγκέντρωση 12 mg/g ΞΒ δεν λήφθηκε μέτρηση για τις 72 h και στις 48 h παράχθηκαν 72.20 g/L και 83,64 g/L αντίστοιχα). Οπότε, επιλέχτηκε η συγκέντρωση των 9 mg/g ΞΒ λόγω

οικονομίας ενζυμικού σκευάσματος (ΕΣ). Θα ήταν δυνατή και η επιλογή των 6 mg/g ΞΒ, αλλά δεν επιλέχτηκε λόγω καθυστέρησης της υδρόλυσης (πρώτο δείγμα στις 6 h) και συνήθως χρησιμοποιούνται μεγαλύτερες συγκεντρώσεις ΕΣ στη διεθνή βιβλιογραφία.

Από την υδρόλυση που πραγματοποιήθηκε στα διάφορα δείγματα το αποτελεσματικότερο σε παραγωγή γλυκόζη ήταν αυτό που υπέστη προκατεργασία υγρής οξείδωσης στα 40 bar. Όμως οι προκατεργασίες στις 2 χαμηλότερες πιέσεις (8,5 και 20 bar) είχαν μεγαλύτερη παραγωγή ολικών αναγωγικών σακχάρων. Αυτό είναι λογικό αφού απομακρύνεται μεγαλύτερη ποσότητα ημικυτταρίνη με την αύξηση της πίεσης (8.5 bar → 16.95% ημικυτταρίνη, 20 bar → 14.65% ημικυτταρίνη και 40 bar → 13.32% ημικυτταρίνη). Τέλος η προκατεργασία απολιγνίνωσης Milox ενώ φαίνεται πολύ αποτελεσματική, από την ανάλυση σύστασης, στην παραγωγή γλυκόζης υστερεί (Milox→55.54 g/L, 8.5 bar →62.55 g/L, 20 bar →68.93 g/L και 40 bar →79.24 g/L). Αυτό μπορεί να οφείλεται σε παρεμποδιστές της υδρόλυσης που παράγονται κατά την προκατεργασία.

Στη συνέχεια πραγματοποιείται αλκοολική ζύμωση με 12 h προϋδρόλυση για να διαπιστωθεί η αποδοτικότερη προκατεργασία σε αιθανόλη. Αυτή η προκατεργασία είναι η υγρή οξείδωση στα 40 bar όπως και ήταν αναμενόμενο. Οι αποδόσεις αυτές μαζί με τις συγκεντρώσεις αιθανόλης είναι: Milox → 12.52 g/L, 31.52%, 8.5 bar → 18.97 g/L, 50.12%, 20 bar → 22.00 g/L, 54.36% και 40 bar → 26.03 g/L, 61.57%.

Τέλος, η προκατεργασμένη βιομάζα με υγρή οξείδωση σε πίεση 40 bar, υποβλήθηκε σε ζύμωση υψηλής κλίμακας με ρευστοποίηση/σακχαροποίηση σε αναδευτήρα ελεύθερης πτώσης για να επιτευχθεί μεγαλύτερη συγκέντρωση αιθανόλης. Για να μελετηθεί και η επίδραση της διάρκειας (6 και 12 h) ρευστοποίησης/σακχαροποίησης πραγματοποιήθηκε αλκοολική ζύμωση. Διαπιστώθηκε ότι η διαφορά στην παραγωγή αιθανόλης είναι αρκετά μικρή για τις επιπλέον 6 h ρευστοποίησης/σακχαροποίησης (από τις 12 h παράχθηκε κατά 3,1% υψηλότερη συγκέντρωση αιθανόλης σε σχέση με τις 6 h) και επίσης η παραγωγή αιθανόλης των 6 h είναι γρηγορότερη (στις 24 h έχει παραχθεί κατά 28,9% υψηλότερη συγκέντρωση αιθανόλης). Ως αποτέλεσμα κρίνεται οι 6 h ρευστοποίησης/σακχαροποίησης είναι επαρκείς. Στον παρακάτω πίνακα, γίνεται σύγκριση της αιθανόλης που παράχθηκε στη συγκεκριμένη εργασία με άλλες μελέτες παραγωγής αιθανόλης από τη διεθνή βιβλιογραφία, με ρευστοποίηση/σακχαροποίηση σε αναμεικτήρα ελεύθερης πτώσης.

Πίνακας 27 Σύγκριση παραγωγής αιθανόλης αυτής της εργασίας με άλλες μελέτες

Βιομάζα	Προκατεργασία	Συγκέντρωση στερεών (% w/w)	Αιθανόλη (g/L)	Απόδοση σε αιθανόλη (%)	Παραγωγικότητα (g/L/h)	Πηγές
Στελέχη καλαμποκιού	Υγρή οξείδωση (40 bar)	20	71,0	67,1	1,48	Παρούσα εργασία
Στελέχη καλαμποκιού	Διαλυμένο οξύ με βιοαποτοξικοποίηση	30	71,4	80,3	0,99	Qureshi, Zhang, & Bao, 2015
Έλατο	Έκρηξη ατμών	25	47,8	72,0	0,34	Hoyer, Galbe, & Zacchi, 2013

Στελέχη καλαμποκιού	Υγρή οξείδωση με έκπλυση	17	52,3	78,0	0,43	Varga, Klinke, Reczey, & Thomsen, 2004
Υπόλειμμα καλαμποκιού	Διαλυμένο οξύ-βάση με έκπλυση	20	75,0	89,4	1,04	Lei, Zhang, Xiao, & Bao, 2014
Καλάμι	Φωσφορικό οξύ-ακετόνη με έκπλυση	36	69,3	74,7	0,57	Li, Kim, Jiang, Kang, & Chang, 2009
Άχυρο ρυζιού	Διαλυμένο οξύ-βάση με έκπλυση	16	58,7	73,4	0,49	W. L. Sun & Tao, 2013
Άδεια τσαμπιά από φρούτα φοίνικα	Αλκαλική με έκπλυση	30	62,5	70,6	0,66	Park et al., 2013
Στελέχη καλαμποκιού	Έκρηξη ατμών με έκπλυση	20	59,8	77,2	0,31	Liu, Qin, Zhu, Li, & Yuan, 2014
Άχυρο σίτου	Έκρηξη ατμών με έκπλυση	25	58,6	56,9	0,73	Alvira, Moreno, Ibarra, Saez, & Ballesteros, 2013
Άχυρο σίτου	Διαλυμένο οξύ με έκπλυση	20	57,0	70,0	0,40	Mohagheghi, Tucker, Grohmann, & Wyman, 1992
Στελέχη καλαμποκιού	Έκρηξη ατμών με έκπλυση	30	49,5	68,2	0,34	Lu et al., 2010
Κατάλοιπα γλυκού σοργού	Υδροθερμική	18	47,9	70,4	0,37	Matsakas & Christakopoulos, 2013

Στον παραπάνω πίνακα σύγκρισης, παρατηρείται ότι στη συγκεκριμένη εργασία η % απόδοση σε αιθανόλη (67,1%) είναι σχετικά χαμηλή σε σχέση με τις περισσότερες οι οποίες έχουν απόδοση, στις περισσότερες περιπτώσεις, >70%. Αυτό μπορεί να οφείλεται σε μειωμένη μετατροπή της κυτταρίνης σε γλυκόζη και μετέπειτα αιθανόλη, ίσως εξαιτίας αυξημένης κρυσταλλικότητας της κυτταρίνης. Όμως η παραγωγικότητα είναι αρκετά μεγαλύτερη απ’

όλες τις υπόλοιπες μέλετες (1,48 g/L/h με την επόμενη μεγαλύτερη 0,99 g/L/h). Αυτό συνέβη επειδή κατά την ζύμωση η συγκέντρωση αιθανόλης κατέληξε σε πλατό πολύ νωρίς (48 h) σε αντίθεση με τις υπόλοιπες.

Βιβλιογραφία

- Adney, B., & Baker, J. (1996). Measurement of Cellulase Activities Laboratory Analytical Procedure (LAP) Issue Date : 08 / 12 / 1996 Measurement of Cellulase Activities Laboratory Analytical Procedure (LAP). *Renewable Energy*, (January), 8. <http://doi.org/10.1016/j.biortech.2006.01.007>
- Alvira, P., Moreno, A. D., Ibarra, D., Saez, F., & Ballesteros, M. (2013). Improving the fermentation performance of *Saccharomyces cerevisiae* by laccase during ethanol production from steam-exploded wheat straw at high-substrate loadings.
- Alvira, P., Tomas-Pejo, E., Ballesteros, M., & Negro, M. J. (2010). Pretreatment technologies for an efficient bioethanol production process based on enzymatic hydrolysis: A review. *Bioresource Technology*, 101(13), 4851–4861. <http://doi.org/10.1016/j.biortech.2009.11.093>
- Balat, M. (2011). Production of bioethanol from lignocellulosic materials via the biochemical pathway: A review. *Energy Conversion and Management*, 52(2), 858–875. <http://doi.org/10.1016/j.enconman.2010.08.013>
- Balat, M., Balat, H., & Oz, C. (2008). Progress in bioethanol processing. *Progress in Energy and Combustion Science*, 34(5), 551–573. <http://doi.org/10.1016/j.pecs.2007.11.001>
- Chundawat, P. S., Venkatesh, B., & Dale, B. E. (2006). Effect of particle size based separation of milled corn stover on AFEX pretreatment and enzymatic digestibility. *Biotechnology and Bioengineering*. <http://doi.org/10.1002/bit>
- Cremonese, P. A., Feroldi, M., Feiden, A., Gustavo Teleken, J., José Gris, D., Dieter, J., ... Antonelli, J. (2015). Current scenario and prospects of use of liquid biofuels in South America. *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, 43, 352–362. <http://doi.org/10.1016/j.rser.2014.11.064>
- Das, D. (2016). Algal biorefinery: An integrated approach. *Algal Biorefinery: An Integrated Approach*, 1–467. <http://doi.org/10.1007/978-3-319-22813-6>
- Deenanath, E. D., Iyuke, S., & Rumbold, K. (2012). The bioethanol industry in sub-Saharan Africa: History, challenges, and prospects. *Journal of Biomedicine and Biotechnology*, 2012. <http://doi.org/10.1155/2012/416491>
- Haghighi Mood, S., Hossein Golfeshan, A., Tabatabaei, M., Salehi Jouzani, G., Najafi, G. H., Gholami, M., & Ardjmand, M. (2013). Lignocellulosic biomass to bioethanol, a comprehensive review with a focus on pretreatment. *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, 27, 77–93. <http://doi.org/10.1016/j.rser.2013.06.033>
- Hallenbeck, P. C., & Ghosh, D. (2012). Microbial technologies in advanced biofuels production. In *Microbial Technologies in Advanced Biofuels Production* (Vol. 9781461412, pp. 1–272). <http://doi.org/10.1007/978-1-4614-1208-3>
- Hoyer, K., Galbe, M., & Zacchi, G. (2013). The effect of prehydrolysis and improved mixing on high-solids batch simultaneous saccharification and fermentation of spruce to ethanol. *Process Biochemistry*, 48(2), 289–293. <http://doi.org/10.1016/j.procbio.2012.12.020>
- Jørgensen, H., Kutter, J. P., & Olsson, L. (2003). Separation and quantification of cellulases and hemicellulases by capillary electrophoresis. *Analytical Biochemistry*, 317(1), 85–93. [http://doi.org/10.1016/S0003-2697\(03\)00052-6](http://doi.org/10.1016/S0003-2697(03)00052-6)
- Katsimpouras, C., Christakopoulos, P., & Topakas, E. (2016). Acetic acid-catalyzed

- hydrothermal pretreatment of corn stover for the production of bioethanol at high-solids content. *Bioprocess and Biosystems Engineering*. <http://doi.org/10.1007/s00449-016-1618-5>
- Kim, S. M., Dien, B. S., Tumbleson, M. E., Rausch, K. D., & Singh, V. (2016). Improvement of sugar yields from corn stover using sequential hot water pretreatment and disk milling. *Bioresource Technology*, *216*, 706–713. <http://doi.org/10.1016/j.biortech.2016.06.003>
- Kim, T. H., Kim, J. S., Sunwoo, C., & Lee, Y. Y. (2003). Pretreatment of corn stover by aqueous ammonia. *Bioresource Technology*, *90*(1), 39–47. [http://doi.org/10.1016/S0960-8524\(03\)00097-X](http://doi.org/10.1016/S0960-8524(03)00097-X)
- Koizumi, T. (2015). Biofuels and food security in developing countries. In *Food Security: Challenges, Role of Biotechnologies and Implications for Developing Countries* (pp. 73–92). Nova Science Publishers, Inc. Retrieved from <http://www.scopus.com/inward/record.url?eid=2-s2.0-84955700762&partnerID=tZOtx3y1>
- Kovarik, B. (1998). Henry Ford, Charles Kettering and the Fuel of the Future. Retrieved May 21, 2016, from <http://www.environmentalhistory.org/billkovarik/about-bk/research/henry-ford-charles-kettering-and-the-fuel-of-the-future/>
- Leblanc, G. E. (1999). Viscosity Measurement.
- Lei, C., Zhang, J., Xiao, L., & Bao, J. (2014). An alternative feedstock of corn meal for industrial fuel ethanol production: Delignified corncob residue. *Bioresource Technology*, *167*, 555–559. <http://doi.org/10.1016/j.biortech.2014.06.005>
- Li, H., Kim, N. J., Jiang, M., Kang, J. W., & Chang, H. N. (2009). Simultaneous saccharification and fermentation of lignocellulosic residues pretreated with phosphoric acid-acetone for bioethanol production. *Bioresource Technology*, *100*(13), 3245–3251. <http://doi.org/10.1016/j.biortech.2009.01.021>
- Liao, W., Heijungs, R., & Huppes, G. (2012). Natural resource demand of global biofuels in the Anthropocene: A review. *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, *16*(1), 996–1003. <http://doi.org/10.1016/j.rser.2011.09.022>
- Liu, Z. H., Qin, L., Zhu, J. Q., Li, B. Z., & Yuan, Y. J. (2014). Simultaneous saccharification and fermentation of steam-exploded corn stover at high glucan loading and high temperature. *Biotechnology for Biofuels*, *7*(1), 167. <http://doi.org/10.1186/s13068-014-0167-x>
- Lu, Y., Wang, Y., Xu, G., Chu, J., Zhuang, Y., & Zhang, S. (2010). Influence of high solid concentration on enzymatic hydrolysis and fermentation of steam-exploded corn stover biomass. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, *160*(2), 360–369. <http://doi.org/10.1007/s12010-008-8306-0>
- Matsakas, L., & Christakopoulos, P. (2013). Fermentation of liquefacted hydrothermally pretreated sweet sorghum bagasse to ethanol at high-solids content. *Bioresource Technology*, *127*, 202–208. <http://doi.org/10.1016/j.biortech.2012.09.107>
- McIntosh, S., Vancov, T., Palmer, J., & Spain, M. (2012). Ethanol production from Eucalyptus plantation thinnings. *Bioresource Technology*, *110*, 264–272. <http://doi.org/10.1016/j.biortech.2012.01.114>
- Miller, G. L. (1959). Use of Dinitrosalicylic Acid Reagent for Determination of Reducing Sugar. *Analytical Chemistry*, *31*(3), 426–428. <http://doi.org/10.1021/ac60147a030>

- Mohagheghi, A., Tucker, M., Grohmann, K., & Wyman, C. (1992). High solids simultaneous saccharification and fermentation of pretreated wheat straw to ethanol.
- Mussatto, S. I., Dragone, G., Guimar??es, P. M. R., Silva, J. P. A., Carneiro, L. M., Roberto, I. C., ... Teixeira, J. A. (2010). Technological trends, global market, and challenges of bio-ethanol production. *Biotechnology Advances*, 28(6), 817–830. <http://doi.org/10.1016/j.biotechadv.2010.07.001>
- Office of the Historians. (n.d.). Oil Embargo, 1973–1974. Retrieved May 21, 2016, from <https://history.state.gov/about>
- Öhgren, K., Vehmaanperä, J., Siika-Aho, M., Galbe, M., Viikari, L., & Zacchi, G. (2007). High temperature enzymatic prehydrolysis prior to simultaneous saccharification and fermentation of steam pretreated corn stover for ethanol production. *Enzyme and Microbial Technology*, 40(4), 607–613. <http://doi.org/10.1016/j.enzmictec.2006.05.014>
- Park, J. M., Oh, B., Seo, J., Hong, W.-K., Yu, A., Sohn, J.-H., & Kim, C. H. (2013). Efficient production of ethanol from empty palm fruit bunch fibers by fed-batch simultaneous saccharification and fermentation using *Saccharomyces cerevisiae*. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, 170(8), 1807–14. <http://doi.org/10.1007/s12010-013-0314-z>
- Park, S., Baker, J. O., Himmel, M. E., Parilla, P. A., & Johnson, D. K. (2010). Cellulose crystallinity index: measurement techniques and their impact on interpreting cellulase performance. *Biotechnology for Biofuels*, 3(1), 10. <http://doi.org/10.1186/1754-6834-3-10>
- Qureshi, A. S., Zhang, J., & Bao, J. (2015). High ethanol fermentation performance of the dry dilute acid pretreated corn stover by an evolutionarily adapted *Saccharomyces cerevisiae* strain. *Bioresource Technology*, 189, 399–404. <http://doi.org/10.1016/j.biortech.2015.04.025>
- R.A. Secco, J.R. deBruyn, M. K. (2013). Fluid Viscosity Measurement 46.1, 46.1–46.30. Retrieved from http://www.kostic.niu.edu/K12208_C046-Viscosity-PR.pdf
- Renewable Fuels Association. (2016). World Fuel Ethanol Production. Retrieved from <http://www.ethanolrfa.org/resources/industry/statistics/#1460747421951-dbb2af4b-686c>
- Reye, J. T., Lu, J., Maxwell, K. E., & Banerjee, S. (2011). Enhancement of cellulase catalysis of wood pulp fiber by cationic polyelectrolytes. *Biomass and Bioenergy*, 35(12), 4887–4891. <http://doi.org/10.1016/j.biombioe.2011.10.011>
- Sarkar, N., Ghosh, S. K., Bannerjee, S., & Aikat, K. (2012). Bioethanol production from agricultural wastes: An overview. *Renewable Energy*, 37(1), 19–27. <http://doi.org/10.1016/j.renene.2011.06.045>
- Segal, L., Creely, J. ., Martin, A. ., & Conrad, C. . (1962). An empirical method for estimating the degree of crystallinity of native cellulose using the X-ray diffractometer, 786–794.
- Sharma, S. (2013). *SpringerBriefs in Molecular Science*. Springer. Retrieved from <http://link.springer.com/content/pdf/10.1007/978-94-007-1454-0.pdf>
- Sluiter, A., Hames, B., Ruiz, R., Scarlata, C., Sluiter, J., Templeton, D., & Nrel, D. C. (2012). Determination of Structural Carbohydrates and Lignin in Biomass Determination of Structural Carbohydrates and Lignin in Biomass, 2011(April 2008).

- Sudiyani, Y., Corneliasari, S., & Adilina, I. B. (2014). Bioethanol G2: Production Process and Recent Studies. In *Environmental Protection* (pp. 345–362).
<http://doi.org/10.1007/978-3-319-07641-6>
- Sun, S., Sun, S., Cao, X., & Sun, R. (2016). The role of pretreatment in improving the enzymatic hydrolysis of lignocellulosic materials. *Bioresource Technology*, *199*, 49–58.
<http://doi.org/10.1016/j.biortech.2015.08.061>
- Sun, W. L., & Tao, W. Y. (2013). Simultaneous saccharification and fermentation of rice straw pretreated by a sequence of dilute acid and dilute alkali at high dry matter content.
- Tomes, D., Lakshmanan, P., & Songstad, D. (2011). *Biofuels*. <http://doi.org/10.1007/978-1-4419-7145-6>
- Varga, E., Klinke, H. B., Reczey, K., & Thomsen, A. B. (2004). High solid simultaneous saccharification and fermentation of wet oxidized corn stover to ethanol. *Biotechnology and Bioengineering*, *88*(5), 567–574. <http://doi.org/10.1002/bit.20222>
- Walker, G. M. (2011). 125th anniversary review: Fuel alcohol: Current production and future challenges. *Journal of the Institute of Brewing*, *117*(1), 3–22.
<http://doi.org/10.1002/j.2050-0416.2011.tb00438.x>
- Xu, Z., & Huang, F. (2014). Pretreatment methods for bioethanol production. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, *174*(1), 43–62. <http://doi.org/10.1007/s12010-014-1015-y>
- Όξενγκιουν-Πετροπούλου, Μ., & Παππά, Α. (2009). *Φυσικές μέθοδοι ανάλυσης* (ΕΜΠ). Αθήνα.
- Χριστακόπουλος, Π., & Τοπακας, Ε. (2013). *Βιοτεχνολογία παραγωγής καυσίμων* (ΕΜΠ). Αθήνα.