



Εθνικό Μετσόβιο Πολυτεχνείο
Σχολή Χημικών Μηχανικών
Τομέας IV: Σύνθεσης & Ανάπτυξης Βιομηχανικών Διαδικασιών
Εργαστήριο Βιοτεχνολογίας

Διπλωματική Εργασία

Παραγωγή βιοαιθανόλης από προκατεργασμένα
με έκρηξη ατμού στελέχη αραβοσίτου και
βελτίωση της διεργασίας με χρήση
ανασυνδυασμένων καινοτόμων βιοκαταλυτών

Μαρία Ζαχαροπούλου

Επιβλέπων: Ευάγγελος Τόπακας, Επίκουρος καθηγητής ΕΜΠ

ΑΘΗΝΑ 2016

Ευχαριστίες

Η παρούσα διπλωματική εργασία εκπονήθηκε στο Εργαστήριο Βιοτεχνολογίας της Σχολής Χημικών Μηχανικών του Εθνικού Μετσόβιου Πολυτεχνείου υπό την επίβλεψη του Επίκουρου Καθηγητή Ε.Μ.Π κ. Ευάγγελου Τόπακα κατά το ακαδημαϊκό έτος 2015-2016, στα πλαίσια της ολοκλήρωσης του κύκλου σπουδών μου στη Σχολή.

Αρχικά, θα ήθελα να εκφράσω τις ευχαριστίες μου στον υπεύθυνο της διπλωματικής εργασίας κ. Τόπακα για την ανάθεση του θέματος, την επιστημονική υποστήριξη και την καθοδήγηση κατά την εκπόνησή του. Ακολούθως, ευχαριστώ θερμά τον υποψήφιο διδάκτορα Κωνσταντίνο Κατσίμπουρα για την προθυμία και την αδιάκοπη συνεισφορά του στα στάδια εκπόνησης και συγγραφής της παρούσας εργασίας.

Ευχαριστώ, ακόμα, το προσωπικό του Εργαστηρίου Βιοτεχνολογίας του ΕΜΠ, για τη συνεργασία και το φιλικό κλίμα καθ' όλη τη διάρκεια εκπόνησης της διπλωματικής μου εργασίας. Ιδιαίτερα ευχαριστώ το συμφοιτητή μου Πάρη Μπίστη για τη συντροφιά του κατά τη διεξαγωγή των πειραμάτων.

Κλείνοντας τον πενταετή κύκλο σπουδών θα ήθελα να ευχαριστήσω όλους τους αγαπημένους φίλους που γνώρισα στη Σχολή και που μου χάρισαν όμορφες στιγμές και τη διάθεση να συνεχίσω, ιδιαίτερα τη Δήμητρα, το Θοδωρή και το Σπύρο.

Τέλος, θερμό ευχαριστώ εκφράζω προς τους γονείς μου, Ανθή και Ηλία και τον αδερφό μου Μάκη, για τη συνεχή τους στήριξη και εμπιστοσύνη καθ' όλη τη διάρκεια των σπουδών μου.

Μαρία Ζαχαροπούλου

Αθήνα, 2016

Περίληψη

Η παρούσα διπλωματική εργασία εστιάζει στην παραγωγή βιοαιθανόλης από στέλεχος αραβοσίτου (corn stover) και στη βελτίωση των επιμέρους σταδίων της διεργασίας. Στο πρώτο μέρος της εργασίας μελετήθηκε η παραγωγή βιοαιθανόλης από στέλεχος αραβοσίτου με διαφορετικές προκατεργασίες και σε συνθήκες υψηλής συγκέντρωσης στερεών (high gravity). Εκπονήθηκαν πειράματα με τρία υλικά τα οποία είχαν προκατεργαστεί με τη μέθοδο έκρηξης ατμού- steam explosion (Δείγματα Α-Γ) και ένα υλικό που είχε προκατεργαστεί με τη μέθοδο organosolv (Δείγμα Δ). Τα δείγματα που είχαν υποστεί έκρηξη ατμού διέφεραν στις συνθήκες της προκατεργασίας και ειδικότερα στη συγκέντρωση προστιθέμενου H_2SO_4 (Δείγμα Α: 0% H_2SO_4 , Δείγμα Β: 0.2% H_2SO_4 , Δείγμα Γ: 1.0% H_2SO_4). Στόχος των πειραμάτων ήταν αφενός η επιλογή της βέλτιστης εκ των συνθηκών κατά την έκρηξη ατμού (Δείγματα Α-Γ) και, αφετέρου, η σύγκριση της αποτελεσματικότητας των δύο μεθόδων προκατεργασίας (Δείγματα Α-Γ και Δ).

Ο κύριος άξονας της εργασίας περιλαμβάνει ανάλυση σύστασης, ανάλυση κρυσταλλικότητας, δοκιμαστική ενζυμική υδρόλυση σε μικρή κλίμακα και ζύμωση σε μικρή κλίμακα, ώστε να διαπιστωθούν οι βέλτιστες συνθήκες κάθε σταδίου της διεργασίας, αλλά και να επιλεγούν τα υλικά με την καλύτερη συμπεριφορά. Στη συνέχεια, για τα δείγματα που επιλέχθηκαν από τις σειρές πειραμάτων ακολούθησε υδρόλυση και ζύμωση σε υψηλές συγκεντρώσεις στερεών (high gravity), με στόχο την επίτευξη υψηλής συγκέντρωσης αιθανόλης στο μίγμα της ζύμωσης.

Αρχικά, η ανάλυση σύστασης των υλικών (πρωτόκολλο NREL) υπέδειξε απομάκρυνση λιγνίνης στο Δείγμα Δ και απομάκρυνση ημικυτταρίνης στα δείγματα που κατεργάστηκαν με έκρηξη ατμού, με τη μεγαλύτερη απομάκρυνση να παρουσιάζεται στο Δείγμα Γ λόγω της υψηλής συγκέντρωσης προστιθέμενου οξέος. Παράλληλα, παρατηρήθηκε υποβάθμιση στο Δείγμα Γ πιθανότατα λόγω υδρόλυσης της κυτταρίνης κατά την προκατεργασία. Η ανάλυση κρυσταλλικότητας των υλικών πραγματοποιήθηκε με περίθλαση ακτίνων Χ και υπέδειξε αύξηση κρυσταλλικότητας των προκατεργασμένων υλικών σε σχέση με την πρώτη ύλη ($CrI_{\text{πρώτης ύλης}} = 55.5$, $CrI_A = 59.8$, $CrI_B = 57.7$, $CrI_\Gamma = 64.8$, $CrI_\Delta = 62.1$), με τη μεγαλύτερη αύξηση να εμφανίζεται στα υλικά από όπου απομακρύνθηκε μεγαλύτερο ποσοστό ημικυτταρίνης ή/και λιγνίνης.

Ακολούθησε ενζυμική υδρόλυση μικρής κλίμακας σε συμβατικό σύστημα ανάδευσης (κωνικές φιάλες) με χαμηλή συγκέντρωση στερεών (10% w/v), όπου ελέγχθηκε η επίδραση της διαφορετικής συγκέντρωσης ενζύμου στην υδρόλυση της βιομάζας συναρτήσει του χρόνου (enzyme loading) για όλα τα υλικά. Παρατηρήθηκε υψηλότερη απελευθέρωση γλυκόζης στα Δείγματα Β και Δ, με τις μέγιστες συγκεντρώσεις γλυκόζης στο πέρας της υδρόλυσης (72h) να διαμορφώνονται ως εξής: Α (49.1 ± 0.99 g/L), Β (53.2 ± 1.23 g/L), Γ (41.7 ± 0.62 g/L), Δ (59.4 ± 0.45 g/L). Οι μέγιστες αποδόσεις υδρόλυσης βάσει της θεωρητικής απελευθερούμενης ποσότητας γλυκόζης κυμαίνονταν στο διάστημα 74%-90%, μέσα στα πλαίσια των τιμών που αναφέρονται στη βιβλιογραφία. Επιλέχθηκε, τέλος,

η συγκέντρωση 12 mg/g DM ως βέλτιστο ενζυμικό φορτίο, η οποία συμβιβάζει την αποτελεσματικότητα της υδρόλυσης και το κόστος του προστιθέμενου ενζύμου.

Στη συνέχεια, έλαβε χώρα ζύμωση μικρής κλίμακας με τον μικροοργανισμό *Saccharomyces cerevisiae* σε κωνικές φιάλες και συγκέντρωση στερεών 10%w/v για τα Δείγματα Α-Δ. Τα υλικά ζυμώθηκαν στις βέλτιστες συνθήκες ενζυμικού φορτίου και χρόνου προϋδρόλυσης που είχαν διαπιστωθεί από τις προηγούμενες σειρές πειραμάτων. Οι μέγιστες συγκεντρώσεις αιθανόλης που επιτεύχθηκαν για τα δείγματα Α-Δ είναι: Α (21.2 g/L), Β (22.7 g/L), Γ (18.4 g/L) και Δ (15.4 g/L). Η χαμηλή συγκέντρωση παραγόμενης αιθανόλης στο Δείγμα Δ, παρά την καλή συμπεριφορά του κατά την υδρόλυση, αποδόθηκε στην πιθανή παρουσία κάποιου παρεμποδιστή της ζύμωσης στο υδρόλυμα.

Από τα προηγούμενα πειράματα μικρής κλίμακας, επιλέχθηκε να μελετηθούν τα Δείγματα Β και Δ σε συνθήκες high gravity (24% w/w), σε μη συμβατικό σύστημα ανάδευσης (αναδευτήρας ελεύθερης πτώσης/ free fall mixer). Διερευνήθηκε αρχικά η απελευθέρωση γλυκόζης κατά την προϋδρόλυση, με τις τιμές συγκέντρωσης για τις 12h και τις 24h να είναι: Β (12h: 130.5 g/L, 24h: 148.3 g/L), Δ (12h: 118.6 g/L, 24h: 141.1 g/L). Κατά τη ζύμωση των υδρολυμάτων, μελετήθηκε η επίδραση της προσθήκης επιπλέον ποσότητας κυτταρινολυτικού ενζύμου για το Δείγμα Β (-/+). Οι μέγιστες συγκεντρώσεις αιθανόλης για το Δείγμα Β ήταν: 12h(-): 64.9 ± 2.96 g/L, 12h(+): 66.5 ± 1.06 g/L, 24h(-): 75.5 ± 4.93 g/L, 24(+): 71.5 ± 1.63 g/L. Το Δείγμα Δ στο ενζυμικό φορτίο 9 mg/g DM παρουσίασε μικρότερη συγκέντρωση αιθανόλης, 64.5 ± 1.28 g/L. Οι συγκεντρώσεις αιθανόλης που επιτεύχθηκαν και στα δύο υλικά είναι από τις υψηλότερες που εμφανίζονται στη βιβλιογραφία για λιγνινοκυτταρινούχα βιομάζα.

Τέλος, πραγματοποιήθηκε υδρόλυση σε διαφορετικές συγκεντρώσεις αρχικών στερεών (6% w/v, 8% w/v, 10% w/v, 12% w/v) ώστε να διαπιστωθεί η επίδραση στην ενζυμική υδρόλυση. Η απόδοση της υδρόλυσης στα συμβατικά συστήματα μειώθηκε σχεδόν γραμμικά με την αύξηση της συγκέντρωσης στερεών, ενώ αυξήθηκε ραγδαία στις υψηλές συγκεντρώσεις στερεών του συστήματος αναδευτήρα ελεύθερης πτώσης. Αποδείχθηκε έτσι η σημασία του συστήματος ανάδευσης για την επιτυχία της διεργασίας.

Στο δεύτερο μέρος της εργασίας, πολλαπλασιάστηκε και εκφράστηκε γονίδιο GH30 με πιθανή ξυλανολυτική δράση (putative xylanase). Στόχος της παραγωγής του καινοτόμου γονιδίου ήταν η διερεύνηση της συνεργιστικής δράσης που πιθανώς να έχει στην υδρόλυση της βιομάζας, ώστε να αυξηθεί ακόμα περισσότερο η απόδοση της συνολικής διεργασίας. Η έκφραση πραγματοποιήθηκε με συνθετικό, codon-optimized, γονίδιο του μικροοργανισμού *Myceliophthora thermophila*. Το γονίδιο πολλαπλασιάστηκε και υπέστη επεξεργασία με τεχνικές ανασυνδυασμένου DNA σε ξενιστή *Escherichia coli* TOP10. Στη συνέχεια, προσαρτήθηκε σε πλασμίδιο pPICZαC, αυξήθηκε και εκφράστηκε σε ζύμη *Pichia pastoris* (στέλεχος X33). Η ενεργότητα του ενζύμου μελετήθηκε με τρυβλίο ελέγχου (Plate Assay) που περιείχε πιθανά υποστρώματα του.

Λέξεις κλειδιά: βιοαιθανόλη, στέλεχος αραβοσίτου (corn stover), έκρηξη ατμού (steam explosion), organosolv, υψηλή συγκέντρωση στερεών (high gravity), αναδευτήρας ελεύθερης πτώσης (free fall mixer), υδρολάση GH30 (CAZy)

Abstract

The present diploma thesis focuses on the production of bioethanol from corn stover and the improvement of the various stages of the production process. In the first part of the thesis the production of bioethanol from corn stover was studied, pertaining to different pretreatment methods and in high gravity conditions. Three steam-exploded samples (A-C) and an organosolv-pretreated sample were tested. Samples A to C differed in the conditions of pretreatment, regarding the added concentration of H₂SO₄ (Sample A: 0% H₂SO₄, Sample B: 0.2% H₂SO₄, Sample C: 1.0% H₂SO₄). It was, firstly, intended to choose the best steam explosion conditions for Samples A-C and, secondly, to compare the efficacy of both pretreatment methods (Samples A-C and D).

The main experimental focus of this work includes biomass composition analysis, crystallinity analysis, enzymatic hydrolysis on a small scale, and fermentation on a small scale, in order to establish the optimal conditions of each process stage, and to select the samples with the best behavior. Afterwards, the samples that were selected from the above series of experiments were hydrolyzed and fermented at high solids concentrations (high gravity), in order to achieve a high concentration of ethanol in the fermentation broth.

To begin with, biomass composition analysis (NREL) indicated removal of lignin in Sample D and removal of hemicellulose in the samples treated by steam explosion. The greatest removal occurred in Sample C because of its high concentration of added acid. Furthermore, deterioration in the Sample C was observed probably due to hydrolysis of cellulose during the pretreatment. Crystallinity analysis of materials was performed by X-ray diffraction and showed increased crystallinity of the samples comparing to the raw material ($CrI_{raw} = 55.5$, $CrI_A = 59.8$, $CrI_B = 57.7$, $CrI_C = 64.8$, $CrI_D = 62.1$). The largest increase appeared in the materials where a greater percentage of hemicellulose and/or lignin was removed.

Furthermore, enzymatic hydrolysis on a small scale in a conventional stirring system (flasks) with a low solids concentration (10% w/v) was performed. The experiment tested the effect of different enzyme concentrations in the hydrolysis of the biomass as a function of time (enzyme loading). There was a higher release of glucose in samples B and D, the maximum glucose concentrations (at 72h) being as follows: A (49.1 ± 0.99 g/L), B (53.2 ± 1.23 g/L), C (41.7 ± 0.62 g/L), D (59.4 ± 0.45 g/L). The maximum hydrolysis yields - based on the theoretical amount of glucose released- ranged in the interval 74%-90% (within the values reported in the literature). Finally, the concentration of 12 mg/g DM was chosen as the optimal enzyme load, which compromises the efficiency of hydrolysis and the cost of the added enzyme.

Moreover, fermentation was held on a small scale in flasks using the microorganism *Saccharomyces cerevisiae* and in 10% w/v solids concentration. The materials were treated in the optimal enzyme load that had been established by the previous series of

experiments. The maximum ethanol concentrations obtained for samples A-D were: A (21.2 g/L), B (22.7 g/L), C (18.4 g/L) and D (15.4 g/L). The low concentration of ethanol produced in Sample D, despite its good behavior upon hydrolysis, was attributed to the possible presence of a fermentation inhibitor in the hydrolysate.

From the above small-scale experiments, samples B and D were selected to be studied in high gravity conditions (24% w/w), in a non-conventional stirring system (free fall mixer). The glucose concentration values for 12h and 24h pre-hydrolysis were: B (12h: 130.5 g/L, 24h: 148.3 g/L), D (12h: 118.6 g/L, 24h: 141.1 g/L). During the fermentation of the hydrolyzate, the effect of adding an additional quantity of cellulolytic enzyme was studied for Sample B (-/+). The maximum concentrations of ethanol for Sample B were: 12h (-): 64.9 ± 2.96 g/L, 12h (+): 66.5 ± 1.06 g/L, 24h (-): 75.5 ± 4.93 g/L, 24 (+): 71.5 ± 1.63 g/L. Sample D showed a lower concentration of ethanol: 64.5 ± 1.28 g/L. The ethanol concentrations achieved in both materials are among the highest displayed in literature of lignocellulosic biomass.

Finally, hydrolysis at different solids concentrations (6% w/v, 8% w/v, 10% w/v, 12% w/v) was tested to determine the effect on enzyme hydrolysis. The hydrolysis yield decreased almost linearly with the increasing concentration of solids in conventional systems, but grew rapidly at high solids concentrations of the free fall mixer system. Thus the importance of the stirring system on the efficacy of the process was demonstrated.

In the second part of the present thesis, a GH30 (CAZy) gene with a putative xylanolytic action was multiplied and expressed. The aim of the novel enzyme production was to investigate the synergistic effect that it may have on the hydrolysis of biomass, to increase further the efficiency of the overall process. The expression was carried out with a synthetic, codon-optimized gene of the microorganism *Myceliophthora thermophila*. The gene was amplified and treated with DNA techniques, and was inserted in the host microorganism *Escherichia coli* (strain TOP10). It was then attached to the plasmid pPICZaC and expressed in *Pichia pastoris* cells (strain X33). The activity of the enzyme was studied by Plate Assay, with a plate containing its potential substrates.

Keywords: bioethanol, corn stover, steam explosion pretreatment, organosolv pretreatment, high gravity enzymatic hydrolysis, free fall mixer, glucosyl-hydrolase GH30 (CAZy)

Περιεχόμενα

| | |
|--|----|
| Εισαγωγή | 1 |
| Θεωρητικό μέρος | |
| Κεφάλαιο 1: Αξιοποίηση Βιομάζας προς παραγωγή Βιοκαυσίμων | 3 |
| 1.1 Βιομάζα και Βιοκαύσιμα..... | 3 |
| 1.2 Βιοαιθανόλη | 3 |
| 1.3 Πρώτες ύλες και γενιές βιοκαυσίμων | 4 |
| 1.4 Αξιοποίηση πρώτων υλών λιγνινοκυτταρινούχας βιομάζας..... | 5 |
| 1.4.1 Σύσταση κυτταρικού τοιχώματος φυτών | 6 |
| 1.4.2 Κυτταρίνη..... | 7 |
| 1.4.3 Ημικυτταρίνη | 8 |
| 1.4.4 Λιγνίνη | 9 |
| 1.4.5 Τέφρα..... | 10 |
| 1.4.6 Σύσταση λιγνινοκυτταρινούχων υλικών..... | 10 |
| 1.5 Αραβόσιτος-Corn stover | 11 |
| Κεφάλαιο 2: Διεργασία παραγωγής βιοαιθανόλης | 12 |
| 2.1 Προκατεργασία βιομάζας..... | 12 |
| 2.1.1 Στόχος προκατεργασίας βιομάζας..... | 12 |
| 2.1.1.1 Φυσικές μέθοδοι προκατεργασίας | 14 |
| 2.1.1.2 Βιολογικές μέθοδοι προκατεργασίας..... | 14 |
| 2.1.1.3 Χημικές μέθοδοι προκατεργασίας | 15 |
| 2.1.1.4 Φυσικοχημικές μέθοδοι | 17 |
| 2.1.2 Σύγκριση-Πλεονεκτήματα-Μειονεκτήματα | 23 |
| 2.2 Υδρόλυση βιομάζας | 24 |
| 2.2.1 Χημική υδρόλυση..... | 24 |
| 2.2.2 Ενζυμική υδρόλυση..... | 24 |
| 2.3 Αλκοολική ζύμωση..... | 29 |
| 2.3.1 Αλκοολική ζύμωση λιγνινοκυτταρινούχας βιομάζας | 29 |
| 2.3.2 Μικροοργανισμοί που χρησιμοποιούνται..... | 29 |
| 2.3.3 Παρεμποδιστές της ζύμωσης..... | 31 |
| 2.4 Διεργασίες παραγωγής αιθανόλης από λιγνινοκυτταρινούχα βιομάζα | 32 |
| 2.4.1 Διακριτή υδρόλυση και ζύμωση (Separate Hydrolysis and Fermentation)..... | 32 |

| | |
|---|-----------|
| 2.4.2 Ταυτόχρονη σακχαροποίηση και ζύμωση (Simultaneous Saccharification and Fermentation-SSF)..... | 32 |
| 2.4.3 Ενοποιημένη Βιοδιεργασία (Consolidated Bioprocess-CBP)..... | 32 |
| 2.5 Εμπορικές εφαρμογές παραγωγής βιοαιθανόλης από λιγνινοκυτταρινούχα βιομάζα | 33 |
| Κεφάλαιο 3: Χρήση ξυλανασών στην υδρόλυση της βιομάζας | 35 |
| 3.1 Ημικυτταρινάσες-Ξυλανάσες | 35 |
| 3.2 Ένζυμα της οικογένειας GH30 | 36 |
| 3.3 <i>Myceliophthora Thermophila</i> | 36 |
| Πειραματικό μέρος | |
| Κεφάλαιο 4: Υλικά και μέθοδοι | 37 |
| 4.1 Υλικά..... | 37 |
| 4.1.1 Πρώτη ύλη στελέχους αραβοσίτου | 37 |
| 4.1.2 Μικροοργανισμοί..... | 37 |
| 4.1.3 Χημικά αντιδραστήρια-Αναλώσιμα υλικά..... | 39 |
| 4.1.4 Εμπορικά ένζυμα | 39 |
| 4.1.5 Ρυθμιστικά διαλύματα..... | 39 |
| 4.1.6 Τυποποιημένα πακέτα μεθόδων | 40 |
| 4.1.7 Θρεπτικά υλικά | 40 |
| 4.1.8 Φορείς κλωνοποίησης | 41 |
| 4.1.9 Υλικά και στήλες χρωματογραφίας | 43 |
| 4.1.10 Συσκευές και όργανα | 43 |
| 4.2 Εποπτική θεώρηση της πειραματικής διαδικασίας | 44 |
| 4.3 Μέθοδοι..... | 45 |
| 4.3.1 Μέτρηση ολικών αναγωγικών σακχάρων με τη μέθοδο DNS..... | 45 |
| 4.3.2 Μέτρηση γλυκόζης..... | 46 |
| 4.3.3 Μέτρηση ενεργότητας κυτταρινασών | 46 |
| 4.3.4 Ανάλυση σύστασης στελεχών αραβοσίτου | 49 |
| 4.3.5 Ανάλυση κρυσταλλικότητας πρώτης ύλης με περίθλαση ακτίνων X- XRD | 50 |
| 4.3.6 Υδρόλυση στελεχών αραβοσίτου | 51 |
| 4.3.7 Ζύμωση υδρολυμάτων στελεχών αραβοσίτου | 56 |
| 4.3.8 Προσδιορισμός αιθανόλης με υγρή χρωματογραφία- HPLC | 57 |
| 4.3.9 Μέτρηση ιξώδους υδρολυμάτων | 59 |

| | |
|--|----|
| 4.3.10 Έκφραση γονιδίου <i>Myceliophthora Thermophila</i> οικογένειας GH30 για την παραγωγή καινοτόμου βιοκαταλύτη | 59 |
|--|----|

Αποτελέσματα

| | |
|---|-----------|
| Κεφάλαιο 5: Ανάλυση σύστασης και κρυσταλλικότητας υλικών | 67 |
|---|-----------|

| | |
|---------------------------|----|
| 5.1 Ανάλυση σύστασης..... | 67 |
|---------------------------|----|

| | |
|------------------------------------|----|
| 5.2 Ανάλυση κρυσταλλικότητας | 70 |
|------------------------------------|----|

| | |
|---|-----------|
| Κεφάλαιο 6: Ενζυμική υδρόλυση..... | 75 |
|---|-----------|

| | |
|---|----|
| 6.1 Προσδιορισμός ενεργότητας κυτταρινολυτικού σκευάσματος..... | 75 |
|---|----|

| | |
|--|----|
| 6.2 Μελέτη της υδρόλυσης συναρτήσει της συγκέντρωσης ενζύμου(enzyme loading) | 75 |
|--|----|

| | |
|---|-----------|
| Κεφάλαιο 7: Ζύμωση υδρολυμάτων | 92 |
|---|-----------|

| | |
|--|----|
| 7.1 Ζύμωση υλικών προκατεργασμένων με έκρηξη ατμού | 92 |
|--|----|

| | |
|--|----|
| 7.2 Ζύμωση υλικού προκατεργασμένου με τη μέθοδο organosolv | 94 |
|--|----|

| | |
|---|-----------|
| Κεφάλαιο 8: Υδρόλυση και ζύμωση σε υψηλές συγκεντρώσεις στερεών..... | 97 |
|---|-----------|

| | |
|---|----|
| 8.1 Σακχαροποίηση σε αντιδραστήρα free fall mixer | 97 |
|---|----|

| | |
|--|-----|
| 8.2 Προσδιορισμός παραγόμενης αιθανόλης..... | 101 |
|--|-----|

| | |
|---|-----|
| 8.3 Επίδραση της συγκέντρωσης στερεών στην απόδοση της διεργασίας | 110 |
|---|-----|

| | |
|---|------------|
| Κεφάλαιο 9: Παραγωγή καινοτόμου βιοκαταλύτη της οικογένειας GH30 (CAZy)..... | 112 |
|---|------------|

Συμπεράσματα και συζήτηση

| | |
|--|------------|
| Κεφάλαιο 10: Συμπεράσματα και συζήτηση..... | 115 |
|--|------------|

| | |
|---|-----|
| 10.1 Συνοπτικά αποτελέσματα και συμπεράσματα- βιβλιογραφική επισκόπηση..... | 115 |
|---|-----|

| | |
|-----------------------------------|-----|
| 10.2 Μελλοντικές προκλήσεις | 118 |
|-----------------------------------|-----|

Βιβλιογραφία

Κατάλογος διαγραμμάτων

| | |
|---|----|
| Διάγραμμα 1.1: Παγκόσμια παραγωγή βιοαιθανόλης (εκατομμύρια γαλόνια) ανά Χώρα/Περιοχή και Έτος | 4 |
| Διάγραμμα 5.1: Ποσοστό κυτταρίνης στα δείγματα στελέχους αραβοσίτου με διαφορετικές συνθήκες προκατεργασίας, σε σύγκριση με το ποσοστό κυτταρίνης ακατέργαστου στελέχους αραβοσίτου | 68 |
| Διάγραμμα 5.2: Ποσοστιαία απομάκρυνση ημικυτταρίνης από το στέλεχος αραβοσίτου (δείγματα Α-Δ). | 69 |
| Διάγραμμα 5.3: Διάγραμμα ανάλυσης κρυσταλλικότητας μέσω XRD για την ακατέργαστη πρώτη ύλη (στέλεχος αραβοσίτου), και τα Δείγματα Α-Δ | 70 |
| Διάγραμμα 5.4: Διάγραμμα ανάλυσης κρυσταλλικότητας μέσω XRD για την ακατέργαστη πρώτη ύλη (στέλεχος αραβοσίτου)..... | 71 |
| Διάγραμμα 5.5: Διάγραμμα ανάλυσης κρυσταλλικότητας μέσω XRD για το Δείγμα Α (έκρηξη ατμού, 0% H ₂ SO ₄)..... | 71 |
| Διάγραμμα 5.6: Διάγραμμα ανάλυσης κρυσταλλικότητας μέσω XRD για το Δείγμα Β (έκρηξη ατμού, 0.2% H ₂ SO ₄)..... | 72 |
| Διάγραμμα 5.7: Διάγραμμα ανάλυσης κρυσταλλικότητας μέσω XRD για το Δείγμα Γ (έκρηξη ατμού, 1% H ₂ SO ₄)..... | 72 |
| Διάγραμμα 5.8: Διάγραμμα ανάλυσης κρυσταλλικότητας μέσω XRD για το Δείγμα Δ (organosolv)..... | 78 |
| Διάγραμμα 6.1: Χρονική εξέλιξη της απελευθέρωσης ολικών αναγωγικών σακχάρων για το δείγμα Α (0% H ₂ SO ₄)..... | 75 |
| Διάγραμμα 6.2: Χρονική εξέλιξη της απελευθέρωσης γλυκόζης για το δείγμα Α (0% H ₂ SO ₄). | 76 |
| Διάγραμμα 6.3: Απελευθέρωση γλυκόζης στις 4h συναρτήσει των ενζυμικών φορτίων για το Δείγμα Α (0% H ₂ SO ₄) | 78 |
| Διάγραμμα 6.4: Ποσοστιαία ενζυμική υδρόλυση κυτταρίνης για τα ενζυμικά φορτία συναρτήσει του χρόνου υδρόλυσης, για το Δείγμα Α (0% H ₂ SO ₄)..... | 78 |

| | |
|--|----|
| Διάγραμμα 6.5: Χρονική εξέλιξη της απελευθέρωσης ολικών αναγωγικών σακχάρων για το δείγμα Β (0.2% H ₂ SO ₄)..... | 80 |
| Διάγραμμα 6.6: Χρονική εξέλιξη της απελευθέρωσης γλυκόζης για το δείγμα Β (0.2% H ₂ SO ₄).. | 80 |
| Διάγραμμα 6.7: Απελευθέρωση γλυκόζης στις 4h συναρτήσει των ενζυμικών φορτίων για το Δείγμα Β (0.2% H ₂ SO ₄) | 81 |
| Διάγραμμα 6.8: Ποσοστιαία ενζυμική υδρόλυση κυτταρίνης για τα ενζυμικά φορτία συναρτήσει του χρόνου υδρόλυσης, για το Δείγμα Β (0.2% H ₂ SO ₄)..... | 82 |
| Διάγραμμα 6.9: Χρονική εξέλιξη της απελευθέρωσης ολικών αναγωγικών σακχάρων για το δείγμα Γ (1% H ₂ SO ₄). Α)..... | 83 |
| Διάγραμμα 6.10: Χρονική εξέλιξη της απελευθέρωσης γλυκόζης για το δείγμα Γ (1% H ₂ SO ₄). | 83 |
| Διάγραμμα 6.11: Απελευθέρωση γλυκόζης στις 4h συναρτήσει των ενζυμικών φορτίων για το Δείγμα Γ (1% H ₂ SO ₄)..... | 85 |
| Διάγραμμα 6.12: Ποσοστιαία ενζυμική υδρόλυση κυτταρίνης για τα ενζυμικά φορτία συναρτήσει του χρόνου υδρόλυσης, για το Δείγμα Γ (1% H ₂ SO ₄)..... | 85 |
| Διάγραμμα 6.13: Χρονική εξέλιξη της απελευθέρωσης ολικών αναγωγικών σακχάρων για το δείγμα Δ (organosolv). | 87 |
| Διάγραμμα 6.14: Χρονική εξέλιξη της απελευθέρωσης γλυκόζης για το δείγμα Δ (organosolv). | 87 |
| Διάγραμμα 6.15: Απελευθέρωση γλυκόζης στις 2h συναρτήσει των ενζυμικών φορτίων για το Δείγμα Δ (organosolv)..... | 89 |
| Διάγραμμα 6.16: Ποσοστιαία ενζυμική υδρόλυση κυτταρίνης για τα ενζυμικά φορτία συναρτήσει του χρόνου υδρόλυσης, για το Δείγμα Δ (organosolv) | 89 |
| Διάγραμμα 6.17: Χρονική εξέλιξη της συγκέντρωσης γλυκόζης στο βέλτιστο ενζυμικό φορτίο (12 mg/g DM) για τα δείγματα Α-Δ και για την ακατέργαστη βιομάζα. | 90 |
| Διάγραμμα 7.1: Χρονική εξέλιξη γλυκόζης και αιθανόλης κατά τη ζύμωση για τα προκατεργασμένα υλικά με έκρηξη ατμού | 93 |

| | |
|--|-----|
| Διάγραμμα 7.2: Χρονική εξέλιξη γλυκόζης και αιθανόλης κατά τη ζύμωση για το προκατεργασμένο υλικό με τη μέθοδο organosolv..... | 95 |
| Διάγραμμα 8.1: Συγκέντρωση ολικών αναγωγικών σακχάρων-TSR και γλυκόζης συναρτήσει του χρόνου κατά την υδρόλυση high gravity του Δείγματος Β (0.2% H ₂ SO ₄).. | 97 |
| Διάγραμμα 8.2: Συγκέντρωση ολικών αναγωγικών σακχάρων-TSR και γλυκόζης συναρτήσει του χρόνου κατά την υδρόλυση high gravity Δείγματος Δ (organosolv) | 97 |
| Διάγραμμα 8.3: Εξέλιξη δυναμικού ιώδους κατά την υδρόλυση High Gravity του Δείγματος Β (0.2% H ₂ SO ₄)..... | 98 |
| Διάγραμμα 8.4: Εξέλιξη δυναμικού ιώδους κατά την υδρόλυση High Gravity του Δείγματος Δ (organosolv)..... | 99 |
| Διάγραμμα 8.5: Χρονική εξέλιξη της συγκέντρωσης αιθανόλης για τις σειρές πειραμάτων 12 (-)και 12(+), στο Δείγμα Β (0.2 % H ₂ SO ₄). | 103 |
| Διάγραμμα 8.6: Χρονική εξέλιξη της συγκέντρωσης αιθανόλης για τις σειρές πειραμάτων 24 (-) και 24 (+), στο Δείγμα Β (0.2 % H ₂ SO ₄)..... | 104 |
| Διάγραμμα 8.7: Χρονική εξέλιξη της συγκέντρωσης γλυκόζης και αιθανόλης κατά τη ζύμωση-high gravity για προϋδρόλυση 12h, για το Δείγμα Β (0.2% H ₂ SO ₄)..... | 104 |
| Διάγραμμα 8.8: Χρονική εξέλιξη της συγκέντρωσης γλυκόζης και αιθανόλης κατά τη ζύμωση-high gravity για προϋδρόλυση 24h, για το Δείγμα Β (0.2% H ₂ SO ₄)..... | 105 |
| Διάγραμμα 8.9: Χρονική εξέλιξη της συγκέντρωσης γλυκόζης και αιθανόλης κατά τη ζύμωση-high gravity για προϋδρόλυση 12h και 24h, για το Δείγμα Β (0.2% H ₂ SO ₄) | 105 |
| Διάγραμμα 8.10: Χρονική εξέλιξη της συγκέντρωσης γλυκόζης και αιθανόλης κατά τη ζύμωση-high gravity για προϋδρόλυση 12h και 24h, για το Δείγμα Δ (organosolv)..... | 107 |
| Διάγραμμα 8.11: Συγκέντρωση γλυκόζης και αιθανόλης συναρτήσει του χρόνου για τα Δείγματα Β (0.2% H ₂ SO ₄) και Δ (organosolv)..... | 108 |
| Διάγραμμα 8.12: Απελευθέρωση γλυκόζης κατά την ενζυμική υδρόλυση στο βέλτιστο ενζυμικό φορτίο (solids loading)..... | 109 |
| Διάγραμμα 8.13: Ποσοστιαία υδρόλυση κυτταρίνης για συγκεντρώσεις στερεών 6%, 8%, 10%, 12% (ανάμιξη σε συμβατικά συστήματα) και 24% (ανάμιξη σε αντιδραστήρα free fall mixer). | 112 |

Κατάλογος σχημάτων

| | |
|--|----|
| Σχήμα 1.1: Δομή φυτικών κυττάρων (α) και τυπική δομή πρωτογενούς κυτταρικού τοιχώματος (β)..... | 7 |
| Σχήμα 1.2: Δομή κυτταρίνης. Εντός της αγκύλης περιέχεται η επαναλαμβανόμενη δομική μονάδα κελλοβιόζης..... | 8 |
| Σχήμα 1.3: Πιθανή δομή ξυλάνης. Οι πιθανοί υποκαταστάτες (πεντόζες, φαινυλικού υποκαταστάτες κ.ο.κ.) εμφανίζονται έγχρωμοι..... | 9 |
| Σχήμα 1.4: Τυπική δομή λιγνίνης. Εμφανίζονται έγχρωμα οι τρεις μονομερείς αλκοόλες της λιγνίνης..... | 10 |
| Σχήμα 1.5: Στέλεχος αραβοσίτου μετά τη συγκομιδή από τον αγρό, προ της άλεσής του. Διακρίνονται τα υπολείμματα φύλων και μίσχων του φυτού..... | 11 |
| Σχήμα 2.1: Στόχος της προκατεργασίας είναι η ρήξη των κρυσταλλικών περιοχών της κυτταρίνης και ο διαχωρισμός από τη λιγνίνη και την ημικυτταρίνη..... | 13 |
| Σχήμα 2.2: Σχηματική απεικόνιση της προκατεργασίας έκρηξης ατμού. Η απότομη εναλλαγή φάσης του νερού ανάμεσα σε υγρό και ατμό οδηγεί σε διάσπαση της δομής της βιομάζας και διαλυτοποίηση της ημικυτταρίνης..... | 22 |
| Σχήμα 2.3: Αναπαράσταση της συνεργιστικής λειτουργίας μεταξύ κυτταρινασών για την υδρόλυση της κυτταρίνης..... | 25 |
| Σχήμα 2.4: Δομή εξωγλουκανάσης του μικροοργανισμού <i>T. reesei</i> , (καταλυτική υπομονάδα, υπομονάδα πρόσδεσης σακχάρων και συνδετικό πεπτίδιο) | 26 |
| Σχήμα 2.5: Διαγραμματική απεικόνιση των διεργασιών παραγωγής βιοαιθανόλης από λιγνινοκυτταρινούχα βιομάζα..... | 33 |
| Σχήμα 2.6: Τα εργοστάσια παραγωγής βιοαιθανόλης δεύτερης γενιάς στο Kalundborg της εταιρείας Inbicon και στη Nevada της εταιρείας DuPont | 34 |

| | |
|---|-----|
| Σχήμα 4.1: Χάρτης των περιοχών του πλασμιδίου pPICZαC (Thermofisher Scientific)..... | 42 |
| Σχήμα 4.2: Εποπτική θεώρηση της πειραματικής διαδικασίας- διάγραμμα ροής παραγωγής βιοαιθανόλης..... | 44 |
| Σχήμα 4.3: Διάγραμμα ροής παραγωγής βιοκαταλύτη με πιθανή ξυλανολυτική δράση...45 | |
| Σχήμα 4.4: Ο εργαστηριακός αναδευτήρας ελεύθερης πτώσης (free fall mixer)..... | 57 |
| Σχήμα 4.5: Σχηματική αναπαράσταση του συστήματος HPLC. Διακρίνονται τα βασικά του συστατικά στοιχεία: σύστημα παροχής κινητής φάσεως, σύστημα εισαγωγής δείγματος, στήλη, ανιχνευτής και καταγραφέας..... | 58 |
| Σχήμα 4.6: Χάρτης πλασμιδίου pEX-K4 (φορέα συνθετικού γονιδίου)..... | 60 |
| Σχήμα 8.1: Ρευστοποίηση μίγματος κατά την ενζυμική υδρόλυση σε συνθήκες υψηλής αρχικής συγκέντρωσης στερεών (high gravity) | 100 |
| Σχήμα 9.1: Ηλεκτροφόρηση αγαρόζης για τον έλεγχο της αντίδρασης πέψης με περιοριστικά ένζυμα..... | 111 |
| Σχήμα 9.2: Σχηματισμός αποικιών σε θρεπτικό μέσο LB+Zeocin μετά την αντίδραση λιγάσης για τις σειρές A-C και D-E (control)..... | 112 |
| Σχήμα 9.3: Ηλεκτροφόρηση αγαρόζης για τον έλεγχο της πρόσληψης ανασυνδυασμένου πλασμιδίου από τα κύτταρα μετά την αντίδραση λιγάσης..... | 113 |
| Σχήμα 9.4: Ηλεκτροφόρηση αγαρόζης για τον έλεγχο αντίδρασης γραμμικοποίησης..... | 113 |

Κατάλογος πινάκων

| | |
|--|----|
| Πίνακας 1.1: Σύσταση λιγνινοκυτταρινούχας βιομάζας για την παραγωγή βιοκαυσίμων (Saha 2003) | 10 |
| Πίνακας 2.1: Σύνοψη των σημαντικότερων μεθόδων προκατεργασίας, επίδρασης στη βιομάζα και τα παραγόμενα προϊόντα και μειονεκτημάτων και περιορισμών που παρουσιάζονται..... | 23 |
| Πίνακας 4.1: Ρυθμιστικά διαλύματα που χρησιμοποιήθηκαν και σύσταση αυτών..... | 39 |
| Πίνακας 4.2: Θρεπτικά υλικά που χρησιμοποιήθηκαν και σύσταση αυτών (μέρος Β: παραγωγή καινοτόμου βιοκαταλύτη)..... | 40 |
| Πίνακας 4.3: Αραιώσεις για την κατασκευή πρότυπων διαλυμάτων γλυκόζης (μέτρηση ενεργότητας κυτταρινασών) | 48 |
| Πίνακας 4.5: Αραιώσεις ενζυμικού σκευάσματος Cellic CTec2 για την επίτευξη των επιθυμητών ενζυμικών φορτίων (enzyme loading)..... | 52 |
| Πίνακας 4.6: Σύσταση των μιγμάτων αντίδρασης λιγάνης (Α-Ε). Παρουσιάζονται τα δείγματα αντίδρασης (Α-Ε) και τα δείγματα control (D,E) | 64 |
| Πίνακας 5.1: Αποτελέσματα ανάλυσης σύστασης ακατέργαστης πρώτης ύλης και δειγμάτων Α-Δ (διαφορετικές συνθήκες προκατεργασίας)..... | 67 |
| Πίνακας 5.2: Ανάλυση κρυσταλλικότητας για τα Δείγματα Α-Δ και την ακατέργαστη πρώτη ύλη..... | 73 |
| Πίνακας 6.1: Στοιχεία κυτταρινολυτικής ενεργότητας σκευάσματος Cellic CTec2 (Novozymes)..... | 75 |
| Πίνακας 6.2: Συγκέντρωση Γλυκόζης και Ολικών Αναγωγικών Σακχάρων στο βέλτιστο ενζυμικό φορτίο (12 mg/g DM) για το Δείγμα Α (0% H ₂ SO ₄) | 78 |
| Πίνακας 6.3: Συγκέντρωση Γλυκόζης και Ολικών Αναγωγικών Σακχάρων στο βέλτιστο ενζυμικό φορτίο (12 mg/g DM) για το Δείγμα Β (0.2% H ₂ SO ₄) | 80 |
| Πίνακας 6.4: Συγκέντρωση Γλυκόζης και Ολικών Αναγωγικών Σακχάρων στο βέλτιστο ενζυμικό φορτίο (12 mg/g DM) για το Δείγμα Γ (1% H ₂ SO ₄)..... | 85 |
| Πίνακας 6.5: Ποσοστιαία υδρόλυση βιομάζας στις 72h σε ενζυμικό φορτίο 12mg/g DM για τα Δείγματα Α-Γ (έκρηξη ατμού) σε συγκέντρωση στερεών 10%..... | 86 |

| | |
|---|-----|
| Πίνακας 6.6: Συγκέντρωση Γλυκόζης και Ολικών Αναγωγικών Σακχάρων στο βέλτιστο ενζυμικό φορτίο (9 mg/g DM) για το Δείγμα Δ (organosolv)..... | 89 |
| Πίνακας 6.7: Χρονική εξέλιξη της συγκέντρωσης γλυκόζης στο βέλτιστο ενζυμικό φορτίο (12 mg/g DM) για τα δείγματα Α-Δ και για την ακατέργαστη βιομάζα..... | 91 |
| Πίνακας 7.1: Χρονική εξέλιξη της συγκέντρωσης αιθανόλης (mg/mL) για τα Δείγματα Α-Γ κατά τη ζύμωση σε μικρή κλίμακα..... | 92 |
| Πίνακας 7.2: Χρονική εξέλιξη της συγκέντρωσης γλυκόζης (mg/mL) για τα Δείγματα Α-Γ κατά τη ζύμωση σε μικρή κλίμακα..... | 93 |
| Πίνακας 7.3: Παραγωγικότητα αιθανόλης (mg/mL/h) για τα Δείγματα Α-Γ κατά τη ζύμωση σε μικρή κλίμακα..... | 93 |
| Πίνακας 7.4: Χρονική εξέλιξη των συγκεντρώσεων γλυκόζης και αιθανόλης για τα διαφορετικά ενζυμικά φορτία, για το Δείγμα Δ (organosolv) | 95 |
| Πίνακας 7.5: Παραγωγικότητα αιθανόλης (mg/mL/h) για το Δείγμα Δ και τα ενζυμικά φορτία 9 mg/g DM και 12 mg/g DM κατά τη ζύμωση σε μικρή κλίμακα | 95 |
| Πίνακας 8.1: Συγκέντρωση αιθανόλης συναρτήσει του χρόνου ζύμωσης για τις σειρές 12(-), 12(+), 24(-), 24(+), στο πείραμα high gravity Δείγματος Β (0.2% H ₂ SO ₄) | 102 |
| Πίνακας 8.2: Συγκέντρωση γλυκόζης συναρτήσει του χρόνου ζύμωσης για τις σειρές 12(-), 12(+), 24(-), 24(+), στο πείραμα high gravity Δείγματος Β (0.2% H ₂ SO ₄) | 102 |
| Πίνακας 8.3: Μέγιστη συγκέντρωση αιθανόλης και απόδοση αιθανόλης για τις διαφορετικές σειρές πειραμάτων high gravity, Δείγμα Β (0.2% H ₂ SO ₄) | 104 |
| Πίνακας 8.4: Συγκέντρωση αιθανόλης και γλυκόζης συναρτήσει του χρόνου ζύμωσης για τις σειρές 12h, 24h στο πλαίσιο του πειράματος high gravity Δείγματος Δ (organosolv) | 107 |
| Πίνακας 8.5: Μέγιστη συγκέντρωση αιθανόλης και απόδοση αιθανόλης για τις διαφορετικές σειρές πειραμάτων high gravity, Δείγμα Δ (organosolv) | 108 |
| Πίνακας 10.1: Βιβλιογραφική επισκόπηση της απόδοσης σε αιθανόλη διαφορετικών προκατεργασμένων λιγνινοκυτταρινούχων υλικών | 117 |

Εισαγωγή

Η αύξηση των αερίων του θερμοκηπίου στην ατμόσφαιρα και η υπερθέρμανση του πλανήτη τις τελευταίες δεκαετίες, τείνει να στρέψει διεθνώς την έρευνα προς τις καθαρές τεχνολογίες και τις ανανεώσιμες πηγές ενέργειας. Απώτερος στόχος είναι οι ανανεώσιμες πηγές να αποτελέσουν βιώσιμη και ανταγωνιστική εναλλακτική των ορυκτών καυσίμων, ώστε να περισταλούν οι επιπτώσεις των αυξημένων εκπομπών στο παγκόσμιο κλίμα. Υπό το πρίσμα αυτής της τάσης, τα βιοκαύσιμα παρουσιάζονται ως πιθανή λύση για τη μείωση της εξάρτησης από το πετρέλαιο και την ελάττωση των εκπομπών διοξειδίου του άνθρακα. Τα βιοκαύσιμα προέρχονται από τη βιομάζα, η οποία αποτελεί πηγή ενέργειας που ανανεώνεται συνεχώς, λόγω της φωτοσυνθετικής ικανότητας των φυτικών οργανισμών.

Η βιοαιθανόλη αποτελεί το πιο διαδεδομένο βιοκαύσιμο και χρησιμοποιείται κυρίως για την καύση σε βενζινοκινητήρες καθαρή ή αναμειγμένη με βενζίνη (flex-fuel). Παράγεται με ζύμωση από υδρολυμένη βιομάζα, είτε σακχαρούχου, αμυλούχου είτε λιγνινοκυτταρινούχου τύπου. Βιομηχανικές εφαρμογές παραγωγής σε μεγάλη κλίμακα έχουν πραγματοποιηθεί για τις πρώτες δύο κατηγορίες βιομάζας (οι οποίες κατεργάζονται με μεγαλύτερη ευκολία), ειδικά σε χώρες όπως η Βραζιλία. Ωστόσο, η χρήση σακχαρούχων και αμυλούχων πηγών δεν κρίνεται βιώσιμη, καθώς ανταγωνίζεται τη βιομηχανία τροφίμων, επομένως η έρευνα έχει στραφεί στην αξιοποίηση της λιγνινοκυτταρινούχας βιομάζας. Η λιγνινοκυτταρινούχα βιομάζα αποτελεί απόρριμμα, επομένως η μετατροπή της σε προϊόν προστιθέμενης αξίας είναι ιδιαίτερα συμφέρουσα, ωστόσο η αξιοποίησή της παρουσιάζει προκλήσεις.

Επιχειρείται διεθνώς σε ερευνητικό επίπεδο η βελτιστοποίηση της διεργασίας παραγωγής αιθανόλης από λιγνινοκυτταρινούχες πηγές, όπως από άχυρο σίτου, στέλεχος αραβοσίτου, βαγάση σακχαροκάλαμου κ.ο.κ. Η προσέγγιση αυτή θα ακολουθηθεί και στην παρούσα εργασία, όπου η πρώτη ύλη είναι στέλεχος αραβοσίτου (corn stover). Κύριος άξονας της εργασίας είναι η μελέτη της παραγωγής αιθανόλης σε συνθήκες υψηλής αρχικής συγκέντρωσης στερεών (high gravity). Έχει δειχθεί πως είναι απαραίτητο η τελική συγκέντρωση αιθανόλης στο μίγμα της ζύμωσης (broth) να είναι μεγαλύτερη του 4%, προκειμένου ο διαχωρισμός της αιθανόλης να είναι ενεργειακά βιώσιμος. Αυτό συνεπάγεται απαιτούμενη υψηλή συγκέντρωση σακχάρων, άρα και βιομάζας στο μίγμα, κάτι που οδηγεί σε προβλήματα ανάδευσης στα συμβατικά συστήματα. Στην εργασία θα αξιοποιηθεί μη συμβατικό σύστημα ανάδευσης (free fall mixer), με στόχο την επίτευξη συγκέντρωσης αιθανόλης στα πλαίσια που ορίζει η βιβλιογραφία (μεγαλύτερης του 4%).

Αναλυτικότερα, στο πρώτο μέρος της εργασίας ερευνάται η παραγωγή βιοαιθανόλης από στέλεχος αραβοσίτου (corn stover) με διαφορετικές προκατεργασίες και σε συνθήκες υψηλής συγκέντρωσης στερεών (high gravity). Μελετώνται τα Δείγματα Α (μέθοδος έκρηξης ατμού άνευ προσθήκης οξέος), Β (έκρηξη ατμού με προσθήκη 0.2% H₂SO₄), Γ (έκρηξη ατμού με προσθήκη 1.0% H₂SO₄) και Δ (μέθοδος organosolv). Γίνεται

έτσι σύγκριση μεταξύ των συνθηκών της μεθόδου έκρηξης ατμού (Δείγματα Α-Γ) αλλά και μεταξύ των δύο διαφορετικών μεθόδων προκατεργασίας (Δείγματα Α-Γ και Δ). Τα υλικά υφίστανται ανάλυση σύστασης, ανάλυση κρυσταλλικότητας, δοκιμαστική ενζυμική υδρόλυση σε μικρή κλίμακα και ζύμωση σε μικρή κλίμακα, ώστε να διαπιστωθούν οι βέλτιστες συνθήκες κάθε σταδίου της διεργασίας και να επιλεγούν τα δείγματα με την καλύτερη συμπεριφορά. Στη συνέχεια, τα υλικά που επιλέγονται από αυτές τις σειρές πειραμάτων οδηγούνται προς υδρόλυση και ζύμωση σε υψηλές συγκεντρώσεις στερεών (high gravity). Προσδιορίζεται η τελική συγκέντρωση αιθανόλης και συγκρίνεται με το όριο (threshold) του 4% και τις ανάλογες τιμές της διεθνούς βιβλιογραφίας.

Στο δεύτερο μέρος της εργασίας ερευνάται η βελτίωση της διεργασίας με χρήση ανασυνδυασμένων καινοτόμων βιοκαταλυτών. Για το λόγο αυτό, επιλέγεται να εκφραστεί ένα ένζυμο του μικροοργανισμού *Myceliophthora Thermophila* οικογένειας GH30 που παρουσιάζει πιθανή ξυλανολυτική δράση (putative xylanase). Η χρήση αυτού του ενζύμου στη διεργασία υδρόλυσης της βιομάζας για την παραγωγή αιθανόλης αναμένεται να έχει θετικά αποτελέσματα. Έχει δειχθεί στη βιβλιογραφία ότι η συνεργιστική δράση ανάμεσα σε κυτταρινάσες και ξυλανάσες διευκολύνει την υδρόλυση σε υψηλές συγκεντρώσεις στερεών. Το γονίδιο πολλαπλασιάζεται σε μικροοργανισμούς-ξενιστές με τεχνικές ανασυνδυασμένου DNA, ώστε να παραχθεί τελικά ο καινοτόμος βιοκαταλύτης. Ελέγχεται, τέλος, η ενεργότητα του νέου ενζύμου ώστε να διαπιστωθεί αν διαθέτει όντως ξυλανολυτική δράση.

Με την παρούσα εργασία επιχειρείται εν γένει η επίτευξη υψηλής απόδοσης παραγωγής βιοαιθανόλης, μέσω της προσεκτικής μελέτης των επιμέρους σταδίων και της προσπάθειας βελτιστοποίησης των συνθηκών της διεργασίας

I. Θεωρητικό μέρος

Κεφάλαιο 1: Αξιοποίηση Βιομάζας προς παραγωγή Βιοκαυσίμων

1.1 Βιομάζα και Βιοκαύσιμα

Τα τελευταία χρόνια, καταγράφεται αύξηση στη συγκέντρωση αρκετών αερίων του θερμοκηπίου και ειδικότερα του διοξειδίου του άνθρακα, οι εκπομπές του οποίου αυξήθηκαν σε ποσοστό 80% το διάστημα 1970-2004. Τα τρία τέταρτα της ανθρωπογενούς παραγωγής διοξειδίου του άνθρακα, οφείλονται σε χρήση ορυκτών καυσίμων, ενώ το υπόλοιπο μέρος προέρχεται από αλλαγές που συντελούνται στο έδαφος, κυρίως μέσω της αποψίλωσης των δασών. Προκειμένου να ανασταλούν οι αρνητικές συνέπειες της υπερθέρμανσης του πλανήτη, αναζητούνται τρόποι περιορισμού της κατανάλωσης ορυκτών καυσίμων, και άρα μείωσης των συνολικών εκπομπών στην ατμόσφαιρα. Η βιομάζα έχει αναγνωριστεί ως σημαντική παγκόσμια ανανεώσιμη μορφή ενέργειας, η οποία μπορεί να ανταγωνιστεί την κατανάλωση ορυκτών καυσίμων (Haghighi Mood et al. 2013; Χριστακόπουλος and Τόπακας 2013).

Η βιομάζα, με διάφορες θερμοχημικές (πυρόλυση, αεριοποίηση, καύση) και βιοχημικές-βιολογικές (ζύμωση, αναερόβια χώνευση) διεργασίες, μετατρέπεται σε χρήσιμες μορφές ενέργειας, για την κάλυψη διαφόρων αναγκών όπως η παραγωγή ηλεκτρικής και θερμικής ενέργειας, καθώς και η παραγωγή υγρών ή αερίων καυσίμων (βιοκαυσίμων) (Cadenas and Cabezudo 1998). Τα ορυκτά καύσιμα απελευθερώνουν κατά την καύση τους άνθρακα που έχει δεσμευτεί εκατομμύρια χρόνια πριν, ενώ τα βιοκαύσιμα απελευθερώνουν άνθρακα που έχει δεσμευτεί με τη διεργασία της φωτοσύνθεσης κατά την διάρκεια της ετήσιας ανάπτυξης της βιομάζας. Έχει αναφερθεί ότι τα βιοκαύσιμα, και συγκεκριμένα η βιοαιθανόλη, μπορούν να μειώσουν τις εκπομπές αερίων του θερμοκηπίου ως και 86% (Korppam et al. 2014). Προκειμένου, όμως, η χρήση των βιοκαυσίμων να είναι αειφόρος, τα βιοκαύσιμα θα πρέπει να είναι περιβαλλοντικά βιώσιμα, οικονομικά ανταγωνιστικά και να μην ανταγωνίζονται τη βιομηχανία τροφίμων.

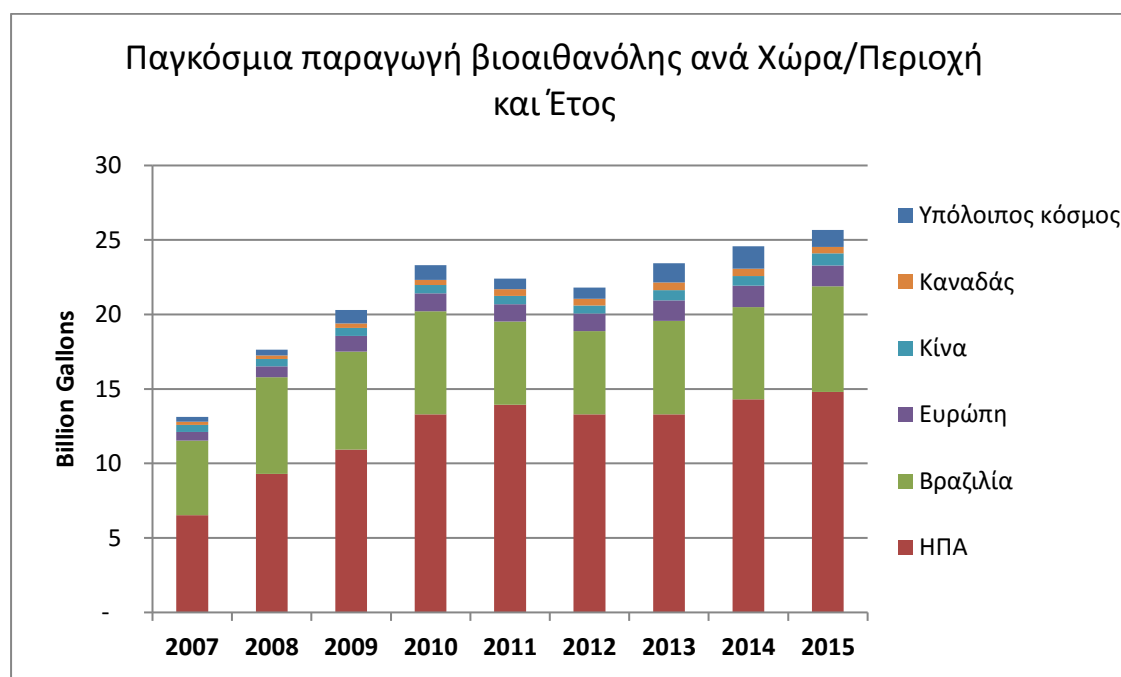
1.2 Βιοαιθανόλη

Η βιοαιθανόλη κατέχει την πρώτη θέση στην παγκόσμια παραγωγή βιοκαυσίμων. Οι ιδιότητες της αιθανόλης την καθιστούν ένα σημαντικό εναλλακτικό καύσιμο για τον τομέα των μεταφορών. Έχει υψηλό αριθμό οκτανίου, ευρύτερα όρια ευφλεκτότητας, υψηλότερη ταχύτητα φλόγας και υψηλότερες θερμοότητες εξάτμισης από ότι η βενζίνη. Αυτές οι ιδιότητες επιτρέπουν μια υψηλότερη αναλογία συμπίεσης και έναν πιο σύντομο χρόνο ανάφλεξης οι οποίες οδηγούν στα θεωρητικά πλεονεκτήματα αποδοτικότητας σε μια μηχανή εσωτερικής καύσης. Ακόμα, η καύση της αιθανόλης είναι πιο καθαρή από αυτή της βενζίνης, με μειωμένες εκπομπές CO, NOx και μικροσωματιδίων (Dogaris, Mamma, and Kekos 2013; Iea 2007).

Στα μειονεκτήματα της βιοαιθανόλης συμπεριλαμβάνονται η χαμηλότερη ενεργειακή πυκνότητα από αυτή της βενζίνης (η βιοαιθανόλη εμπεριέχει το 66% της ενέργειας που εμπεριέχει η βενζίνη), η δυνατότητα οξείδωσης, η χαμηλή φωτεινότητα φλόγας, η

χαμηλότερη τάση ατμών (που καθιστά τις κρύες ενάρξεις των μηχανών δυσκολότερες), η αναμιξιμότητα με το νερό, και η τοξικότητα στα οικοσυστήματα (MacLean and Lave 2003).

Οι μεγαλύτεροι παραγωγοί βιοαιθανόλης είναι οι ΗΠΑ, η Βραζιλία και η Κίνα. Η βιοαιθανόλη παράγεται στη Βραζιλία από σακχαροκάλαμο (σακχαρούχα πηγή) ενώ στις ΗΠΑ και στην Κίνα από αραβόσιτο (αμυλούχα πηγή). Στην Ευρωπαϊκή Ένωση οι κύριες πηγές βιοαιθανόλης είναι το σιτάρι, το σακχαρότευτλο καθώς και υπολείμματα βιομηχανίας οίνου (Balat, 2008). Οι πηγές αυτές, ωστόσο, δεν επαρκούν και δεν πληρούν τις απαιτούμενες προϋποθέσεις για τη βιωσιμότητα των βιοκαυσίμων, για το λόγο αυτό επιχειρείται στροφή προς τη λιγνινοκυτταρινούχα βιομάζα. Παρακάτω παρουσιάζεται η συνολική παραγωγή βιοαιθανόλης ανά τον κόσμο την τελευταία δεκαετία, ανεξάρτητα από την πρώτη ύλη που αξιοποιείται.



Διάγραμμα 1.1: Παγκόσμια παραγωγή βιοαιθανόλης (εκατομμύρια γαλόνια) ανά Χώρα/Περιοχή και Έτος (www.afdc.energy.gov/data/)

1.3 Πρώτες ύλες και γενιές βιοκαυσίμων

Γενικά, οι πρώτες ύλες για την παραγωγή βιοαιθανόλης μπορούν να ταξινομηθούν σε τρεις τύπους: σακχαρούχα υλικά, αμυλούχα υλικά και λιγνινοκυτταρινούχα υλικά. Στα σακχαρούχα ή ενεργειακά φυτά συμπεριλαμβάνονται το σακχαροκάλαμο, το σακχαρότευτλο και το γλυκό σόργο, τα οποία υπόκεινται σε άμεση ζύμωση μετά από την απαραίτητη φυσική προκατεργασία. Το σακχαροκάλαμο έχει αξιοποιηθεί σε μεγάλο βαθμό στη Βραζιλία για την παραγωγή βιοαιθανόλης, καθώς το φυτό αναπτύσσεται ταχέως και περιέχει σε μεγάλο ποσοστό ζυμώσιμα σάκχαρα. Στα αμυλούχα φυτά συμπεριλαμβάνονται σπόροι σιτηρών (σιτάρι, κριθάρι, καλαμπόκι κ.ο.κ.), οι οποίοι πρέπει να υποστούν ένα στάδιο υδρόλυσης με τη χρήση αμυλασών πριν τη ζύμωση. Το μεγαλύτερο ποσοστό της αιθανόλης που παράγεται στις ΗΠΑ προέρχεται από αμυλούχα φυτά, και συγκεκριμένα από αραβόσιτο (Balat et al. 2008; Sarkar et al. 2012).

Τα βιοκαύσιμα που παράγονται από σακχαρούχες και αμυλούχες πηγές ανήκουν στα βιοκαύσιμα πρώτης γενιάς. Ωστόσο η αξιοποίηση εδώδιμων κλασμάτων της βιομάζας για την παραγωγή καυσίμων εγείρει αμφιβολίες, καθώς θεωρείται ότι η ραγδαία αύξηση της παραγωγής βιοκαυσίμων μπορεί να αυξήσει τις τιμές των τροφίμων λόγω ανταγωνισμού. Για το λόγο αυτό η έρευνα έχει στραφεί προς την αξιοποίηση της λιγνινοκυτταρινούχας βιομάζας (υπολείμματα της υλοτομίας, της γεωργίας, της βιομηχανίας τροφίμων) που αποτελεί απόρριμμα και δεν ανταγωνίζεται έτσι τη βιομηχανία τροφίμων. Τα βιοκαύσιμα που παράγονται από λιγνινοκυτταρινούχες πηγές ανήκουν στα βιοκαύσιμα δεύτερης γενιάς. Τα βιοκαύσιμα τρίτης γενιάς προέρχονται από φύκη και άλγες και βρίσκονται σε πρώιμο στάδιο ανάπτυξης.

1.4 Αξιοποίηση πρώτων υλών λιγνινοκυτταρινούχας βιομάζας

Τα λιγνινοκυτταρινούχα υλικά, όπως τα γεωργικά υπολείμματα (άχυρο σίτου, στελέχη, κλαδιά, φύλλα), τα υπολείμματα επεξεργασίας γεωργικών προϊόντων (υπολείμματα εκκοκκισμού βαμβακιού, πυρηνόξυλο, πυρήνες φρούτων κ.λ.π.) το ξύλο και οι ενεργειακές συγκομιδές, αποτελούν ένα ελκυστικό υλικό για την παραγωγή καυσίμων βιοαιθανόλης δεδομένου ότι διαθέτουν μεγάλο ποσοστό σε ζυμώσιμους υδρογονάνθρακες και είναι ο αφθονότερος αναπαραγωγίσιμος πόρος στη γη. Όπου η λιγνινοκυτταρινούχα βιομάζα είναι διαθέσιμη μπορεί να παραχθούν βιοκαύσιμα χωρίς απαιτήσεις σε γη και χωρίς αντίκτυπο στην παραγωγή τροφίμων. Η σύσταση των λιγνινοκυτταρινούχων υλικών διαφοροποιείται ανάλογα με την προέλευσή τους. Σε γενικές γραμμές όμως, αποτελούνται κυρίως από κυτταρίνη (~45% του ξηρού βάρους), ημικυτταρίνη (~30% ξηρού βάρους) και λιγνίνη (~25% ξηρού βάρους) (Sims et al. 2010).

Η χρήση της λιγνινοκυτταρινούχας βιομάζας εμφανίζει πολλά πλεονεκτήματα σε οικονομικό και οικολογικό επίπεδο. Οι πηγές της βιομάζας είναι πιο ομοιόμορφα διεσπαρμένες σε σχέση με τα ορυκτά καύσιμα, επομένως διασφαλίζουν ως ένα βαθμό ενεργειακή αυτονομία στη χώρα που τα αξιοποιεί. Ελαχιστοποιείται ο ανταγωνισμός με τη βιομηχανία τροφίμων για τη χρήση της γης, ενώ η πιθανή στοχευμένη καλλιέργεια ενεργειακών λιγνινοκυτταρινούχων φυτών είναι πιο φθηνή και απαιτεί λιγότερα λιπάσματα, ζιζανιοκτόνα και ενέργεια. Οι καθαρές εκπομπές αερίου θερμοκηπίου του βιοκαυσίμου που παράγονται με αυτό τον τρόπο είναι χαμηλές, ενώ η αξιοποίηση της βιομάζας αναμένεται να αυξήσει τις ευκαιρίες εργασίας στον αγροτικό τομέα (Zacchi 2006).

Αν και υπάρχουν ομοιότητες ανάμεσα στις διεργασίες λιγνινοκυτταρινούχων και σακχαρούχων/αμυλούχων φυτών, οι τεχνικοοικονομικές προκλήσεις που συνδέονται με τα πρώτα είναι κατά πολύ μεγαλύτερες. Υπάρχουν αρκετές επιλογές για τις διεργασίες από τη βιομάζα στην αιθανόλη, ωστόσο σε κάθε περίπτωση πρέπει να εξετάζονται: Ο αποτελεσματικός αποπολυμερισμός της κυτταρίνης και της ημικυτταρίνης σε διαλυτά σάκχαρα, η αποτελεσματική ζύμωση των σακχάρων (κατά προτίμηση τόσο εξοζών όσο και πεντοζών), η αποφυγή της παραγωγής παρεμποδιστών και παραπροϊόντων, ο σχεδιασμός της διεργασίας για την ελαχιστοποίηση της παραγωγής ενέργειας και η αξιοποίηση της λιγνίνης (Balat et al. 2008).

1.4.1 Σύσταση κυτταρικού τοιχώματος φυτών

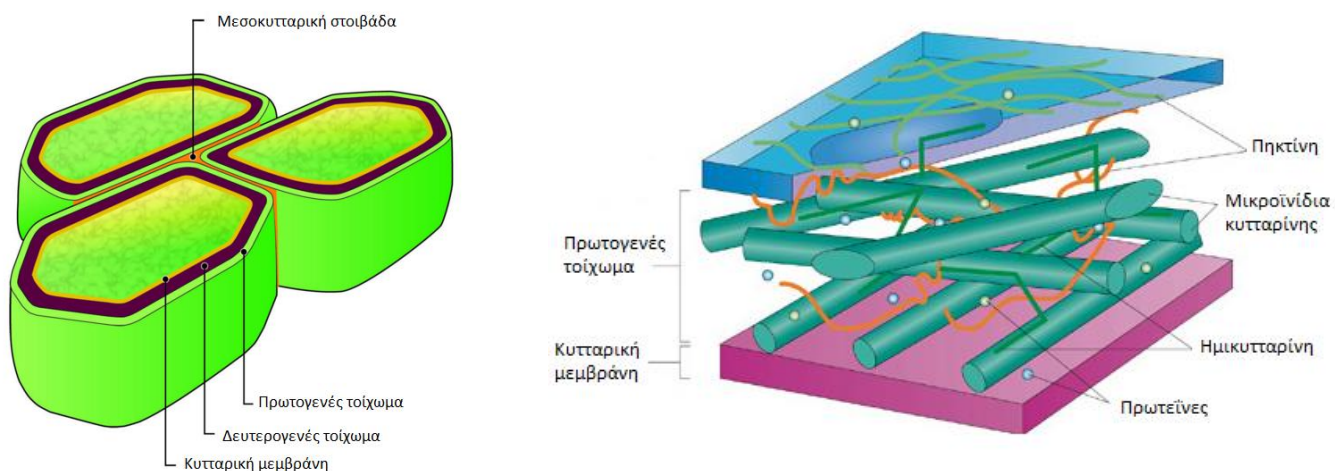
Τα φυτικά κύτταρα περιβάλλονται από ένα συμπαγές κυτταρικό τοίχωμα, που αποτελεί σύνορο ανάμεσα στα κύτταρα και το περιβάλλον. Πρόκειται για μια περίπλοκη δομή που περικλείει το κάθε κύτταρο, προσφέροντας σταθερότητα. Τα τοιχώματα των γειτονικών φυτικών κυττάρων που εδραιώνονται μεταξύ τους για να σχηματίσουν το φυτικό ιστό είναι έτσι παχύτερα, ισχυρότερα και πολύ περισσότερο άκαμπτα από την εξωκυτταρική μήτρα των ζωικών κυττάρων (Alberts B, Johnson A, Lewis J 2002).

Οι κύριες λειτουργίες του κυτταρικού τοιχώματος σχετίζονται με την ακαμψία, προκειμένου να είναι δυνατή η επίτευξη δομικής και μηχανικής αντοχής από τα φυτά. Ιδιαίτερα σημαντική όμως φαίνεται να είναι και η λειτουργία της προστασίας των κυττάρων από δυνητικά παθογόνους μικροοργανισμούς. Λόγω της συμπαγούς δομής του εξωτερικού περιβλήματος ούτε οι μικρότεροι σε μέγεθος ιοί δε μπορούν να εισχωρήσουν στο εσωτερικό, ενώ οι παθογόνοι μικροοργανισμοί που προσβάλλουν τα φυτά εισέρχονται από ευκαιριακά κενά ή έπειτα από ενζυμική υδρόλυση του περιβλήματος. Οι σαπροφυτικοί και ορισμένοι φυτοπαθογόνοι μικροοργανισμοί είναι αυτοί που παράγουν τα κατάλληλα ένζυμα για την υδρόλυση της κυτταρίνης, ώστε υπό κατάλληλες συνθήκες να μπορούν να διασπάσουν το κυτταρικό τοίχωμα του φυτού και να εισέλθουν στο ευπαθέστερο εσωτερικό του.

Η σύσταση του φυτικού τοιχώματος είναι πολύπλοκη και διαφέρει στα διάφορα είδη των φυτών, αλλά και μεταξύ των ιστών του ίδιου φυτού ή και μεταξύ σε διαφορετικά αναπτυξιακά στάδια ενός ιστού. Τα βασικά συστατικά του φυτικού τοιχώματος είναι η κυτταρίνη (cellulose), οι ημικυτταρίνες (hemicellulose), η λιγνίνη (lignin), οι πηκτίνες (pectin), φυτικές πρωτεΐνες και φαινολικές ενώσεις (Karp 2010). Κύριο συστατικό του τοιχώματος είναι η κυτταρίνη που μπορεί να φθάνει και ποσοστά άνω του 50% του λιγνινοκυτταρικού κλάσματος ανάλογα με το είδος του φυτού. Εν γένει το κυτταρικό τοίχωμα αποτελείται από μικροϊνίδια κυτταρίνης που ενσωματώνονται μέσα σε μια μήτρα από πρωτεΐνες και άλλους πολυσακχαρίτες. Η δομή του τοιχώματος συγκρίνεται συχνά με το σπλισμένο σκυρόδεμα, καθώς τα ινίδια της κυτταρίνης προσδίδουν υψηλή αντοχή σε αξονικό εφελκυσμό ενώ οι παρούσες στη μήτρα ημικυτταρίνες και λιγνίνη προσδίδουν αντοχή σε κάμψη και θλίψη.

Τα φυτικά κύτταρα συνθέτουν αρχικά το πρωτογενές φυτικό τοίχωμα, που αποτελείται από κυτταρίνη και ημικυτταρίνες σε ένα περιβάλλον πλούσιο σε πηκτίνες. Οι πηκτίνες χρησιμεύουν ως συγκολλητικά μέσα και είναι κολλώδεις ουσίες που συγκρατούν τα γειτονικά κύτταρα μεταξύ τους. Στη συνέχεια συντίθεται το δευτερογενές κυτταρικό τοίχωμα ανάμεσα στην κυτταρική μεμβράνη και το πρωτογενές τοίχωμα, όταν το κύτταρο έχει ολοκληρώσει την ανάπτυξή του. Αυτό περιλαμβάνει περισσότερη κυτταρίνη από το πρωτογενές, αλλά και λιγνίνη που ισχυροποιεί τη μηχανική στήριξη του φυτού, καθιστώντας τα τοιχώματα άκαμπτα και σταθερά (Alberts B, Johnson A, Lewis J 2002). Αξίζει να σημειωθεί ότι τα μόρια συγκρατούνται μεταξύ τους με ένα πλήθος διαμοριακών δεσμών ώστε να δημιουργηθεί μια ιδιαίτερα πολύπλοκη δομή της οποίας η σύσταση και αρχιτεκτονική διαφέρει από περίπτωση σε περίπτωση. Η τυπική ποσοστιαία σύσταση της

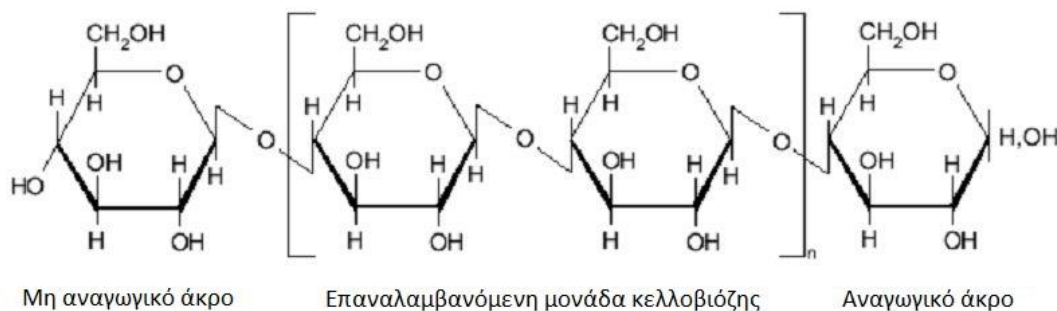
βιομάζας παρουσιάζεται παρακάτω: Λιγνίνη (15-25%), Ημικυτταρίνη (23-32%), Κυτταρίνη (38-50%) (Χριστακόπουλος και Τόπακας 2013).



Σχήμα 1.1: Δομή φυτικών κυττάρων (α) και τυπική δομή πρωτογενούς κυτταρικού τοιχώματος (β). (α: Office of Biological and Environmental Research of the U.S. Department of Energy Office of Science, β: Sticklen, Nature, 2008)

1.4.2 Κυτταρίνη

Η κυτταρίνη είναι πολυσακχαρίτης που αποτελείται από γραμμικές αλυσίδες D-γλυκόζης, οι οποίες συνδέονται μεταξύ τους με β ,1-4 γλυκοζιτικό δεσμό. Οι ίνες της κυτταρίνης είναι βιολογικά πολυμερή, με την κελοβιόζη, το διμερές της γλυκόζης, να αποτελεί την επαναλαμβανόμενη μονάδα. Οι ίνες της κυτταρίνης συνδέονται μεταξύ τους ισχυρά με διαμοριακούς δεσμούς υδρογόνου και δυνάμεις Van der Waals. Αυτό οδηγεί σε μια συμπαγή, κρυσταλλική μορφή δικτύου μικροϊνιδίων που συγκρατείται μέσω διαμοριακών δυνάμεων και προσφέρει σταθερότητα στο φυτικό κύτταρο (Zhao et al. 2012). Ο βαθμός πολυμερισμού της της κυτταρίνης κυμαίνεται από 7000 ως 15000. Στο πλέγμα της κυτταρίνης εμφανίζονται κρυσταλλικές περιοχές λόγω δεσμών υδρογόνου, ενώ ο βαθμός κρυσταλλικότητας μπορεί να φθάσει ως 70%. Οι δεσμοί υδρογόνου σχηματίζονται ανάμεσα σε μόρια γλυκόζης της ίδιας αλυσίδας κυτταρίνης ή διαφορετικών αλυσίδων κυτταρίνης. Έτσι οι αλυσίδες διευθετούνται παραλλήλως σε επίπεδα, με διαμοριακούς δεσμούς και ανάμεσα στα επίπεδα, κάτι που συντελεί στη δημιουργία συμπαγών δύσκολα αποδομήσιμων περιοχών (Alberts B, Johnson A, Lewis J 2002). Το υπόλοιπο μέρος της κυτταρίνης είναι άμορφο, παρουσιάζει υγροσκοπικές ιδιότητες και είναι εν γένει πιο ευπρόσβλητο στην ενζυμική υδρόλυση (Korppam et al. 2014). Η περιεκτικότητα σε κρυσταλλική και μη κρυσταλλική κυτταρίνη ποικίλλει ανάλογα με το είδος του φυτού.



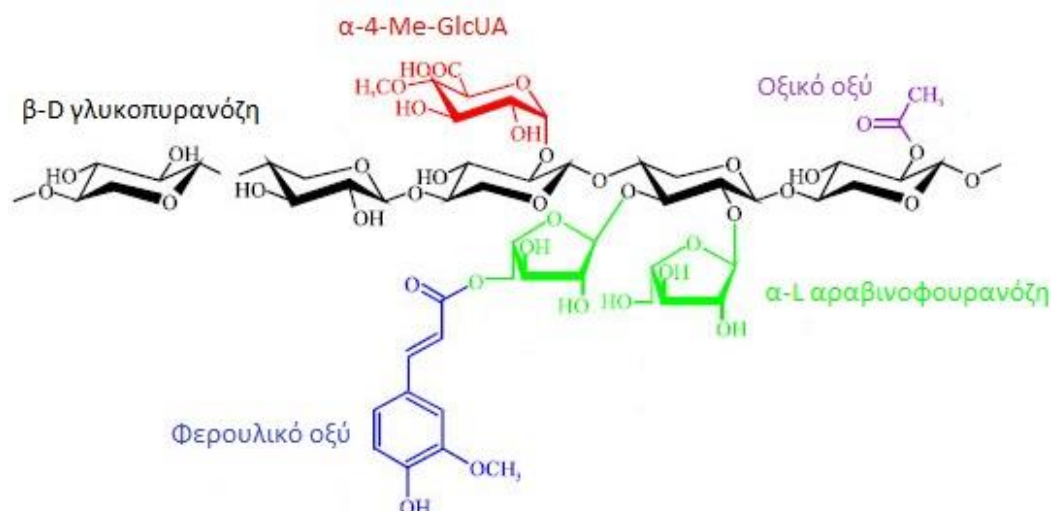
Σχήμα 1.2: Δομή κυτταρίνης. Εντός της αγκύλης περιέχεται η επαναλαμβανόμενη δομική μονάδα κελλοβιόζης (Tabet 2013)

1.4.3 Ημικυτταρίνη

Οι ημικυτταρίνες μπορούν να οριστούν ως το μίγμα συμπολυμερών ουσιών που μαζί με την κυτταρίνη και τη λιγνίνη συγκροτούν τα φυτικά κυτταρικά τοιχώματα. Πρόκειται, λοιπόν, για ετερογενείς πολυσακχαρίτες που αποτελούνται από σάκχαρα όπως εξόζες (γλυκόζη, γαλακτόζη, μανόζη) πεντόζες (ξυλόζη, αραβινόζη κ.ο.κ.) και ουρονικά οξέα (γλυκουρονικό οξύ, γαλακτουρονικό οξύ κ.ο.κ.). Πιο αναλυτικά, οι ημικυτταρίνες είναι διακλαδισμένοι πολυσακχαρίτες, με την κύρια αλυσίδα να αποτελείται από ένα σάκχαρο όπως τη γλυκόζη και οι πλευρικές αλυσίδες από άλλα σάκχαρα, όπως η ξυλόζη (Kang et al. 2014). Τα μόρια των ημικυτταρινών δεσμεύονται στις επιφάνειες των μικροϊνιδίων κυτταρίνης, δημιουργώντας σταυρωτά πλέγματα και ένα ισχυρότατο δίκτυο.

Οι ημικυτταρίνες είναι άμορφες, με χαμηλό βαθμό πολυμερισμού (150-300) και είναι υγροσκοπικές με υψηλή χημική δραστηριότητα (Χριστακόπουλος και Τόπακας 2013). Ο βαθμός διακλάδωσης και η σύσταση διαφέρουν με τη φύση και την πηγή της βιομάζας. Λόγω του εύρους των σακχάρων που τις αποτελούν, οι ημικυτταρίνες απαιτούν μεγάλο εύρος ενζύμων για την υδρόλυσή τους σε ελεύθερα μονομερή. Στους περισσότερους κυτταρικούς τύπους ένα είδος ημικυτταρίνης κυριαρχεί, με τα υπόλοιπα να εντοπίζονται σε μικρότερες ποσότητες (Brodeur et al. 2011).

Η ξυλάνη είναι η σημαντικότερη υποκατηγορία ημικυτταρινών που συναντάται στη φυτική βιομάζα. Εντοπίζεται κυρίως ανάμεσα στην κυτταρίνη και τη λιγνίνη των δευτεροταγών φυτικών τοιχωμάτων. Αποτελείται από κεντρική αλυσίδα μορίων ξυλόζης ενωμένων με β-1,4 γλυκοζιτικό δεσμό, ενώ μπορεί υπάρχουν διακλαδώσεις ή όχι. Στη περίπτωση της διακλαδισμένης αλυσίδας οι διακλαδώσεις αποτελούνται εξόζες, πεντόζες και ουρονικά οξέα και οι σακχαρικοί υποκαταστάτες συνδέονται με την κύρια αλυσίδα μέσω γλυκοζιτικών δεσμών. Καθώς η ξυλάνη είναι ο δεύτερος πιο διαδεδομένος πολυσακχαρίτης στη φυτική βιομάζα, η υδρόλυσή της φέρει ιδιαίτερο βιοτεχνολογικό ενδιαφέρον.

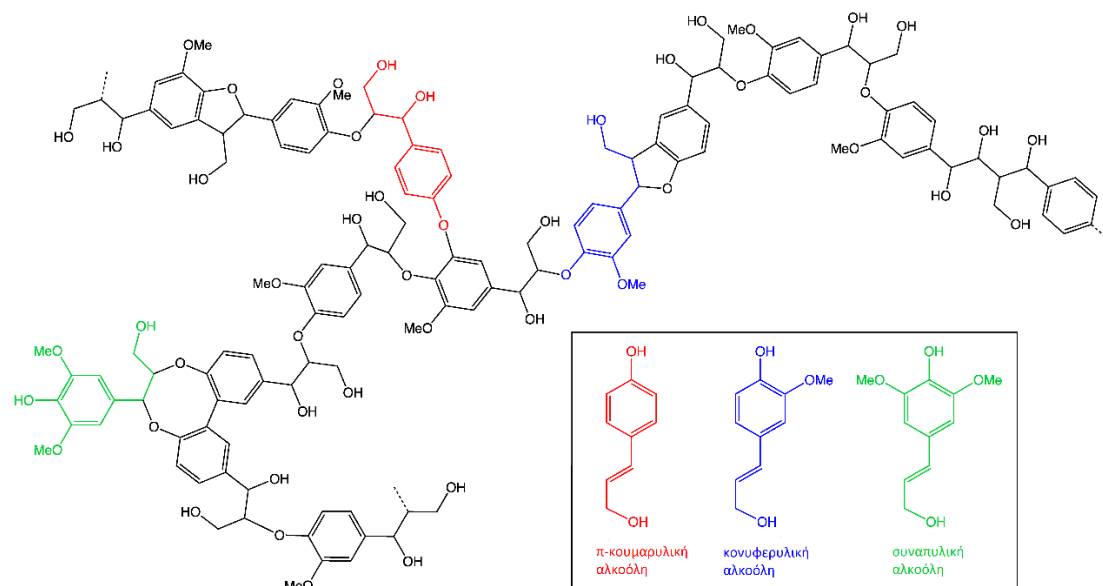


Σχήμα 1.3: Πιθανή δομή ξυλάνης. Οι πιθανοί υποκαταστάτες (πεντόζες, φαινυλικού υποκαταστάτες κ.ο.κ.) εμφανίζονται έγχρωμοι (Khucharoenphaisan,2010)

1.4.4 Λιγνίνη

Η λιγνίνη είναι ένα μεγαλομοριακό αρωματικό υδρόφοβο βιοπολυμερές, δεσμευμένο ομοιοπολικά με τις ημικυτταρίνες και είναι υπεύθυνη για την ακαμψία και τη συμπαγή δομή του κυτταρικού τοιχώματος των φυτών. Είναι από τα πιο άφθονα συστατικά της φυτικής βιομάζας, όμως δεν εμφανίζεται σε όλα τα φυτικά είδη (Alberts B, Johnson A, Lewis J 2002). Η λιγνίνη είναι άμορφη και έχει υψηλό βαθμό πολυμερισμού, ενώ η βασική επαναλαμβανόμενη μονάδα της είναι το φαινυλοπροπάνιο. Τα φαινυλοπροπανικά μονομερή της λιγνίνης είναι τρεις αρωματικές ενώσεις, η κονυφερυλική, η συναυλική και η π-κουμαρυλική αλκοόλη. Οι δεσμοί της λιγνίνης είναι αιθερικοί ή άνθρακα-άνθρακα, ενώ αναπτύσσονται και δεσμοί ανάμεσα σε λιγνίνη, ημικυτταρίνη και κυτταρίνη. Η σύσταση των τριών κύριων συστατικών της βιομάζας διαφέρει ανάμεσα στα είδη, με την ξυλώδη βιομάζα να περιέχει περισσότερη λιγνίνη, με φυτά όπως το άχυρο και το καλαμπόκι να περιέχουν περισσότερη κυτταρίνη και με τα φυλλώδη μέρη φυτών να περιέχουν περισσότερη ημικυτταρίνη (Korppam et al. 2014).

Καθότι η λιγνίνη δεν είναι πολυμερές σακχάρων, δε μπορεί να οδηγηθεί προς ζύμωση για την παραγωγή βιοαιθανόλης. Μάλιστα, καθώς τα ένζυμα της υδρόλυσης τείνουν να προσροφώνται στην επιφάνεια της λιγνίνης, η παρουσία της μπορεί να δυσχεράνει την υδρόλυση της κυτταρίνης (Brodeur et al. 2011). Ακόμα, είναι σημαντική για την απόδοση της βιοδιεργασίας καθώς οι περισσότεροι αναστολείς της μικροβιακής ανάπτυξης και της ζύμωσης προέρχονται από τη λιγνίνη, κατά την προκατεργασία της βιομάζας. Η λιγνίνη επίσης διαθέτει ικανοποιητική θερμογόνο δύναμη, και συχνά επιλέγεται να καεί προκειμένου να αξιοποιηθεί και αυτό το μέρος της δεσμευμένης ενέργειας. Εναλλακτικά, μπορεί να αξιοποιηθεί ως πρώτη ύλη για τη σύνθεση χημικών υψηλής προστιθέμενης αξίας.



Σχήμα 1.4: Τυπική δομή λιγνίνης. Εμφανίζονται έγχρωμα οι τρεις μονομερείς αλκοόλες της λιγνίνης (Vanholme 2010)

1.4.5 Τέφρα

Περιλαμβάνει όλα τα ανόργανα συστατικά που χρειάζονται για την ανάπτυξη φυτικής ύλης και προσδιορίζεται με καύση και πύρωση της φυτικής ύλης στους 500-600°C. Τα κυρίαρχα συστατικά της είναι ανθρακικά άλατα αλκαλίων και αλκαλικών γαιών, όπως και διάφορα άλλα άλατα. Η περιεκτικότητα του ξύλου σε τέφρα είναι συνήθως μικρότερη του 1% κατά βάρος. Γενικά τα αγροτικά υπολείμματα έχουν μεγαλύτερο περιεχόμενο σε τέφρα και πρωτεΐνες.

1.4.6 Σύσταση λιγνινοκυτταρινούχων υλικών

Η σύσταση της βιομάζας ποικίλλει ανάλογα με την πηγή της και εξαρτάται τόσο από το είδος του φυτού, όσο και από το τμήμα του φυτού που αξιοποιείται. Στον παρακάτω πίνακα παρουσιάζεται ενδεικτικά η σύσταση ορισμένων λιγνινοκυτταρινούχων υλικών που αξιοποιούνται για την παραγωγή βιοκαυσίμων.

Πίνακας 1.1: Σύσταση λιγνινοκυτταρινούχας βιομάζας για την παραγωγή βιοκαυσίμων (Saha 2003)

| | Κυτταρίνη (%) | Ημικυτταρίνη (%) | Λιγνίνη (%) |
|------------------------|---------------|------------------|-------------|
| Ίνες Αραβοσίτου | 15 | 35 | 8 |
| Σπάδικας αραβοσίτου | 45 | 35 | 15 |
| Στέλεχος αραβοσίτου | 40 | 25 | 17 |
| Άχυρο ρυζιού | 35 | 25 | 12 |
| Άχυρο σίτου | 30 | 50 | 20 |
| Βαγάσση σακχαροκάλαμου | 40 | 24 | 25 |
| Switchgrass | 45 | 30 | 12 |

1.5 Αραβόσιτος-Corn stover

Το μεγαλύτερο ποσό της αιθανόλης που παράγεται στις Η.Π.Α. προέρχεται από αραβόσιτο. Στην Ελλάδα, η συνολική καλλιεργούμενη έκταση είναι περίπου 2 εκ. στρέμματα με ετήσια παραγωγή περίπου 2 εκ. τόνους. Οι ελληνικές μέσες αποδόσεις αραβοσίτου κυμαίνονται από 600-1800 κιλά/στρέμμα. Οι ποσότητες βιοαιθανόλης που παράγονται από αραβόσιτο αφορούν αξιοποίηση του εδώδιμου κλάσματος (αμυλούχα πηγή), πρακτική που, όπως αναλύθηκε, δεν πληροί τα κριτήρια αειφορίας. Εναλλακτικά, μπορεί να γίνει αξιοποίηση του μη εδώδιμου κλάσματος του φυτού, δηλαδή των φύλλων και των μίσχων που απομένουν μετά τη συγκομιδή (corn stover) Το λιγνινοκυτταρινούχο υπόλειμμα, το στέλεχος δηλαδή καλαμποκιού, μπορεί να αξιοποιηθεί για την παραγωγή βιοκαυσίμων από το ημικυτταρινικό και το κυτταρινικό μέρος, ενώ η λιγνίνη οδηγείται συνήθως προς καύση. Οι εναλλακτικές χρήσεις του στελέχους αραβοσίτου είναι περιορισμένες, καθώς συνήθως αξιοποιείται σε ζωοτροφές ή καίγεται για ανάκτηση ενέργειας (Dogaris et al. 2013).



Σχήμα 1.5: Στέλεχος αραβοσίτου μετά τη συγκομιδή από τον αγρό, προ της άλεσής του. Διακρίνονται τα υπολείμματα φύλων και μίσχων του φυτού.

Κεφάλαιο 2: Διεργασία παραγωγής βιοαιθανόλης

Η διεργασία παραγωγής βιοαιθανόλης συνοψίζεται σε τέσσερα βασικά στάδια: την προκατεργασία της βιομάζας, την υδρόλυση προς παραγωγή μονομερών σακχάρων, τη ζύμωση προς παραγωγή αιθανόλης και τον καθαρισμό του τελικού προϊόντος. Διαφορετικές τεχνικές έχουν χρησιμοποιηθεί για κάθε στάδιο, με μεγάλη ποικιλομορφία μεθόδων να εμφανίζεται στη βιβλιογραφία σχετικά με το στάδιο της προεπεξεργασίας της βιομάζας. Με στόχο τη μεγιστοποίηση της απόδοσης και το ελάχιστο κόστος της παραγωγής, ενίοτε το στάδιο της υδρόλυσης και της ζύμωσης συνδυάζονται. Δίνεται ακόμα βάρος στη χρήση αποτελεσματικών ενζύμων υδρόλυσης της βιομάζας, και διεξάγεται έρευνα για την ανακάλυψη νέων ενζύμων, την τροποποίηση ήδη υπαρχόντων για την αύξηση της ενεργότητάς τους και την ανακάλυψη συνεργητικών δράσεων ανάμεσα σε διαφορετικά ένζυμα. Ακόμα, διαφορετικοί μικροοργανισμοί έχουν χρησιμοποιηθεί για τη ζύμωση, ανάλογα με το εύρος των σακχάρων που στοχεύεται να αξιοποιηθούν (για παράδειγμα, ορισμένοι εξ αυτών δε ζυμώνουν τις πεντόζες). Στους μελλοντικούς στόχους βρίσκεται και η ενοποιημένη βιοδιεργασία, όπου τα διακριτά στάδια συγχωνεύονται με τη χρήση ενός μόνο μικροοργανισμού.

Επομένως, το πρώτο στάδιο της μετατροπής βιομάζας σε αιθανόλη είναι η ελάττωση μεγέθους και η προκατεργασία. Κατά το δεύτερο στάδιο, οι ημικυτταρίνες και η κυτταρίνη υδρολύονται είτε χημικά (με οξέα) είτε βιολογικά (με κατάλληλα ένζυμα) και απελευθερώνουν τα μονομερή σάκχαρα. Στη συνέχεια, τα ζυμώσιμα σάκχαρα που προκύπτουν οδηγούνται προς την αναερόβια ζύμωση από μικροοργανισμούς, συνηθέστερα μύκητες. Η ενζυμική υδρόλυση και η ζύμωση μπορεί επίσης να πραγματοποιηθεί σε ένα συνδυασμένο βήμα, οπότε και γίνεται αναφορά στην ταυτόχρονη σακχαροποίηση και ζύμωση (simultaneous saccharification and fermentation –SSF). Μετά την απομόνωση και τον καθαρισμό της αιθανόλης (συνηθέστερα με απόσταξη, αλλά ενίοτε και με άλλες τεχνικές διαχωρισμού όπως τα μοριακά κόσκινα-molecular sieves) προκύπτει το τελικό προϊόν που μπορεί να αξιοποιηθεί ως καθαρό καύσιμο ή να αναμιχθεί με βενζίνη. Παράλληλα, μέρος της λιγνίνης, που αποτελεί και το σημαντικότερο ποσοστό του στερεού υπολείμματος της βιομάζας, μπορεί να καεί ώστε να παραχθεί θερμότητα αξιοποιήσιμη στη διεργασία. Νέες τεχνολογίες μάλιστα αναπτύσσονται ώστε να αξιοποιηθεί η λιγνίνη για την παραγωγή χημικών προϊόντων υψηλής προστιθέμενης αξίας (Zacchi 2006).

2.1 Προκατεργασία βιομάζας

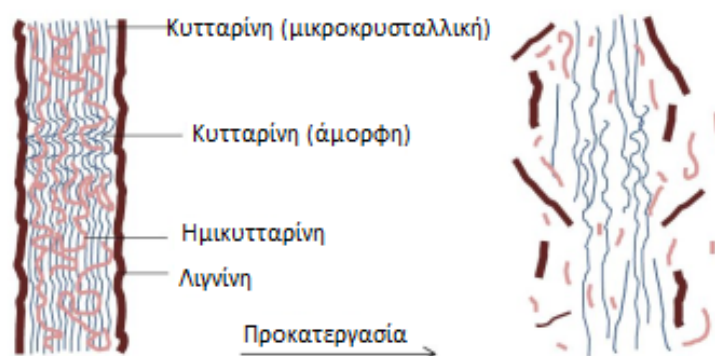
2.1.1 Στόχος προκατεργασίας βιομάζας

Ο κύριος στόχος της προεπεξεργασίας της βιομάζας είναι η αύξηση της διαθέσιμης επιφάνειας, η καταστροφή των κρυσταλλικών περιοχών και συχνά η απομάκρυνση της ημικυτταρίνης και λιγνίνης (Brodeur et al. 2011). Σε μοριακό επίπεδο, η προκατεργασία στοχεύει στη διάρρηξη των δεσμών υδρογόνου στην κρυσταλλική κυτταρίνη, στην καταστροφή της μήτρας όπου διαπλέκονται οι ημικυτταρίνη με τη λιγνίνη και στην αύξηση του πορώδους και της ενεργής επιφάνειας της κυτταρίνης για την ενζυμική

υδρόλυση (Haghighi Mood et al. 2013). Η ρήξη των κρυσταλλικών περιοχών της κυτταρίνης είναι ιδιαίτερα σημαντική για το μετέπειτα στάδιο της υδρόλυσης, είτε αυτή γίνεται χημικά είτε ενζυμικά, καθώς τα ένζυμα έχουν πρόσβαση σε μεγαλύτερο μέρος αυτής (Arantes and Saddler 2010). Στην περίπτωση μη κατεργασμένης βιομάζας η μετατροπή της κυτταρίνης σε γλυκόζη είναι τόσο αργή και η απόδοση τόσο χαμηλή που η διεργασία δε μπορεί να κριθεί οικονομικά βιώσιμη.

Η προκατεργασία μπορεί δυνητικά να είναι το πιο κοστοβόρο μέρος της διεργασίας, ωστόσο συνδέεται ιδιαίτερα την απόδοση της διεργασίας και τη μείωση του συνολικού κόστους (Korrgam et al. 2014). Εν μέρει αυτό εξηγείται διότι με αποτελεσματική προκατεργασία μειώνεται η απαιτούμενη ποσότητα υδρολυτικών ενζύμων, τα οποία αποτελούν μεγάλο ποσοστό του συνολικού κόστους. Τέλος, όσο πιο μικρή είναι η κοκκομετρία της βιομάζας και πιο κατεστραμμένη η δομή της κυτταρίνης, τόσο περισσότερο διευκολύνεται η πρόσβαση των ενζύμων, ωστόσο η απαίτηση σε ενέργεια αυξάνει σημαντικά όσο μειώνεται το απαιτούμενο μέγεθος της βιομάζας. Επομένως σε κάθε περίπτωση αναζητείται ένας συμβιβασμός από οικονομικής άποψης για τα στάδια της διεργασίας.

Τυπικά, στους στόχους της προκατεργασίας συμπεριλαμβάνονται η παραγωγή στερεού ευεπίφορου στην ενζυμική υδρόλυση, η αποφυγή της υποβάθμισης των σακχάρων (συμπεριλαμβανομένων και αυτών που προέρχονται από την ημικυτταρίνη), η ελαχιστοποίηση της παραγωγής παρεμποδιστών για το μετέπειτα στάδιο της ζύμωσης και η ανάκτηση της λιγνίνης για την παραγωγή ενέργειας ή χρήσιμων παραπροϊόντων (Brodeur et al. 2011). Ιδιαίτερως η ημικυτταρίνη είναι πιο ευαίσθητη σε υποβάθμιση, για το λόγο αυτό πρέπει να ελέγχονται οι συνθήκες της εκάστοτε προκατεργασίας, ώστε να αποφευχθεί ο σχηματισμός παρεμποδιστικών ουσιών (φουρφουράλες) (Haghighi Mood et al. 2013). Η αποτελεσματικότητα της προκατεργασίας συνήθως αξιολογείται με διαφορετικούς τρόπους: με ενζυμική υδρόλυση του προκύπτοντος στερεού για να μελετηθεί η ευκολία σακχαροποίησης, με ζύμωση του υγρού ώστε να εκτιμηθεί η επίδραση πιθανών αναστολέων, ή και με ταυτόχρονη σακχαροποίηση και ζύμωση του προκατεργασμένου υλικού για να εκτιμηθεί η συνολική απόδοση σε προϊόν.



Σχήμα 2.1: Στόχος της προκατεργασίας είναι η ρήξη των κρυσταλλικών περιοχών της κυτταρίνης και ο διαχωρισμός από τη λιγνίνη και την ημικυτταρίνη (Brodeur, 2010)

Οι μέθοδοι προκατεργασίας μπορούν να διαχωριστούν σε τέσσερις κατηγορίες: φυσικές, χημικές, φυσικοχημικές και βιολογικές. Όπως αναφέρθηκε, μια ιδανική μέθοδος θα πρέπει να μεγιστοποιεί την απόδοση σε σάκχαρα κατά την υδρόλυση, να ελαχιστοποιεί την πιθανότητα ύπαρξης παρεμποδιστών, να ελαχιστοποιεί την ενεργειακή κατανάλωση και να είναι φιλική προς το περιβάλλον. Καμία από της χρησιμοποιούμενες τεχνικές μέχρι στιγμής δεν καλύπτει όλα αυτά τα απαιτούμενα κριτήρια (Korppam et al. 2014; Zhao et al. 2012).

Διαφορετικές μέθοδοι προκατεργασίας φαίνεται να έχουν δώσει ανόμοια αποτελέσματα σε δείγματα βιομάζας από διαφορετικές πηγές, κυρίως λόγω της διακύμανσης στη σύσταση της βιομάζας. Για το λόγο αυτό είναι πολύ πιθανόν να μη βρεθεί μια γενική μέθοδος προκατεργασίας για βιομάζα κάθε είδους. Για παράδειγμα, μέθοδοι όπως η έκρηξη αμμωνίας και η υγρή οξείδωση είναι πιο αποτελεσματικές σε αγροτικά κατάλοιπα, ενώ η έκρηξη ατμού έχει δώσει υψηλές αποδόσεις σακχάρων τόσο σε αγροτικά όσο και δασικά κατάλοιπα (Zacchi 2006).

2.1.1.1 Φυσικές μέθοδοι προκατεργασίας

Οι φυσικές μέθοδοι προκατεργασίας σχετίζονται με την ελάττωση του μεγέθους της βιομάζας και της κρυσταλλικότητάς της μέσω άλεσης. Η βελτίωση της υδρόλυσης σε αυτή την περίπτωση οφείλεται στην διευκόλυνση των φαινομένων μεταφοράς μάζας λόγω της μικρής κοκκομετρίας. Οι ενεργειακές απαιτήσεις εξαρτώνται από το τελικό μέγεθος των κόκκων της βιομάζας και της μείωσης της κρυσταλλικότητας της λιγνινοκυτταρινούχας βιομάζας. Ωστόσο στις περισσότερες περιπτώσεις, η απαιτούμενη ενέργεια για να επιτευχθεί τέτοια κοκκομετρία ώστε να μην απαιτείται άλλο είδος προκατεργασίας είναι μεγαλύτερη από το θεωρητικό ενεργειακό περιεχόμενο της ίδιας της βιομάζας. Επομένως, δε θεωρείται πιθανό οι φυσικές μέθοδοι προκατεργασίας να αποτελέσουν αυτόνομη λύση, παρά μόνο ως πρώτο στάδιο σε συνδυασμό με κάποια άλλη μέθοδο (Brodeur et al. 2011).

2.1.1.2 Βιολογικές μέθοδοι προκατεργασίας

Η βιολογική προκατεργασία σχετίζεται με τη χρήση μικροοργανισμών, κυρίως μυκήτων, προκειμένου να αποικοδομηθεί η ημικυτταρίνη και η λιγνίνη, αφήνοντας άθικτη την κυτταρίνη. Η αποικοδόμηση της λιγνίνης προκύπτει μέσω ειδικών ενζύμων που εκκρίνονται από τους μύκητες, μια διαδικασία που συμβαίνει στη φύση μετά το θάνατο φυτών ή τμημάτων αυτών. Παρότι οι βιολογικές προκατεργασίες απαιτούν ήπιες συνθήκες και έχουν χαμηλό κόστος, ο ιδιαίτερα αργός ρυθμός της αποικοδόμησης τις καθιστά μη ανταγωνιστικές ως προς τις άλλες μεθόδους. Οι ερευνητικές προσπάθειες σε αυτόν τον τομέα επικεντρώνονται στην ανάπτυξη στελεχών ικανών για ταχύτερη λύση της ημικυτταρίνης και της λιγνίνης. Οι βιολογικές μέθοδοι μπορούν να θεωρηθούν αποδοτικές αν συνδυαστούν με άλλες χημικές ή φυσικοχημικές μεθόδους.

2.1.1.3 Χημικές μέθοδοι προκατεργασίας

Αλκαλική

Η αλκαλική προκατεργασία περιλαμβάνει τη χρήση βάσεων όπως υδροξείδιο του νατρίου, του καλίου, του ασβεστίου και του αμμωνίου. Η χρήση της βάσης προκαλεί την αποδόμηση των εστέρων και των γλυκοζιδικών πλάγιων αλυσίδων οδηγώντας στη δομική αλλοίωση της λιγνίνης, τη διόγκωση και τη μερική αποκρυσταλλοποίηση της κυτταρίνης και τη μερική διαλυτοποίηση των ημικυτταρινών. Με την απομάκρυνση της λιγνίνης διευκολύνεται η ενζυμική υδρόλυση, καθώς εξαλείφονται οι μη αποτελεσματικές θέσεις πρόσδεσης των ενζύμων. Το υδροξείδιο του νατρίου έχει κυρίως μελετηθεί στη βιβλιογραφία, με τα πειραματικά αποτελέσματα να καταδεικνύουν ότι επιδρά στη δομή της λιγνίνης της βιομάζας, επιτρέποντας την πρόσβαση των υδρολυτικών ενζύμων στην κυτταρίνη και τις ημικυτταρίνες. Επίσης, το υδροξείδιο του ασβεστίου έχει χρησιμοποιηθεί σε αρκετές μελέτες, με θετικά αποτελέσματα στην προκατεργασία στελεχών αραβοσίτου, σίτου, ζαχαροκάλαμου, switchgrass και άχυρου ρυζιού.

Η κατεργασία με NaOH προκαλεί την διόγκωση των πόρων του υλικού που οδηγεί σε αύξηση της εσωτερικής επιφάνειας επιτρέποντας έτσι την διείσδυση μορίων νερού σε εσωτερικά στρώματα και στην διάσπαση των δεσμών μεταξύ της ημικυτταρίνης και της λιγνίνης, σε μείωση της κρυσταλλικότητας της κυτταρίνης και στην διαταραχή της δομής της λιγνίνης. Επιπροσθέτως, η αλκαλική προκατεργασία απομακρύνει διάφορους υποκαταστάτες της ημικυτταρίνης που μειώνουν την προσβασιμότητα των ενζύμων στην επιφάνεια της ημικυτταρίνης και της κυτταρίνης (Alvira et al. 2010).

Οι συνθήκες της αλκαλικής προκατεργασίας είναι συνήθως πιο ήπιες από άλλων μεθόδων. Μπορεί να πραγματοποιηθεί σε συνθήκες περιβάλλοντος αλλά σε αυτή την περίπτωση ο χρόνος προκατεργασίας είναι εκτεταμένος από ώρες ως ημέρες (Korppam et al. 2014). Μπορεί επίσης να πραγματοποιηθεί σε συνθήκες σχετικά χαμηλών θερμοκρασιών και πιέσεων για να μειωθεί ο απαιτούμενος χρόνος. Η διαδικασία περιλαμβάνει αρχικά τον εμποτισμό της βιομάζας σε αλκαλικά διαλύματα σε συγκεκριμένη θερμοκρασία για τον απαιτούμενο χρόνο και στη συνέχεια ένα στάδιο αδρανοποίησης και απομάκρυνσης των σχηματιζόμενων παρεμποδιστών (άλατα, φαινολικά, φουρφουράλες και αλδεΐδες) πριν την ενζυμική υδρόλυση (Brodeur et al. 2011).

Σε σχέση με τις όξινες προκατεργασίες οι αλκαλικές μέθοδοι προκαλούν λιγότερη υποβάθμιση σακχάρων και πολλά από τα καυστικά άλατα μπορούν να ανακτηθούν και να ανακυκλωθούν. Σε αντίθεση με τις όξινες μεθόδους, που υδρολύουν τις ημικυτταρίνες και αφήνουν άθικτες την κυτταρίνη και τη λιγνίνη, οι αλκαλικές μέθοδοι επικεντρώνονται στη λιγνίνη, και δεν επηρεάζουν κυτταρίνη και ημικυτταρίνες. Αυτό αυξάνει στη συνέχεια το κόστος της υδρόλυσης, καθώς πρέπει να χρησιμοποιηθούν ένζυμα αποτελεσματικά για την κυτταρίνη αλλά και για τις ημικυτταρίνες. Η χημεία της προκατεργασίας επηρεάζει ακόμα και το σχηματισμό των παρεμποδιστών. Ενώ οι όξινες προκατεργασίες μπορεί να οδηγήσουν σε σχηματισμό υψηλών συγκεντρώσεων φουρφουράλης, οι αλκαλική μέθοδος σχετίζεται με το σχηματισμό φερουλικού και οξικού οξέος (Gray, Zhao, and

Emptage 2012). Ένα από τα πλεονεκτήματα της αλκαλικής προκατεργασίας το σχετικά μειωμένο κόστος, που βέβαια εξαρτάται και από το είδος του αλκάλειου που θα χρησιμοποιηθεί. Αρκετές μελέτες έχουν επίσης συνδυάσει την αλκαλική προκατεργασία με άλλες μεθόδους, όπως την υγρή οξείδωση, την έκρηξη ατμού και την έκρηξη αμμωνίας (Kumar et al. 2009).

Όξινη

Η όξινη προκατεργασία αφορά τη χρήση πυκνών ή αραιωμένων οξέων για την αποδόμηση της δομής του λιγνινοκυτταρινούχου υλικού. Ο κύριος στόχος είναι η διαλυτοποίηση του κλάσματος ημικυτταρίνης της βιομάζας και η αύξηση της επιδεκτικότητας της κυτταρίνης σε ένζυμα.

Το πιο διαδεδομένο οξύ είναι το αραιό θειικό οξύ (H_2SO_4), το οποίο έχει χρησιμοποιηθεί και εμπορικά για την προκατεργασία μεγάλης ποικιλίας ειδών βιομάζας, όπως στελεχών καλαμποκιού, switchgrass, ξύλου έλατου και λεύκας. Η κατεργασία με αραιό οξύ μπορεί να πραγματοποιηθεί σε υψηλές θερμοκρασίες ($180^{\circ}C$) για μικρό χρονικό διάστημα ή σε χαμηλές θερμοκρασίες ($120^{\circ}C$) για μεγαλύτερα χρονικά διαστήματα (30-90 min). Γενικά, υψηλότερες θερμοκρασίες προκατεργασίας και μικρότεροι χρόνοι παραμονής έχουν ως αποτέλεσμα υψηλότερα ποσοστά ανάκτησης ξυλόζης. Άλλα οξέα που έχουν χρησιμοποιηθεί είναι το υδροχλωρικό οξύ (HCl), το φωσφορικό οξύ (H_3PO_4) και το νιτρικό οξύ (HNO_3). Η χρήση πυκνού οξέος είναι λιγότερο ελκυστική όταν πρόκειται για παραγωγή αιθανόλης εξαιτίας του σχηματισμού παρεμποδιστών (φουρφουράλη και υδροξυμεθυλφουρφουράλη- HMF) (Brodeur et al. 2011; Haghghi Mood et al. 2013; Korppam et al. 2014).

Ένα από τα πλεονεκτήματα της όξινης προκατεργασίας είναι ότι συντελεί στην υδρόλυση των σακχάρων, κάτι που διευκολύνει τα μετέπειτα στάδια της διεργασίας. Ωστόσο, είναι απαραίτητο στάδιο πλύσης και αποτοξικοποίησης πριν την ενζυμική υδρόλυση, ώστε να απομακρυνθεί το οξύ και παρεμποδιστές. Στα μειονεκτήματα συμπεριλαμβάνονται και το κόστος του εξοπλισμού, ο οποίος θα πρέπει να είναι ανθεκτικός στη διάβρωση, καθώς και η περιορισμένη δυνατότητα ανάκτησης των οξέων. Το υψηλό λειτουργικό κόστος και το υψηλό κόστος συντήρησης είναι ανασταλτικοί παράγοντες στην εφαρμογή της όξινης προκατεργασίας με την χρησιμοποίηση πυκνών οξέων σε εμπορική κλίμακα (Alvira et al. 2010; Brodeur et al. 2011).

Λόγω της ικανότητας των οξέων να απομακρύνουν τις ημικυτταρίνες, χρησιμοποιούνται συχνά επικουρικά και σε άλλες μεθόδους προκατεργασίας. Για παράδειγμα, μια διεργασία δύο σταδίων, με το πρώτο στάδιο να απομακρύνει τις ημικυτταρίνες μέσω οξέων και το δεύτερο στάδιο να απομακρύνει τη λιγνίνη μέσω βάσεων, οδηγεί σε σχεδόν καθαρή κυτταρίνη (Brodeur et al. 2011).

Εναλλακτικοί διαλύτες

Τα τελευταία χρόνια η έρευνα έχει επεκταθεί και στα ιοντικά υγρά (ionic liquids-IL) για την προκατεργασία της βιομάζας. Τα ιοντικά υγρά είναι άλατα τα οποία αποτελούνται από ένα μεγάλο οργανικό κατιόν και ένα μικρό ανόργανο ανιόν και τα οποία είναι σε υγρή μορφή σε σχετικά χαμηλές θερμοκρασίες, ενώ έχουν χαμηλή τάση ατμών. Η χημεία ανιόντος-κατιόντος μπορεί να ρυθμιστεί ώστε να είναι δυνατή η διάλυση μεγάλου εύρους ειδών βιομάζας: αραβόσιτος, βαμβάκι, ζαχαροκάλαμο, switchgrass, άχυρο σίτου και ξυλώδη μέρη διαφορετικής σκληρότητας (έλατο, λεύκα, ευκάλυπτος και δρυς). Η χαμηλή τάση ατμών των ιοντικών υγρών καθιστά την ανάκτησή τους εύκολη, κάτι που μειώνει το λειτουργικό κόστος. Παράλληλα, δεν δημιουργούνται τοξικά παραπροϊόντα κατά τη χρήση τους, για αυτό θεωρούνται πράσινοι διαλύτες. Στα μειονεκτήματα συγκαταλέγονται το αυξημένο κόστος και η τάση των ιοντικών υγρών να απενεργοποιούν την κυτταρίνη (Alvira et al. 2010; Sun et al. 2011).

Στην οξειδωτική προκατεργασία οξειδωτικά όπως το υπεροξικό οξύ ή το υπεροξειδίο υδρογόνου χρησιμοποιούνται για την κατεργασία λιγνινοκυτταρινούχας βιομάζας σε υγρό περιβάλλον. Ένας οργανικός διαλύτης ή ένα υδατικό μίγμα οργανικών διαλυτών παρουσία ανόργανων όξινων καταλυτών διασπά τους εσωτερικούς δεσμούς λιγνίνης και ημικυτταρίνης. Ορισμένοι οργανικοί διαλύτες που χρησιμοποιούνται είναι αιθανόλη, μεθανόλη, ακετόνη, γλυκόλη, τριαιθυλενική γλυκόλη. Τέλος, το όζον είναι ένα ισχυρό οξειδωτικό που συνεισφέρει αποτελεσματικά στην απολιγνινοποίηση του υλικού. Η απομάκρυνση της λιγνίνης αυξάνει την απόδοση του ακολουθούμενου σταδίου, της ενζυμικής υδρόλυσης.

2.1.1.4 Φυσικοχημικές μέθοδοι

Υγρή οξείδωση-Wet oxidation

Η υγρή οξείδωση είναι μια οξειδωτική μέθοδος προκατεργασίας που χρησιμοποιεί οξυγόνο ή αέρα καταλυτικά. Δύο αντιδράσεις λαμβάνουν χώρα κατά την κατεργασία: αντίδραση υδρόλυσης σε χαμηλή θερμοκρασία και αντίδραση οξείδωσης σε υψηλή θερμοκρασία. Η προκατεργασία πραγματοποιείται για 10-15 λεπτά σε θερμοκρασίες 170-200°C και σε πιέσεις 10-12 bar. Συνήθως εισάγεται μια ουσία όπως το Na_2CO_3 για να μειωθεί ο σχηματισμός των παραπροϊόντων. Η προσθήκη οξυγόνου σε θερμοκρασίες πάνω από 170°C καθιστά τη διεργασία εξώθερμη μειώνοντας τις ενεργειακές δαπάνες (Hayes 2009).

Η υγρή οξείδωση μπορεί να χρησιμοποιηθεί για την θραύση σε μοριακό επίπεδο της λιγνινοκυτταρινούχας βιομάζας μέσω της διαλυτοποίησης της ημικυτταρίνης και την απομάκρυνση της λιγνίνης. Οι κύριες αντιδράσεις στην υγρή προκατεργασία οξείδωσης είναι ο σχηματισμός οξέων από τις υδρολυτικές διαδικασίες και οι οξειδωτικές αντιδράσεις. Αυτή η μέθοδος είναι αποτελεσματική για την διαλυτοποίηση της ημικυτταρίνης αλλά είναι κατάλληλη για υλικά χαμηλής περιεκτικότητας σε λιγνίνη, αφού η απόδοση δείχνει να μειώνεται όταν αυξάνεται η περιεκτικότητα σε λιγνίνη. Κατά την κατεργασία, η λιγνίνη αποσυντίθεται σε διοξείδιο του άνθρακα, νερό και καρβοξυλικά

οξέα. Το ποσοστό της λιγνίνης που απομακρύνεται κυμαίνεται από 50% ως 70% και εξαρτάται από τον τύπο της βιομάζας και τις συνθήκες της μεθόδου. Αν και για ορισμένα στελέχη η υγρή οξείδωση είναι πιο αποτελεσματική σε σχέση με άλλες μεθόδους, όπως η έκρηξη ατμού, συχνά οδηγεί σε πολύ υψηλότερες συγκεντρώσεις παραπροϊόντων. Στα παραπροϊόντα περιλαμβάνονται τα φορμικό οξύ, οξικό οξύ, φαινολικές ενώσεις, και φουρφουράλες που μπορεί να έχουν ανασταλτικές δράσεις στα επόμενα στάδια παραγωγής (Brodeur et al. 2011; Haghghi Mood et al. 2013).

Η υγρή οξείδωση έχει δώσει θετικά αποτελέσματα κατά την κατεργασία μεγάλου εύρους ειδών βιομάζας: άχυρο σίτου, αραβόσιτος, ζαχαροκάλαμο, ζαχαρότευτλο, σίκαλη και καλάμι, με αποτελεσματική ανάκτηση γλυκόζης και ξυλόζης μετά την ενζυμική υδρόλυση. Μάλιστα είδη όπως το άχυρο, τα καλάμια και άλλα αγροτικά υπολείμματα δημητριακών περιέχουν μια κηρώδη πρωτεϊνική ουσία που απομακρύνεται κατά την υγρή οξείδωση (Georgieva et al. 2008). Συνδυασμός της υγρής οξείδωσης με την αλκαλική προκατεργασία έχει αποδειχθεί να μειώνει το σχηματισμό των παραπροϊόντων και άρα να μειώνει την παρεμπόδιση (Kumar et al. 2009). Επίσης, σε συνδυασμό με την έκρηξη ατμού, προκύπτει μια νέα μέθοδος που ονομάζεται υγρή έκρηξη και κατά την οποία η βιομάζα υφίσταται και φυσική ρήξη σε συνδυασμό με τη χημική αντίδραση.

Υδροθερμόλυση-Liquid Hot Water

Η μέθοδος χρησιμοποιεί θερμό νερό σε υγρή κατάσταση σε υψηλές θερμοκρασίες και υψηλές πιέσεις (ώστε να διατηρείται το νερό υγρό) ώστε να επιτευχθεί καταστροφή και διαχωρισμός της λιγνινοκυτταρινικής μήτρας. Στόχος της προκατεργασίας είναι η διαλυτοποίηση των ημικυτταρινών και η απομάκρυνσή τους από την υπόλοιπη μήτρα με ταυτόχρονη ελαχιστοποίηση των παρεμποδιστών. Η απομόνωση των ινών κυτταρίνης αλλά και η γενικότερη διατάραξη της δομής της βιομάζας επιτυγχάνεται μέσω της διείσδυσης των μορίων του νερού. Στη συνέχεια η διαλυτοποίηση ημικυτταρίνης και λιγνίνης οδηγεί στο σχηματισμό θερμού αραιού οξέος που επιταχύνει τη δράση. Οι θερμοκρασίες της μεθόδου κυμαίνονται στο εύρος 160-240°C και οι χρόνοι κατεργασίας από λίγα λεπτά ως ώρες. Η θερμοκρασία επηρεάζει κυρίως τον τύπο των σακχάρων που σχηματίζονται και ο χρόνος το εύρος του σχηματισμού. Η κατεργασία χρησιμοποιεί πολλές από τις κύριες αρχές της έκρηξη ατμού, κυρίως την αυτοϋδρόλυση, χωρίς όμως την απότομη αποσυμπίεση της μεθόδου. Δύο προϊόντα σχηματίζονται από αυτή την κατεργασία: η υγρή φάση που είναι πλούσια σε ημικυτταρίνη (και υδρολυμένα σάκχαρα-κυρίως ξυλόζη) και λιγνίνη και η στερεή φάση που είναι πλούσια σε κυτταρίνη. Για την αποφυγή του σχηματισμού παρεμποδιστών το pH πρέπει να διατηρείται στο 4-7.

Η προκατεργασία με θερμό νερό απομακρύνει μέχρι και το 80% της ημικυτταρίνης και ενισχύει την ενισχύει την επιδεκτικότητα του υλικού σε ένζυμα, ενώ η λιγνίνη αποπολυμερίζεται και διαλυτοποιείται μερικώς κατά την προκατεργασία. Γενικά, η προκατεργασία με θερμό νερό είναι ελκυστική καθώς δεν απαιτείται καταλύτης και το κόστος κατασκευής και συντήρησης είναι χαμηλό αφού υπάρχει χαμηλός κίνδυνος για διάβρωση. Έχει επίσης

το μεγάλο πλεονέκτημα της μειωμένης συγκέντρωσης παραπροϊόντων και αυτό οφείλεται στο ότι τα διαλυμένα προϊόντα της ημικυτταρίνης και της λιγνίνης βρίσκονται σε χαμηλή συγκέντρωση εξαιτίας των υψηλών ποσοτήτων νερού που χρησιμοποιούνται. Ωστόσο, αυτή η διεργασία απαιτεί υψηλές ποσότητες νερού και περισσότερη ενέργεια από ότι διεργασίες που όπως η προκατεργασία με εκτόνωση ατμού (Alvira et al. 2010; Brodeur et al. 2011; Hayes 2009; Kumar et al. 2009).

Έκρηξη Αμμωνίας-Ammonia fiber explosion

Κατά την έκρηξη αμμωνίας, η βιομάζα υφίσταται κατεργασία με υγρή άνυδρη αμμωνία υπό υψηλές πιέσεις (>3MPa) και μέτριες θερμοκρασίες (60-100°C) και στη συνέχεια αποσυμπιέζεται απότομα. Το μίγμα βιομάζας και υγρής αμμωνίας αφήνεται για μερικά λεπτά ώστε να προκύψει αποτελεσματική διαβροχή και στη συνέχεια συμπιέζεται σε κλειστό αντιδραστήρα και εκτονώνεται απότομα σε ατμοσφαιρικές συνθήκες. Η ραγδαία εκτόνωση της αέριας αμμωνίας προκαλεί διόγκωση των πόρων της βιομάζας, μηχανική διαταραχή των ινών της μήτρας, ρηγμάτωση των δεσμών της λιγνίνης με τα λοιπά συστατικά και μερική αποκρυστάλλωση της κυτταρίνης. Το εύρος της αποδόμησης της λιγνινοκυτταρινικής μήτρας εξαρτάται από τη θερμοκρασία, καθώς η θερμοκρασία επηρεάζει το ρυθμό της εξάτμισης της αμμωνίας μέσα στον αντιδραστήρα κατά την αποσυμπίεση. Ο χρόνος κατεργασίας κυμαίνεται από λίγα λεπτά ως και λίγες ώρες, ανάλογα με το είδος της βιομάζας. Σε τυπικές διεργασίες, απαιτείται περίπου 1-2kg αμμωνίας ανά κιλό βιομάζας (Brodeur et al. 2011; Korppam et al. 2014; Mosier et al. 2005).

Η μέθοδος αυτή δεν αφαιρεί τη λιγνίνη ή άλλα συστατικά από τη βιομάζα, ωστόσο τα συμπλέγματα λιγνίνης-πολυσακχαριτών σχίζονται και η λιγνίνη τείνει να εναποτίθεται στην επιφάνεια του υλικού. Αυτό συχνά προκαλεί προβλήματα στα μετέπειτα στάδια, καθώς εμποδίζει την πρόσβαση των κυτταρινασών στις ίνες της κυτταρίνης. Στα πλεονεκτήματα της μεθόδου συγκαταλέγονται το χαμηλό επίπεδο παραγωγής προϊόντων υποβάθμισης σακχάρων λόγω των ήπιων συνθηκών, η πλήρης ανάκτηση του στερεού υλικού και η αναστολή της επίδρασης της λιγνίνης στην ενζυμική υδρόλυση. Η μέθοδος είναι πιο αποτελεσματική σε βιομάζα με χαμηλή περιεκτικότητα σε λιγνίνη, ενώ η ανάκτηση της αμμωνίας θεωρείται απαραίτητη για τη μείωση του κόστους της κατεργασίας. Η ανάκτηση και η ανακύκλωση της αμμωνίας είναι εφικτή εξαιτίας της υψηλής της πτητικότητας, όμως σε κάθε περίπτωση η πολυπλοκότητα και το κόστος για αυτές τις διεργασίες είναι σημαντικά (Alvira et al. 2010; Brodeur et al. 2011).

Ένας άλλος τύπος διεργασίας που χρησιμοποιεί αμμωνία είναι η μέθοδος της ανακύκλωσης και διήθησης της αμμωνίας (ammonia recycle percolation). Σε αυτή την διεργασία υδατική αμμωνία διαπερνά τη βιομάζα σε αυξανόμενες θερμοκρασίες (140-210°C) με την αμμωνία να ανακτάται αργότερα. Αυτή η μέθοδος είναι αποτελεσματική στην απομάκρυνση της λιγνίνης (κυρίως σε αγροτικά υπολείμματα) στην διαλυτοποίηση της ημικυτταρίνης διατηρώντας ανέπαφο το κλάσμα της κυτταρίνης (Hayes 2009; Korppam et al. 2014).

Organosolv

Η μέθοδος βασίζεται στην κατεργασία βιομάζας με οργανικό διαλύτη ή μίγμα οργανικού και υδατικού διαλύτη παρουσία ανόργανων οξέων που δρουν ως καταλύτες (HCl , H_2SO_4), σε υψηλές θερμοκρασίες. Οι διαλύτες που χρησιμοποιούνται συνήθως είναι αιθανόλη, μεθανόλη, ακετόνη, και οργανικά οξέα όπως το οξικό και το φορμικό οξύ ή συνδυασμοί αυτών. Η μέθοδος απομακρύνει τη λιγνίνη από τη βιομάζα, με τον οργανικό διαλύτη να λειτουργεί ως εκχυλιστικό μέσο της λιγνίνης, ενώ η ημικυτταρίνη αποπολυμερίζεται μέσω όξινης υδρόλυσης. Ουσιαστικά, η μέθοδος συμπεριλαμβάνει ταυτόχρονη προϋδρόλυση και απολιγνινοποίηση της βιομάζας (Korppam et al. 2014).

Γενικώς, η κατεργασία έχει ως στόχο την θραύση της βιομάζας στα επιμέρους κλάσματα, σε αντίθεση με άλλες μεθόδους προκατεργασίας, που δεν στοχεύουν στην ανάκτηση καθαρής λιγνίνης. Η λιγνίνη που προέρχεται από τη μέθοδο organosolv χαρακτηρίζεται από υψηλότερη καθαρότητα, επομένως μπορεί να αξιοποιηθεί σε μεγαλύτερο εύρος εφαρμογών (Wild et al. 2015). Η κυτταρίνη υδρολύεται μερικώς σε μικρότερα θραύσματα τα οποία εξακολουθούν να είναι αδιάλυτα, ενώ η ημικυτταρίνη υδρολύεται κυρίως σε διαλυτά συστατικά, ολιγοσακχαρίτες, μονοσακχαρίτες, και οξικό οξύ. Το οξικό οξύ μειώνει το pH, ενισχύοντας την όξινη υδρόλυση για τα λοιπά συστατικά. Ορισμένες από τις πεντόζες αφυδατώνονται λόγω των συνθηκών της κατεργασίας και μετατρέπονται σε φουρφουράλες.

Οι διαλύτες που χρησιμοποιούνται στη διεργασία απομακρύνονται από τον αντιδραστήρα, εξατμίζονται και συμπυκνώνονται ώστε να ανακυκλωθούν. Εκτός από τη μείωση του κόστους, η απομάκρυνση είναι απαραίτητη διότι οι διαλύτες μπορεί να έχουν ανασταλτική δράση στους μικροοργανισμούς της ζύμωσης και στα ένζυμα της υδρόλυσης. Η υψηλή τιμή των διαλυτών είναι ένας σημαντικός παράγοντας που περιορίζει τις βιομηχανικές εφαρμογές. Ανάμεσα στους πιθανούς διαλύτες οι αλκοόλες με μικρό μοριακό βάρος προτιμώνται, λόγω της εύκολης ανάκτησης τους που οφείλεται στο χαμηλό σημείο ζέσεως του (Alvira et al. 2010; Korppam et al. 2014).

Έκρηξη ατμού- Steam explosion

Η έκρηξη ατμού είναι μια υδροθερμική προκατεργασία στην οποία το υλικό υπόκειται σε θερμό ατμό ($180\text{-}240^\circ\text{C}$) υπό πίεση ($1\text{-}3.5\text{ MPa}$) και στη συνέχεια αποσυμπιέζεται απότομα. Η εκρηκτική αποσυμπίεση προκαλεί τη θραύση της δομής της βιομάζας, αποπλέκει τις ίνες της κυτταρίνης και εξασφαλίζει έτσι την πρόσβαση των υδρολυτικών ενζύμων σε αυτή (Brodeur et al. 2011). Ανάλογα με το χρόνο παραμονής στον αντιδραστήρα και τη θερμοκρασία η έκρηξη ατμού μπορεί να οδηγήσει από περιορισμένη ρηγματώση της βιομάζας ως και σε πλήρη αποσυνέλιξη των ινών της. Παράλληλα, οξικό οξύ απελευθερώνεται από τη βιομάζα, με αποτέλεσμα να ελαττώνεται το pH και να υδρολύονται μερικώς η κυτταρίνη και η ημικυτταρίνη. Μάλιστα, η επιπλέον χρήση οξέων (κυρίως H_2SO_4) σε χαμηλές συγκεντρώσεις έχουν δώσει θετικά αποτελέσματα, επιταχύνοντας τη διεργασία και οδηγώντας σε υψηλότερους ρυθμούς υδρόλυσης (Korppam et al. 2014).

Αναλυτικά, η ημικυτταρίνη υδρολύεται από το οξικό και άλλα οξέα που απελευθερώνονται κατά την έκρηξη ατμού και η απομάκρυνση της ημικυτταρίνης θεωρείται πως καθιστά διαθέσιμη την επιφάνεια της κυτταρίνης. Η λιγνίνη απομακρύνεται σε μικρό ποσοστό, ωστόσο ανακατανέμεται στις επιφάνειες των ινών της βιομάζας ως αποτέλεσμα των αντιδράσεων αποπολυμερισμού/πολυμερισμού που λαμβάνουν χώρα. Η απομάκρυνση και η ανακατανομή ημικυτταρίνης και λιγνίνης οδηγεί σε αύξηση του όγκου του δείγματος, ενώ η απότομη εκτόνωση σε ατμοσφαιρική πίεση προκαλούν θραύση, αυξάνοντας τη διαθέσιμη επιφάνεια (Korrgam et al. 2014; Mosier et al. 2005). Το νερό δρα ως οξύ σε υψηλές θερμοκρασίες, ενώ προσθήκη H_2SO_4 (ή SO_2) ή CO_2 σε τυπικές συγκεντρώσεις 0.3-3% (w/w) μπορεί να μειώσει τον απαιτούμενο χρόνο και θερμοκρασία της κατεργασίας και να οδηγήσει σε πλήρη απομάκρυνση της ημικυτταρίνης. Για την προκατεργασία ξυλώδους βιομάζας η προσθήκη οξέων θεωρείται προϋπόθεση προκειμένου να καταστεί το υπόστρωμα προσβάσιμο στα ένζυμα (Zacchi 2006).

Οι παράγοντες που επηρεάζουν την κατεργασία είναι ο χρόνος παραμονής, η θερμοκρασία, η κοκκομετρία και η υγρασία του δείγματος. Η βέλτιστη διαλυτοποίηση και υδρόλυση της ημικυτταρίνης επιτυγχάνεται είτε με υψηλή θερμοκρασία και μικρό χρόνο παραμονής (270°C, 1 min) ή με χαμηλή θερμοκρασία και μεγαλύτερο χρόνο παραμονής (190°C, 10 min). Πρόσφατες έρευνες έχουν δείξει ότι χαμηλότερες θερμοκρασίες για μεγαλύτερους χρόνους παραμονής δίνουν ευνοϊκότερα αποτελέσματα (Sun and Cheng 2002). Το μέγεθος των σωματιδίων είναι βασικός παράγοντας της απόδοσης της κατεργασίας, ενώ έχει δείχθει ότι και σχετικά μεγάλο σωματίδια βιομάζας μπορούν να δώσουν τη μέγιστη θεωρητικά συγκέντρωση σακχάρων. Αυτό είναι ιδιαίτερα σημαντικό, καθώς η μείωση της κοκκομετρίας της βιομάζας συνδέεται με σημαντικές αυξήσεις του κόστους (Zhao et al. 2012). Τέλος, λόγω του σχηματισμού προϊόντων υποβιβασμού της βιομάζας που δρουν ως παρεμποδιστές η προκατεργασμένη βιομάζα πρέπει να υποστεί ένα στάδιο πλύσης πριν τη συνέχεια της διεργασίας. Ωστόσο η πλύση μειώνει τις συνολικές αποδόσεις, λόγω της απομάκρυνσης διαλυτών σακχάρων από την υδρόλυση της ημικυτταρίνης και εν μέρει της κυτταρίνης (Sun and Cheng 2002).

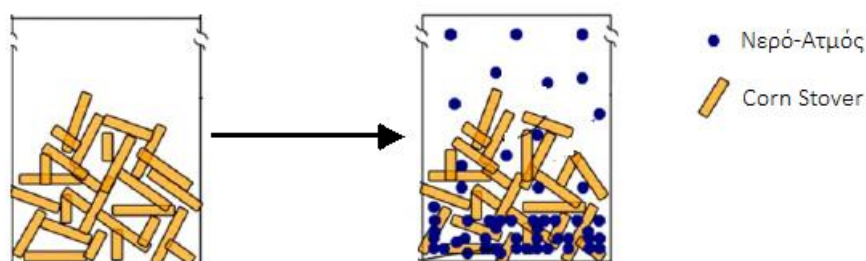
Στα πλεονεκτήματα της μεθόδου συγκαταλέγονται: (α) Η χρήση μόνο νερού και όχι κάποιου άλλου χημικού, (β) η υψηλή απόδοση ημικυτταρινών χωρίς το σχηματισμό παραπροϊόντων, (γ) ελάχιστη διάβρωση εξοπλισμού σε σχέση με τις όξινες μεθόδους προκατεργασίας, (δ) εξάλειψη κόστους ανακυκλώσεων (ε) η δυνατότητα επεξεργασίας πιο χονδρόκοκκης βιομάζας (Stelte 2011). Θεωρείται η πιο αποτελεσματική και οικονομική μέθοδος για την κατεργασία αγροτικών υπολειμμάτων, αλλά είναι λιγότερο αποτελεσματική στην ξυλώδη βιομάζα.

Στα μειονεκτήματα της μεθόδου συμπεριλαμβάνονται η μερική αποικοδόμηση της ημικυτταρίνης και η παραγωγή μερικών τοξικών ενώσεων (ανάλογα με την πρώτη ύλη και τις συνθήκες της προκατεργασίας) που μπορεί να επηρεάσουν τα στάδια της υδρόλυσης και της ζύμωσης. Οι κυριότεροι παρεμποδιστές είναι παράγωγα φουρανίου, φαινολικές ενώσεις και ασθενή οξέα. Η φουρφουράλη και η 5-υδροξυμεθυλοφουρφουράλη είναι τα κύρια παράγωγα του φουρανίου, τα οποία σχηματίζονται από την αποικοδόμηση των

πεντοζών και των εξοζών, αντίστοιχα. Και τα δύο θεωρούνται ότι παρατείνουν την λανθάνουσα φάση στο στάδιο της ζύμωσης. Τα ασθενή οξέα που σχηματίζονται κατά την διάρκεια της προκατεργασίας είναι κυρίως οξικά οξέα που προέρχονται από το κλάσμα της ημικυτταρίνης και οξέα όπως το μυρμηκικό που προέρχεται από περαιτέρω αποικοδόμηση της φουρφουράλης. Οι φαινολικές ενώσεις που σχηματίζονται προέρχονται από την διάσπαση της λιγνίνης και ποικίλλουν ανάλογα με την πρώτη ύλη (Alvira et al. 2010; Stelte 2011).

Η έκρηξη ατμού είναι η μέθοδος που βρίσκεται πιο κοντά στην βιομηχανική εφαρμογή. Έχει ελεγχθεί ευρέως σε πιλοτική κλίμακα, για παράδειγμα στο πιλοτικό εργοστάσιο Iogen στον Καναδά, στο πιλοτικό εργοστάσιο Soustou στη Γαλλία και στο Örnsko ĩdsvik στη Σουηδία. Εργαστηριακά, η μέθοδος έχει δώσει θετικά αποτελέσματα σε βιομάζα διάφορων ειδών τα τελευταία χρόνια. Ενδεικτικά παρατίθενται οι αποδόσεις συγκριτικά με μη προκατεργασμένη βιομάζα για δείγματα διαφορετικής προέλευσης. Σε ρινίσματα λεύκας προέκυψε 90% απόδοση γλυκόζης μετά από ενζυμική υδρόλυση σε σχέση με απόδοση 15% σε μη κατεργασμένη βιομάζα, ενώ σε υπολείμματα ξυλείας ελιάς επιτεύχθηκε απόδοση 50% των ολικών σακχάρων. Σε αραβόσιτο παρατηρήθηκε 73% ανάκτηση των θεωρητικών σακχάρων και σε άχυρο σίτου 80% της θεωρητικής μετατροπής σε βιοαιθανόλη. Η ξυλώδης βιομάζα είναι πιο ανθεκτική, όμως έχει δώσει αισιόδοξα αποτελέσματα όταν προστίθενται αραιά οξέα ως καταλύτες (Brodeur et al. 2011).

Τέλος, προκειμένου να μεγιστοποιηθεί η ανάκτηση των σακχάρων έχει προταθεί εναλλακτικά μέθοδος προκατεργασίας σε δύο στάδια. Στο πρώτο, η προκατεργασία πραγματοποιείται στους 180°C ώστε να διαλυτοποιηθεί το κλάσμα της ημικυτταρίνης και να απομακρυνθεί. Το κλάσμα της κυτταρίνης υπόκειται στο δεύτερο στάδιο της προκατεργασίας σε θερμοκρασίες άνω των 210°C και κάτω των 240°C. Με αυτόν τον τρόπο προκύπτουν υψηλότερες αποδόσεις αιθανόλης και στην ενζυμική υδρόλυση απαιτούνται μικρότερες ποσότητες ενζύμων. Ταυτόχρονα μειώνεται το λειτουργικό κόστος λόγω του περιορισμού της χρήσης ενζύμων, όμως υψηλότερα κόστη σχετίζονται με τον εξοπλισμό και την απαιτούμενη ενέργεια των δύο σταδίων (Brodeur et al. 2011).



Σχήμα 2.2: Σχηματική απεικόνιση της προκατεργασίας έκρηξης ατμού. Η απότομη εναλλαγή φάσης του νερού ανάμεσα σε υγρό και ατμό οδηγεί σε διάσπαση της δομής της βιομάζας και διαλυτοποίηση της ημικυτταρίνης. (Lynd, 2009)

2.1.2 Σύγκριση-Πλεονεκτήματα-Μειονεκτήματα

Στον παρακάτω πίνακα συνοψίζονται οι συνθήκες κάθε μεθόδου προκατεργασίας και οι περιορισμοί και τα μειονεκτήματά που παρουσιάζονται (Alvira et al. 2010; Brodeur et al. 2011; Kumar et al. 2009; Sarkar et al. 2012).

Πίνακας 2.1: Σύνοψη των σημαντικότερων μεθόδων προκατεργασίας, επίδρασης στη βιομάζα και τα παραγόμενα προϊόντα και μειονεκτημάτων και περιορισμών που παρουσιάζονται

| Προκατεργασία | Επίδραση στη βιομάζα | Μειονεκτήματα |
|----------------------|--|---|
| Μηχανική | Μείωση κρυσταλλικότητας κυτταρίνης | Η απαραίτητη ενέργεια είναι μεγαλύτερη από τη διαθέσιμη ενέργεια της βιομάζας |
| Βιολογική | Αποδόμηση ημικυτταρινών και λιγνίνης, μικρή κατανάλωση ενέργειας | Εξαιρετικά χαμηλός ρυθμός υδρόλυσης |
| Όξινη | Υδρόλυση ημικυτταρίνης, μερική απομάκρυνση λιγνίνης, μικρή ή καθόλου διάλυση κυτταρίνης | Υψηλό κόστος, δημιουργία διαβρωτικών ουσιών, δημιουργία παρεμποδιστών |
| Αλκαλική | Απομάκρυνση ημικυτταρινών και λιγνίνης, αύξηση διαθέσιμης επιφάνειας | Μεγαλύτεροι χρόνοι κατεργασίας, δύσκολη ανάκτηση αντιδραστηρίων |
| Όζον- Άλλοι διαλύτες | Μείωση λιγνίνης, μικρός σχηματισμός παρεμποδιστών | Υψηλό κόστος, τάση απενεργοποίησης κυτταρίνης |
| Organosolv | Απολιγνινοποίηση και υδρόλυση ημικυτταρινασών | Η ανακύκλωση των διαλυτών συνεπάγεται υψηλό κόστος |
| Έκρηξη αμμωνίας | Αύξηση της διαθέσιμης επιφάνειας, μερική απομάκρυνση λιγνίνης και ημικυτταρίνης, χαμηλός σχηματισμός παρεμποδιστών | Μη αποδοτική σε βιομάζα με υψηλό περιεχόμενο σε λιγνίνη, κόστος αμμωνίας και ανακύκλωσής της |
| Wet oxidation | Απολιγνινοποίηση, διαλυτοποίηση ημικυτταρινών | Σχηματισμός παραπροϊόντων και παρεμποδιστών, υψηλότερο κόστος |
| Liquid Hot Water | Μερική απολιγνινοποίηση, απομάκρυνση ημικυτταρινών | Υψηλό κόστος ενέργειας και νερού |
| Steam explosion | Μερική απολιγνινοποίηση, απομάκρυνση ημικυτταρινών με χαμηλό κόστος | Δημιουργία παρεμποδιστών, ανάγκη προσθήκης οξέων αν το υλικό έχει υψηλό περιεχόμενο λιγνίνης, μερική υποβάθμιση ημικυτταρινών |

2.2 Υδρόλυση βιομάζας

Η κυτταρίνη και ημικυτταρίνη μπορούν να υδρολυθούν σε απλά σάκχαρα είτε ενζυμικά, είτε χημικά μέσω όξινης κατεργασίας. Τα προϊόντα της υδρόλυσης είναι εξόζες, οι οποίες ζυμώνονται εύκολα προς αιθανόλη, και πεντόζες, οι οποίες ζυμώνονται μόνο από μερικά μικροβιακά στελέχη (Lynd et al. 2002).

2.2.1 Χημική υδρόλυση

Η χημική υδρόλυση της βιομάζας με οξύ είναι η πρώτη που εφαρμόστηκε εμπορικά κατά τη διάρκεια του Β΄ Παγκοσμίου Πολέμου από τους Γερμανούς. Κατά τη χημική υδρόλυση η βιομάζα εκτίθεται σε οξέα για συγκεκριμένο χρονικό διάστημα και σε συγκεκριμένη θερμοκρασία, ώστε να υδρολυθεί σε απλά σάκχαρα. Το θειικό οξύ χρησιμοποιείται ευρέως, ενώ έχουν δοκιμαστεί και άλλα οξέα, όπως το υδροχλωρικό. Οι υδρολύσεις διαχωρίζονται στη μέθοδο πυκνού οξέος και τη μέθοδο αραιού οξέος, με τη δεύτερη να προτιμάται συνήθως. Αν και η ημικυτταρίνη υδρολύεται εύκολα σε ήπιες συνθήκες, πιο ακραίες συνθήκες απαιτούνται για την υδρόλυση της κυτταρίνης. Το μίγμα αποκρυσταλλοποιημένης κυτταρίνης και οξέος αντιδρά παρουσία νερού για τη δημιουργία μονομερών σακχάρων. Στη μέθοδο αραιού οξέος (2-5%) η αντίδραση πραγματοποιείται σε υψηλή θερμοκρασία (160-230°C) και πίεση (~10 atm), και οδηγεί σε χαμηλότερες αποδόσεις γλυκόζης και άρα αιθανόλης. Η χρήση πυκνού οξέος (10-30%) μπορεί να δώσει υψηλότερες αποδόσεις αιθανόλης, καθώς η κυτταρίνη μετατρέπεται σχεδόν πλήρως σε γλυκόζη και πραγματοποιείται σε ηπιότερες συνθήκες (<50°C, ατμοσφαιρική πίεση) (Korppam et al. 2014; Χριστακόπουλος και Τόπακας 2013).

Η μέθοδος αραιού οξέος είναι δριμεία και οδηγεί στη δημιουργία πολλών παρεμποδιστών της ζύμωσης. Στα σοβαρά της μειονεκτήματα συμπεριλαμβάνεται η καταστροφή μεγάλου μέρους των πεντοζών και των εξοζών λόγω των ακραίων συνθηκών. Τέλος, προκειμένου να καταστεί εμπορικά εφαρμόσιμη η μέθοδος πυκνού οξέος απαιτείται ανάκτηση του οξέος, ενώ πρέπει να ληφθεί υπόψιν και το υψηλό κόστος εξοπλισμού λόγω της διάβρωσης.

2.2.2 Ενζυμική υδρόλυση

Μετά την προκατεργασία το στερεό που προκύπτει περιέχει κατά βάση κυτταρίνη, και ποσοστά λιγνίνης ημικυτταρίνης, ανάλογα με τη μέθοδο προκατεργασίας που έχει χρησιμοποιηθεί. Η χρήση υδρολυτικών ενζύμων είναι η πιο διαδεδομένη μέθοδος για την παραγωγή μονομερών σακχάρων. Η κυτταρινάσες είναι τα ένζυμα που υδρολύουν το κυτταρινούχο κλάσμα σε γλυκόζη, ενώ οι ημικυτταρινάσες συνεισφέρουν σε ζυμώσιμα σάκχαρα υδρολύοντας την ημικυτταρίνη.

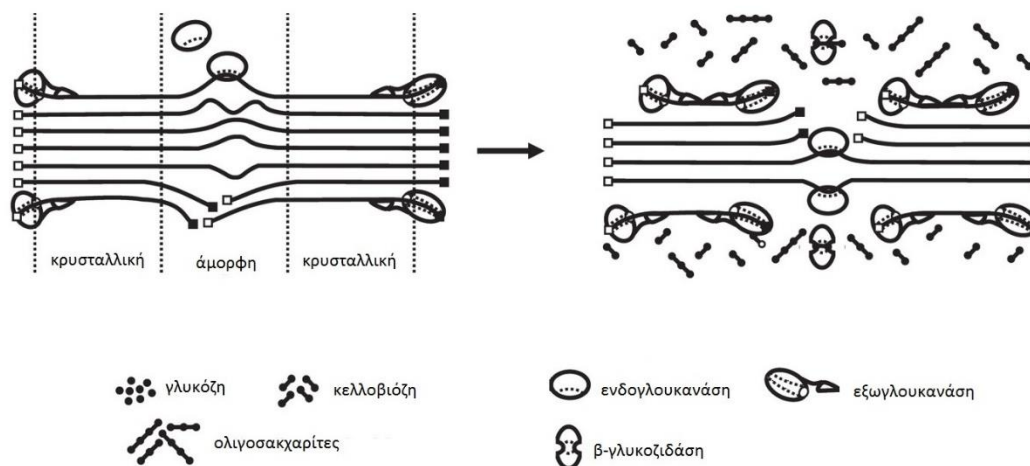
2.2.2.1 Σύστημα κυτταρινασών

Το σύστημα κυτταρίνης-υδρολυτικών ενζύμων είναι πολύπλοκο και περιλαμβάνει διαλυτά ένζυμα που δρουν σε αδιάλυτα υποστρώματα. Στην πράξη χρησιμοποιείται ένα σύνθετο σύστημα ενζύμων που δρουν συνεργιστικά για την αποικοδόμηση της κυτταρίνης (Zacchi 2006). Τα ένζυμα αυτά μπορούν να παραχθούν από μύκητες, όπως ο *Trichoderma reesei* και ο *Aspergillus niger* ή βακτήρια, όπως το *Clostridium cellulovorans*. Τρία είναι τα είδη ενζύμων που δρουν συνεργιστικά για την υδρόλυση της κυτταρίνης:

1. Ενδογλουκανάσες ή ένδο-1,4-β-γλουκανάσες (endoglucanases- EG): Οι ενδογλουκανάσες διασπούν το γλυκοζιτικό δεσμό σε τυχαίες θέσεις στο εσωτερικό της αλυσίδας της κυτταρίνης και σε άμορφες περιοχές (μη κρυσταλλικές, δηλαδή περιοχές που η δομή των αλυσίδων είναι πιο άτακτη). Παράγουν διαλυτούς ολιγοσακχαρίτες με διάφορα μεγέθη και δημιουργούν νέα άκρα στην κυτταρινική αλυσίδα.

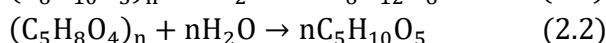
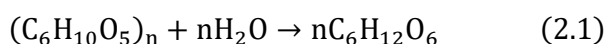
2. Εξωγλουκανάσες ή εξω-1,4-β-γλουκανάσες (cellobiohydrolases-CBH) : Καταλύουν την παραγωγή κελλοβιόζης από κελλοολιγοσακχαρίτες, δηλαδή διαλυτά ολιγομερή της κυτταρίνης, όπως αυτά που παράγονται από τις ενδογλουκανάσες αλλά δεν είναι δραστικές έναντι της άμορφης κυτταρίνης. Η εξωγλουκανάση ουσιαστικά δρα στα ελεύθερα άκρα που έχει δημιουργήσει η δράση της ενδογλουκανάση για την παραγωγή κελλοβιόζης.

3. β-γλυκοζιδάσες: Υδρολύουν την κελλοβιόζη παράγοντας γλυκόζη, ενώ δεν είναι δραστικές έναντι της κρυσταλλικής ή της άμορφης κυτταρίνης. Η δράση τους είναι πολύ σημαντική, διότι η κελλοβιόζη είναι ισχυρός παρεμποδιστής της εξωγλουκανάσης, και άρα η συσσώρευση της κελλοβιόζης μπορεί να επηρεάσει αρνητικά τη συνολική απόδοση του συστήματος. Η β-γλυκοζιδάση, με τη σειρά της, αναστέλλεται από την γλυκόζη και η ενζυμική υδρόλυση είναι έτσι ευαίσθητη στην συγκέντρωση του υποστρώματος.



Σχήμα 2.3: Αναπαράσταση της συνεργιστικής λειτουργίας μεταξύ κυτταρινασών για την υδρόλυση της κυτταρίνης. (Yang, 2011)

Η μετατροπή της κυτταρίνης και της ημικυτταρίνης σε απλά σάκχαρα μπορεί να εκφραστεί αντιστοίχως με τις ακόλουθες αντιδράσεις:

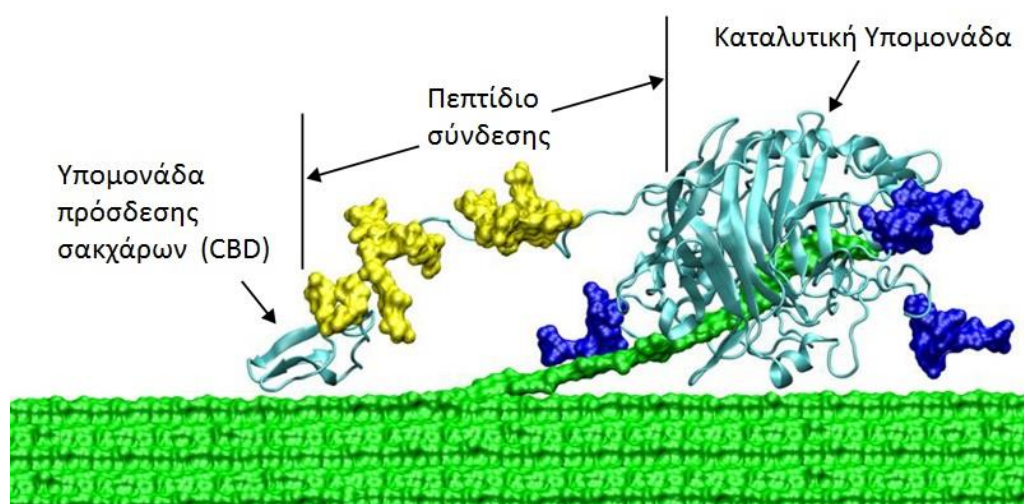


Η μέγιστη θεωρητική μετατροπή σε εξόζες και πεντόζες αντίστοιχα είναι 1.111 kg και 1.136 kg ανά kg εξοζάνης και πεντοζάνης αντίστοιχα (Kang et al. 2014).

Οι παράγοντες που επηρεάζουν την υδρόλυση της κυτταρίνης είναι το πορώδες (διαθέσιμη ελεύθερη επιφάνεια), η κρυσταλλικότητα της βιομάζας, και το περιεχόμενο λιγνίνης και ημικυτταρίνης (Korppam et al. 2014). Επιπλέον, η προκατεργασία των

κυτταρινικών υλικών και οι συνθήκες υδρόλυσης όπως η θερμοκρασία και το pH είναι μεταξύ των παραγόντων που επηρεάζουν την αποτελεσματικότητα της ενζυμικής υδρόλυσης. Οι περισσότερες κυτταρινάσες παρουσιάζουν βέλτιστη δραστηριότητα σε θερμοκρασίες και pH εύρους των 45-55° C και 4-5 αντίστοιχα (Galbe and Zacchi 2002).

Η μοριακή διαμόρφωση ενδογλουκανασών και εξωγλουκανασών είναι σημαντική για την καταλυτική τους λειτουργία και εξειδίκευση. Και οι δύο κατηγορίες ενζύμων με ελάχιστες εξαιρέσεις αποτελούνται από δύο υπομονάδες. Η μια είναι η καταλυτική υπομονάδα, ενώ η δεύτερη δεν έχει καταλυτική δράση, αλλά αξιοποιείται για την πρόσδεση του ενζύμου στην επιφάνεια της κυτταρίνης και παρέχει έτσι περισσότερο χρόνο επαφής με το υπόστρωμα. Η υπομονάδα αυτή ονομάζεται υπομονάδα πρόσδεσης σακχάρων (carbon binding domain-CBD) και συνδέεται με την καταλυτική μονάδα με μια μικρή πεπτιδική αλυσίδα μήκους- αμινοξέων (Gray et al. 2012; Χριστακόπουλος και Τόπακας 2013). Το ενεργό κέντρο της ενδογλουκανάσης έχει ανοιχτή διαμόρφωση, η οποία επιτρέπει την προσέγγιση αλυσίδων κυτταρίνης χωρίς παρεμπόδιση. Κατά αυτό τον τρόπο, το ένζυμο μπορεί να καταλύει την υδρόλυση των γλυκοζιτικών δεσμών σε τυχαία σημεία της κυτταρίνης. Αντιθέτως, το ενεργό κέντρο των εξωγλουκανασών βρίσκεται στο εσωτερικό μιας κοιλότητας, η οποία διαθέτει θέσεις πρόσδεσης σακχάρων, ώστε να τοποθετείται ορθά η αλυσίδα κυτταρίνης στο ενεργό κέντρο. Στη συνέχεια, η αλυσίδα αποκόπτεται σταδιακά προς διμερή, ενώ λόγω της δομής της κοιλότητας εξασφαλίζεται η παραμονή της στο καταλυτικό κέντρο.



Σχήμα 2.4: Δομή εξωγλουκανάσης του μικροοργανισμού *T. reesei*, όπου διακρίνονται η καταλυτική υπομονάδα, η υπομονάδα πρόσδεσης σακχάρων και το συνδετικό πεπτίδιο. Μια πολυσακχαρική αλυσίδα κυτταρίνης (πράσινο) διαπερνά την κοιλότητα της καταλυτικής υπομονάδας όπου διασπάται σταδιακά σε διμερή (κελλοβιόζη) [NREL]

Η υδρόλυση των λιγνινοκυτταρινούχων υποστρωμάτων πραγματοποιείται με χαμηλές συγκεντρώσεις υποστρωμάτων (10-15% w/v), λόγω προβλημάτων ανάμιξης που δημιουργούνται σε υψηλές συγκεντρώσεις. Μια τεχνολογία που μπορεί να οδηγήσει σε επιτυχημένη υδρόλυση υψηλότερων συγκεντρώσεων (έως και 30%) είναι οι αναμικτήρες

ελεύθερης πτώσης, παρόμοιοι με αυτούς που χρησιμοποιούνται στην τεχνολογία παραγωγής σκυροδέματος. Κάτι τέτοιο είναι επιθυμητό, διότι μόνο κατά αυτόν τον τρόπο μπορεί να προκύψει αρκετά πυκνό διάλυμα σακχάρων ώστε η τελική συγκέντρωση αιθανόλης να είναι 5% ή ψηλότερη. Αυτή η συγκέντρωση αιθανόλης είναι επιθυμητή διότι αποτελεί το όριο πάνω από το οποίο ο διαχωρισμός της αιθανόλης από τον υδατικό φορέα είναι οικονομικά αποδοτική. Ο πολτός της αντίδρασης αναδεύεται ήπια για να αποφευχθούν οι διατμητικές τάσεις που προκαλούν απώλεια ενζύμων. Ο αρχικός ρυθμός της υδρόλυσης είναι ο πιο αυξημένος, καθώς με την πάροδο του χρόνου τα ένζυμα χάνουν μέρος της δραστηριότητάς τους και σχηματίζονται ανασταλτικά προϊόντα (κελλοβιόζη, γλυκόζη). Καθώς η κελλοβιόζη αποτελεί τον πιο παρεμποδιστικό παράγοντα, συχνά προστίθεται επιπλέον ποσότητα β-γλυκοζιδάσης ώστε να παραχθεί γλυκόζη που είναι λιγότερο ανασταλτική.

Τέλος, ένας ακόμα παράγοντας που επιδρά στο ρυθμό της υδρόλυσης είναι η μη αναστρέψιμη προσρόφηση των ενζύμων στο υπόστρωμα. Η προσθήκη των επιφανειοδραστικών ουσιών μπορεί να βελτιώσει την ενζυμική μετατροπή κυτταρίνης σε σάκχαρα μονομερών. Διάφοροι μηχανισμοί έχουν προταθεί για το θετικό αποτέλεσμα του επιφανειοδραστικού στην ενζυμική υδρόλυση. Το επιφανειοδραστικό θα μπορούσε να αλλάξει ή να τροποποιήσει τη φύση των ιδιοτήτων της επιφάνειας της κυτταρίνης, να μειώσει την μη αναστρέψιμη δέσμευση της κυτταρίνης στην κυτταρίνη, να εμποδίσει την ενζυμική μετουσίωση. Οι μη ιονικές επιφανειοδραστικές ουσίες, όπως η Tween 20 φαίνεται να είναι οι πιο αποτελεσματικές για την ενίσχυση της ενζυμικής υδρόλυσης (Kristensen et al. 2007).

Μια προσέγγιση για την αύξηση της απόδοσης σε αιθανόλης είναι η αξιοποίηση των σακχάρων της ημικυτταρίνης. Δεν εφαρμόζεται, ωστόσο, σε συνδυασμό με όξινη προκατεργασία, καθώς το μεγαλύτερο μέρος της ημικυτταρίνης έχει απομακρυνθεί σε αυτές τις μεθόδους. Έχει δειχθεί ότι η συζευγμένη δράση των κυτταρινάσων και των ημικυτταρινάσων οδηγεί σε υψηλότερη τελική παραγωγή σακχάρων (Mazeau et al. 2005). Η πλήρης ενζυμική υδρόλυση των ημικυτταρινών απαιτεί ένα πολύπλοκο ενζυμικό σύστημα που δρα συνεργιστικά. Συμπεριλαμβάνει ένζυμα που διασπούν τον β-1,4-γλυκοζυτικό δεσμό της ξυλάνης και δεσμούς πλάγιων αλυσίδων (α-1-αραβινοφουρανοσιδάσες, α-γλυκουρονοσιδάσες, εστεράσες του φερουλικού οξέος, α-γαλακτοζιδάσες κ.ο.κ.). Τόσο οι κυτταρινάσες όσο και η ημικυτταρινάσες έχουν κατηγοριοποιηθεί σε οικογένειες στην τράπεζα δεδομένων CAZy ανάλογα με την αλληλουχία και τη δομή τους (Gray et al. 2012).

Τα τελευταία χρόνια έχουν απομονωθεί νέες κυτταρινάσες και ημικυτταρινάσες τόσο από βακτήρια όσο και από μύκητες, ενώ σημαντική πρόοδος έχει πραγματοποιηθεί στη μείωση του κόστους των κυτταρινάσων. Για παράδειγμα, το σύστημα κυτταρινάσων από το μύκητα *Trichoderma reesei* έχει μελετηθεί εκτεταμένα τα τελευταία 50 χρόνια και χρησιμοποιείται στις περισσότερες εργαστηριακές και εμπορικές εφαρμογές. Το κόστος αυτών των ενζύμων έχει μειωθεί 10 φορές, κυρίως μέσω ενζυμικής μηχανικής.

2.2.2.3 Υψηλές συγκεντρώσεις στερεών-High Gravity

Προκειμένου να επιτευχθεί συγκέντρωση αιθανόλης >4% (w/w) στο τέλος της ζύμωσης (η οποία αποτελεί την οριακή συγκέντρωση για αποτελεσματική απόσταξη), απαιτούνται επίπεδα συγκέντρωσης σακχάρων >8% (w/w). Αυτό μεταφράζεται σε αρχικές συγκεντρώσεις στερεών >20% (w/w) για τους περισσότερους τύπους λιγνινοκυτταρινούχας βιομάζας. Ο όρος «high gravity» αναφέρεται σε αντιδράσεις βιομετατροπής λιγνινοκυτταρινούχων υλικών σε υψηλές συγκεντρώσεις, με ελάχιστο ελεύθερο νερό και υψηλό ιξώδες. Η χρήση υψηλών συγκεντρώσεων στερεών μειώνει το κόστος της διεργασίας, καθώς ο διαχωρισμός μέσω απόσταξης διευκολύνεται. Υψηλές συγκεντρώσεις έχουν χρησιμοποιηθεί ευρέως σε αμυλούχα υποστρώματα, με θετικά αποτελέσματα, καθώς κατά κανόνα χρησιμοποιούνται συγκεντρώσεις ως και 350 g/L. Η γνώση και η τεχνολογία που αναπτύχθηκε μέσα από αυτές τις εφαρμογές έχουν ανοίξει το δρόμο και για την αξιοποίηση της λιγνινοκυτταρίνης, ωστόσο το λιγνινοκυτταρινούχο υπόστρωμα εμφανίζει περισσότερες προκλήσεις (Korppam et al. 2014).

Αφενός, παρουσιάζονται διαφορές στο υλικό ανάλογα με την πηγή της βιομάζας και την προκατεργασία που έχει υποστεί. Οι παρεμποδιστές επίσης εξαρτώνται από την πηγή και την προκατεργασία και μπορεί να επηρεάζουν τόσο τα ένζυμα όσο και τους μικροοργανισμούς, κάτι που γίνεται ιδιαίτερα εμφανές σε υψηλές συγκεντρώσεις στερεών. Παρεμποδιστική δράση στην υδρόλυση μπορούν να προκαλέσουν και τα μονομερή σάκχαρα και οι ολιγοσακχαρίτες (με τη μορφή παρεμπόδισης από το προϊόν). Η απόδοση της ενζυμικής υδρόλυσης, κατά αυτόν τον τρόπο, μειώνεται με την αύξηση της συγκέντρωσης στερεών, με αρνητική επίδραση στη συνολική παραγωγή αιθανόλης. Η βελτιστοποίηση της διεργασίας και των συνθηκών μεμονωμένων σταδίων (στρατηγικές τροφοδοσίας, αποτοξικοποίηση, και προϋδρόλυση) μπορούν να περιορίσουν το πρόβλημα, ενώ σε άλλες περιπτώσεις η ανάπτυξη ανθεκτικότερων μικροβιακών στελεχών είναι η προτιμητέα λύση.

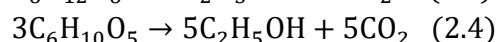
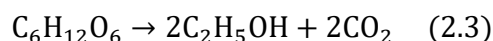
Μια ακόμα πρόκληση είναι το πρόβλημα το ιξώδους που έχει ιδιαίτερη σημασία στο στάδιο της ενζυμικής υδρόλυσης, παρά στο στάδιο της ζύμωσης. Το υψηλό ιξώδες συνδέεται με σοβαρές δυσκολίες στα φαινόμενα μεταφοράς μάζας, κάτι που μπορεί να οδηγήσει σε ανομοιογενή προφίλ συγκέντρωσης στους αντιδραστήρες. Τα κυτταρινικά υποστρώματα έχουν χαμηλή πυκνότητα και είναι υγροσκοπικά, κάτι που συντελεί σε υλικά υψηλής υγρασίας. Επομένως τα μίγματα αποκτούν σταδιακά μορφή πάστας σε συγκεντρώσεις άνω των 15% (w/w) και είναι δύσκολα διαχειρίσιμα. Η ρεολογική φύση των λιγνινοκυτταρινούχων μιγμάτων με το νερό είναι πολύπλοκη σε υψηλές συγκεντρώσεις: τα υλικά μπορούν να χαρακτηρισθούν ως «μαλακά στερεά» (“soft solids”) και λειτουργούν ως μη νευτωνικά ρευστά παρουσιάζοντας αυξημένες διατμητικές τάσεις και υψηλό ιξώδες (Korppam et al. 2014). Η τάσεις στο υλικό και η συγκέντρωση στερεών είναι, μάλιστα, συσχετίσιμα μεγέθη, άρα αύξηση της συγκέντρωσης επιβαρύνει σημαντικά το φαινόμενο. Τα ρεολογικά χαρακτηριστικά εξαρτώνται επίσης από τον τύπο της πρώτης ύλης, την προκατεργασία και τα μέση κοκκομετρία της βιομάζας. Τα υψηλά ιξώδη στην υδρόλυση και τη ζύμωση απαιτούν προσαρμογές στην ανάμιξη που συχνά συνδέονται με αύξηση της ενεργειακής κατανάλωσης. Νέοι τύποι αντιδραστήρων είναι

απαραίτητοι (ο αντιδραστήρας ελεύθερης πτώσης για παράδειγμα δίνει ικανοποιητικά αποτελέσματα), διότι το ενεργειακό κόστος της ανάμιξης στους συμβατικούς αντιδραστήρες ακυρώνει τα πιθανά οφέλη της υψηλής συγκέντρωσης στερεών. Στον αντιδραστήρα ελεύθερης πτώσης, ο οποίος παρουσιάζει ομοιότητες με τους αναμικτήρες που χρησιμοποιούνται στην τεχνολογία σκυροδέματος η βιομάζα αναδεύεται με αργό ρυθμό υπό την επίδραση της βαρύτητας. Αρχικά το ιξώδες του μίγματος είναι πολύ υψηλό, όμως η εξέλιξη της υδρόλυσης συνεπάγεται και ρευστοποίηση του περιεχομένου του αντιδραστήρα, οπότε η ανάμιξη διευκολύνεται με την πάροδο του χρόνου.

2.3 Αλκοολική ζύμωση

2.3.1 Αλκοολική ζύμωση λιγνινοκυτταρινούχας βιομάζας

Κατά τη ζύμωση τα σάκχαρα (εξόζες ή/και πεντόζες) μετατρέπονται σε αιθανόλη από μια ποικιλία μικροοργανισμών, από βακτήρια, ζύμες ή μύκητες. Η αντίδραση μετατροπής για τις εξόζες και τις πεντόζες είναι, αντίστοιχα:



Η θεωρητική μέγιστη απόδοση σε αιθανόλη είναι 0.511kg αιθανόλης ανά kg σακχάρων. Η συνολική θεωρητική απόδοση αιθανόλης, επομένως, είναι 0.719L και 0.736L ανά kg γλυκάνης (ή άλλων οργανικών δομών έξι ανθράκων) και ξυλάνης (ή άλλων οργανικών δομών πέντε ανθράκων), αντίστοιχα (Kang et al. 2014).

Σε αντίθεση με την παραγωγή αιθανόλης με πηγή απλά σάκχαρα και άμυλο, η παραγωγή με πηγή λιγνινοκυτταρινούχα βιομάζα εμφανίζει προκλήσεις. Ένας σημαντικός παράγοντας που αποτρέπει τη βιομηχανική χρήση λιγνίνης για την παραγωγή βιοαιθανόλης είναι η αδυναμία των μικροοργανισμών να ζυμώσουν αποτελεσματικά (με υψηλή απόδοση και υψηλό ποσοστό) το σύνολο των σακχάρων που απελευθερώνονται κατά τη διάρκεια της προεπεξεργασίας και της υδρόλυσης. Παράλληλα, το ζυμώσιμο μίγμα περιέχει διάφορα μονομερή σάκχαρα και παρεμποδιστές- οργανικά οξέα μικρού μοριακού βάρους, φαινολικά και ανόργανες ουσίες- οι οποίοι έχουν παραχθεί είτε κατά την προκατεργασία ή/και την υδρόλυση της βιομάζας.

2.3.2 Μικροοργανισμοί που χρησιμοποιούνται

Οι μικροοργανισμοί που θα χρησιμοποιηθούν στην παραγωγή βιοαιθανόλης θα πρέπει να διαθέτουν ορισμένα χαρακτηριστικά που θα τους καταστήσουν αποδοτικούς. Σε πρώτη προτεραιότητα, απαιτείται υψηλή απόδοση αιθανόλης και υψηλή ογκομετρική παραγωγικότητα, υψηλή αντοχή σε αιθανόλη και σε παρεμποδιστές, μικρή παραγωγή παραπροϊόντων, δυνατότητα χρήσης εύρους υποστρωμάτων (πεντόζες και εξόζες). Δευτερευόντως, επιθυμείται η αντοχή σε υψηλές τιμές θερμοκρασία και pH, οι μικρές απαιτήσεις σε προσθήκες θρεπτικών υλικών, η κυτταρινολυτική δραστηριότητα και ο ταυτόχρονος μεταβολισμός διαφορετικών σακχάρων (Hahn-Hägerdal et al. 2007).

2.3.2.1 *Saccharomyces cerevisiae*

Το μεγαλύτερο ποσοστό αιθανόλης που παράγεται παγκοσμίως προέρχεται από διεργασίες ζύμωσης σακχάρων με τον *Saccharomyces cerevisiae*. Ο *S. cerevisiae* μπορεί να ζυμώσει τις εξόζες που προέρχονται από την λιγνινοκυτταρινούχο βιομάζα με πολύ ψηλές αποδόσεις, αλλά αδυνατεί να ζυμώσει τις πεντόζες, κάτι που περιορίζει τις εφαρμογές σε πηγές βιομάζας με υψηλά ποσοστά ημικυτταρίνης. Λειτουργεί σε περιοχές pH 3,0 – 7,5 με την άριστη περιοχή να είναι συνάρτηση και της θερμοκρασίας. Είναι μεσόφιλος οργανισμός με ευνοϊκή θερμοκρασία ανάπτυξης από 20 έως 40°C. Για τη βιομηχανική παραγωγή αιθανόλης από σάκχαρα καλαμποκιού οι ζυμώσεις συνήθως διεξάγονται σε pH 5 και θερμοκρασία 30°C. Η γλυκόζη αποτελεί μέσον διατροφής και πηγή ενέργειας του κυττάρου και επηρεάζει την συγκέντρωση της ζύμης και την παραγωγή αιθανόλης. Η συγκέντρωση του διαλυμένου οξυγόνου έχει μεγάλη επίδραση στο ρυθμό μικροβιακής ανάπτυξης και της παραγωγής των προϊόντων. Γενικά οι αναερόβιες συνθήκες ευνοούν το μεταβολισμό της γλυκόζης σε αιθανόλη, όμως μικρή συγκέντρωση οξυγόνου είναι απαραίτητη για τις λειτουργίες της ζύμης.

2.3.2.2 *Zymomonas mobilis*

Ο *Zymomonas mobilis* είναι σημαντικός αιθανολοπαραγωγός μικροοργανισμός και χρησιμοποιείται στη βιομηχανία των οινοπνευματωδών ποτών. Πρόκειται για αναερόβιο Gram-αρνητικό βακτήριο, που έχει την ικανότητα να πραγματοποιεί ζυμώσεις σε pH 5 και θερμοκρασίες 30-40°C. Ο μεταβολισμός του είναι ιδιαίτερα ταχύς και έτσι προκύπτουν υψηλές αποδόσεις σε αιθανόλη που προσεγγίζουν τη θεωρητική. Όπως και ο *S. cerevisiae*, δε μπορεί να ζυμώσει πεντόζες, ωστόσο σε ορισμένα πειράματα έχουν εισαχθεί γονίδια προς αυτό το μεταβολικό μονοπάτι μέσω γενετικής μηχανικής (Panesar, Marwaha, and Kennedy 2006).

2.3.2.3 *Escherichia coli*

Ο *E.coli* έχει την ικανότητα να ζυμώνει εύρος υποστρωμάτων εξοζών, πεντοζών και ουρανικών οξέων στον κύριο μεταβολίτη, το πυροσταφυλικό. Στη συνέχεια το πυροσταφυλικό οξύ μετατρέπεται σε μίγμα αιθανόλης, οξικού, γαλακτικού, και φορμικού οξέος. Οι ζυμώσεις λαμβάνουν χώρα σε pH 7 και θερμοκρασία 30-35°C. Η παρουσία των παραπροϊόντων στο τελικό προϊόν της ζύμωσης και οι χαμηλές αποδόσεις δεν ευνοούν την επιλογή του *E.coli* για εφαρμογές μεγάλης κλίμακας.

2.3.2.4 *Pichia stipitis*

Η ζύμη *Pichia stipitis* μπορεί να μεταβολίζει φυσικά τόσο τη γλυκόζη όσο και την ξυλόζη, ωστόσο παρεμποδίζεται σημαντικά από τις ανασταλτικές ουσίες που παράγονται κατά την προκατεργασία και την υδρόλυση. Επίσης, απαιτεί μικροαερόβιες συνθήκες για το συμμεταβολισμό των σακχάρων κάτι που περιπλέκει τη διεργασία και αυξάνει το κόστος της.

2.3.2.5 Ανάπτυξη νέων στελεχών μέσω γενετικής μηχανικής

Τα λιγνινοκυτταρινούχα υλικά, ιδιαίτερα τα αγροτικά υπολείμματα περιέχουν κατά κανόνα 5-20% πεντοζών (κυρίως ξυλόζη και αραβινόζη), που δε ζυμώνονται προς αιθανόλη από τον πιο διαδεδομένο μικροοργανισμό, τον *S. cerevisiae*. Προκειμένου να αξιοποιηθούν και αυτά τα σάκχαρα και να αυξηθεί η απόδοση σε αιθανόλη, διεξάγεται έρευνα και στην κατεύθυνση μικροοργανισμών που μπορούν να ζυμώσουν πεντόζες και εξόζες (Korppam et al. 2014).

Οι μικροοργανισμοί που ζυμώνουν ξυλόζη μπορεί να ανήκουν είτε στα βακτήρια, είτε στους μύκητες, είτε στις ζύμες. Αρκετά αναερόβια βακτήρια ζυμώνουν πεντόζες, ωστόσο παρεμποδίζονται σε χαμηλές συγκεντρώσεις σακχάρων και αιθανόλης, ενώ η ζύμωση συνοδεύεται από σημαντική παραγωγή παραπροϊόντων. Ζύμες που μπορούν να μεταβολίσουν την ξυλόζη, όπως η *Pichia stipitis* δίνουν αποδεκτές αποδόσεις αιθανόλης, ωστόσο είναι ιδιαίτερα ευαίσθητες στους παρεμποδιστές του μίγματος. Οι μύκητες επιδεικνύουν καλύτερη ανοχή παρεμποδιστών, αλλά ο ρυθμός ζύμωσης είναι πολύ χαμηλός για οποιαδήποτε εμπορική εφαρμογή. Επομένως, έχουν γίνει προσπάθειες για τη δημιουργία ανασυνδυασμένων στελεχών βακτηρίων και ζυμών, ικανών για τις απαιτήσεις της βιομηχανικής ζύμωσης (Zacchi 2006). Δύο προσεγγίσεις έχουν ακολουθηθεί, μέσω της γενετικής μηχανικής: αφενός έχει επιχειρηθεί να προστεθούν μεταβολικά μονοπάτια πεντοζών στις ζύμες που χρησιμοποιούνται παραδοσιακά για τις ζυμώσεις εξοζών, αφετέρου έχει γίνει έρευνα για στοχευμένη αύξηση της απόδοσης σε στελέχη που μεταβολίζουν φυσικά τις πεντόζες (Gray et al. 2012). Τέλος, έχουν πραγματοποιηθεί πειράματα σε ανασυνδυασμένα βακτήρια με διαγραφές των γονιδίων σε μεταβολικά μονοπάτια παραγωγής παραπροϊόντων (Talebnia, Karakashev, and Angelidaki 2010).

2.3.3 Παρεμποδιστές της ζύμωσης

Στους παρεμποδιστές της ζύμωσης που παράγονται είτε από την προκατεργασία είτε από την υδρόλυση συμπεριλαμβάνονται: φουρφουράλες από την αποικοδόμηση σακχάρων (φουρφουράλη από τις πεντόζες και υδροξυλομεθυλοφουρφουράλη από τις εξόζες), οργανικά οξέα μικρού μοριακού βάρους (οξικό, φορμικό οξύ), προϊόντα αποδόμησης λιγνίνης (φαινολικές αλκοόλες, οξέα και αλδεΐδες) και ανόργανες ουσίες. Οι τρόποι αντιμετώπισης της παρεμπόδισης είναι μέσω χρήσης λιγότερο έντονων μεθόδων προκατεργασίας και διεργασιών διαλείποντος έργου, μέσω χημικής ή ενζυμικής αποτοξίνωσης (π.χ. χρήση λακκάσης για απομάκρυνση τοξικών ουσιών) και μέσω χρήσης ανθεκτικών στελεχών μικροοργανισμών.

Η υψηλή αντοχή σε αιθανόλη είναι καθοριστική για τη βιωσιμότητα της διεργασίας, και συνδέεται άμεσα με τη δομή της κυτταρικής μεμβράνης των μικροοργανισμών. Έτσι, οι *S. cerevisiae* και *P. stipitis* που είναι φυσιολογικά αιθανολοπαραγωγοί μικροοργανισμοί διαθέτουν ιδιαίτερα χαρακτηριστικά. Η μεμβράνη του *S. cerevisiae* είναι πλούσια σε στερόλες και της *P. stipitis* σε cis-βακενικό οξύ και σε χοπανοϊδή (ανάλογα στερολών) (Χριστακόπουλος και Τόπακας 2013).

2.4 Διεργασίες παραγωγής αιθανόλης από λιγνινοκυτταρινούχα βιομάζα

2.4.1 Διακριτή υδρόλυση και ζύμωση (Separate Hydrolysis and Fermentation)

Σε αυτή την προσέγγιση, αρχικά πραγματοποιείται ενζυμική υδρόλυση της βιομάζας προς απελευθέρωση μονομερών σακχάρων και η ζύμωση πραγματοποιείται σε δεύτερο, διακριτό στάδιο. Έτσι δίνεται η δυνατότητα να εφαρμοστούν οι βέλτιστες συνθήκες και για τις δυο διεργασίες, με τα ένζυμα να λειτουργούν σε υψηλότερες θερμοκρασίες που ευνοούν την υδρόλυση και τους μικροοργανισμούς σε χαμηλότερες, που ευνοούν τη ζύμωση προς αιθανόλη. Ακόμα, είναι συχνά σκόπιμο να παρεμβληθεί στάδιο αποτοξικοποίησης ανάμεσα σε υδρόλυση και ζύμωση, ώστε να απομακρυνθούν οι παρεμποδιστές και να βελτιστοποιηθεί η παραγωγή αιθανόλης. Η μέθοδος αυτή συνδέεται με υψηλότερα πάγια κόστη, λόγω της ανάγκης σε εξοπλισμό για τις διακριτές διεργασίες και με παρεμπόδιση της ζύμωσης λόγω της αρχικής πολύ υψηλής συγκέντρωσης σακχάρων (Kang et al. 2014; Talebnia et al. 2010; Zacchi 2006).

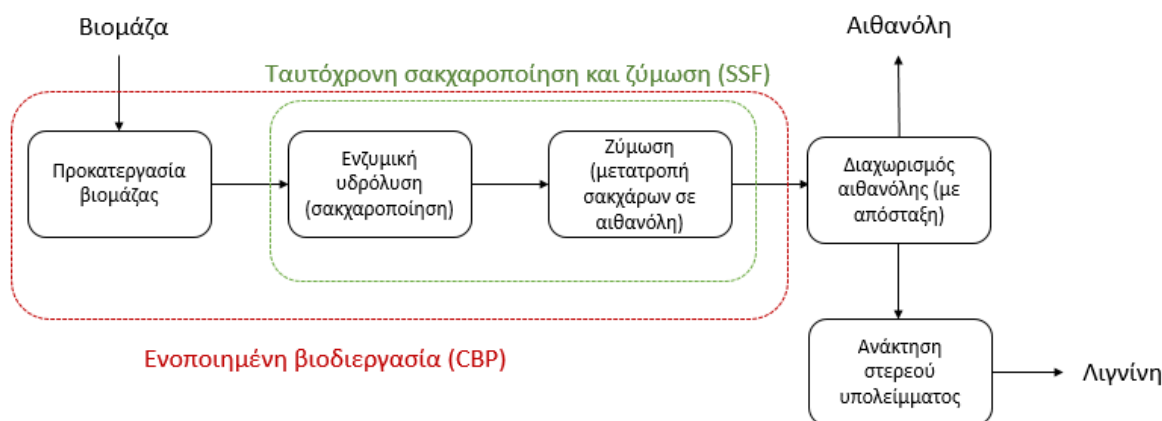
2.4.2 Ταυτόχρονη σακχαροποίηση και ζύμωση (Simultaneous Saccharification and Fermentation-SSF)

Η διεργασία κατά την οποία η κυτταρίνη υδρολύεται και ζυμώνεται ταυτοχρόνως παρουσία του μικροοργανισμού ονομάζεται ταυτόχρονη σακχαροποίηση και ζύμωση (simultaneous saccharification and fermentation-SSF). Αυτή η διεργασία προτιμάται στην παραγωγή βιοκαυσίμων, διότι η υδρόλυση και η ζύμωση πραγματοποιούνται στον ίδιο αντιδραστήρα, μειώνοντας το κόστος. Ακόμα, μέσω της κατανάλωσης σακχάρων από το μικροοργανισμό προς παραγωγή αιθανόλης, η συγκέντρωση σακχάρων παραμένει χαμηλή και μειώνεται η αναστολή των υδρολυτικών ενζύμων από το προϊόν, με αποτέλεσμα η αντίδραση να μετατοπίζεται προς την πλευρά των σακχάρων. Ωστόσο οι κυτταρινάσες παρουσιάζουν βέλτιστη ενεργότητα σε θερμοκρασίες 50-55°C ενώ οι ζύμες λειτουργούν βέλτιστα σε θερμοκρασίες κάτω των 35°C. Λόγω αυτής της αναντιστοιχίας στις βέλτιστες συνθήκες, η SSF πραγματοποιείται σε μια «συμβιβαστική» θερμοκρασία, πλησιέστερη στο βέλτιστο της ζύμωσης. Αυτό οδηγεί σε μεγαλύτερη κατανάλωση ενζύμου, αφού αυτό λειτουργεί σε χαμηλότερη ενεργότητα, κάτι που αυξάνει το κόστος (Balat et al. 2008; Brodeur et al. 2011).

2.4.3 Ενοποιημένη Βιοδιεργασία (Consolidated Bioprocess-CBP)

Η πιο καινοτόμος μέθοδος, η ενοποιημένη βιοδιεργασία στοχεύει στην παραγωγή όλων των απαραίτητων ενζύμων και της αιθανόλης χρησιμοποιώντας ένα είδος μικροοργανισμού, σε ένα βιοαντιδραστήρα. Έτσι, τόσο το πάγιο όσο και το λειτουργικό κόστος της διεργασίας θα μειώνονταν δραματικά, καθώς δεν απαιτείται εκτεταμένος εξοπλισμός ούτε αγορά υδρολυτικών ενζύμων. Ορισμένοι μικροοργανισμοί που έχουν αυτή τη δυνατότητα είναι οι *Fusarium oxysporum*, *Neurospora crassa*, *Clostridium thermocellum*, ωστόσο η παραγωγή αιθανόλης από αυτούς τους μικροοργανισμούς χαρακτηρίζεται από πολύ αργούς ρυθμούς και χαμηλές συγκεντρώσεις (Galbe and Zacchi

2002). Ενδέχεται τεχνικές γενετικής μηχανικής στο μέλλον να προσδώσουν στους μικροοργανισμούς όλα τα απαραίτητα χαρακτηριστικά για την παραγωγή της αιθανόλης σε βιομηχανική κλίμακα (Kang et al. 2014; Sarkar et al. 2012).



Σχήμα 2.5: Διαγραμματική απεικόνιση των διεργασιών παραγωγής βιοαιθανόλης από λιγνινοκυτταρινούχα βιομάζα

2.5 Εμπορικές εφαρμογές παραγωγής βιοαιθανόλης από λιγνινοκυτταρινούχο βιομάζα

Η παραγωγή αιθανόλης έχει αυξηθεί μέσω της εφαρμογής ερευνητικών και βιομηχανικών προγραμμάτων σε πολλές χώρες τα τελευταία χρόνια. Όλο και σημαντικότερο ποσοστό της αγροτικής παραγωγής στρέφεται στα βιοκαύσιμα στα πλαίσια μιας προσπάθειας μείωσης των εισαγωγών πετρελαίου και μείωσης της ατμοσφαιρικής ρύπανσης. Παρακάτω παρουσιάζονται ενδεικτικά στοιχεία για τη λειτουργία εργοστασίων παραγωγής βιοαιθανόλης από λιγνινοκυτταρινούχες πηγές ανά τον κόσμο.

Η Δανέζικη εταιρεία ενέργειας Dong Energy και η εταιρεία παραγωγής βιοκαυσίμων Inbicon εγκαινίασαν εργοστάσιο επίδειξης (demonstration plant) στο Kalundborg, Denmark το Νοέμβριο 2009. Η μονάδα παράγει βιοαιθανόλη με πρώτη ύλη άχυρο, ενώ υπήρξε η πρώτη στην Ευρώπη που χρησιμοποίησε τεχνολογία δεύτερης γενιάς βιοκαυσίμων για την παραγωγή αιθανόλης. Στην Ευρώπη, παρόμοια μονάδα λειτουργεί από το 2012 στο Straubing, Germany από την εταιρεία Clariant. Η παραγωγή της ανέρχεται σε 1000 tn ετησίως, ενώ αξιοποιείται ποικιλία πρώτων υλών από αγροτικά κατάλοιπα: άχυρο σίτου και δημητριακών, στελέχη καλαμποκιού και υπολείμματα σακχαροκάλαμου.

Η канаδική εταιρεία Iogen Corp. παράγει αιθανόλη από λιγνινοκυτταρινούχες πηγές (άχυρο σίτου, βιομάζας, κριθαριού) με προκατεργασία έκρηξης ατμού σε εργοστάσιο επίδειξης (demonstration plant) από το 2004. Η παραγωγή αιθανόλης φθάνει τους 2.500 tn ετησίως ενώ η λιγνίνη της τροφοδοσίας αξιοποιείται για την παραγωγή ατμού και ηλεκτρισμού (Iogen Corp. Press Release). Η εταιρεία Raízen Energia Participacoes με

έδρα τη Βραζιλία ολοκλήρωσε την κατασκευή ενός εργοστασίου βιομηχανικής κλίμακας αξιοποιώντας την τεχνολογία της Iogen στο Piracicaba, São Paulo. Η παραγωγή βρίσκεται σε επίπεδα 30.000 tn ετησίως, με πηγή στελέχη σακχαροκάλαμου και άχυρο (Iogen Corp. Press Release).

Η εταιρεία POET Biorefining λειτουργεί εργοστάσιο βιοαιθανόλης βιομηχανικής κλίμακας στο Emmetsburg, Iowa, από το Σεπτέμβριο του 2014. Οι πρώτες ύλες είναι υπολείμματα αραβοσίτου (άξονες από σπάδικες, στελέχη και φύλλα), ενώ η ετήσια παραγωγή φτάνει τους 150.000 tn. Τέλος, η πολυεθνική εταιρεία DuPont εγκαινίασε τον Οκτώβριο του 2015 εργοστάσιο παραγωγής βιοκαυσίμων από λιγνινοκυτταρινούχο βιομάζα στη Nevada, Iowa. Το εργοστάσιο θεωρείται η μεγαλύτερη στον κόσμο μονάδα παραγωγής βιοαιθανόλης από λιγνινοκυτταρινούχες πηγές, με ετήσια παραγωγή 30 εκατομμυρίων γαλονιών καυσίμου. Πηγή του εργοστασίου είναι στελέχη καλαμποκιού (σπάδικες, φύλλα και μίσχοι).



Σχήμα 6: Τα εργοστάσια παραγωγής βιοαιθανόλης δεύτερης γενιάς στο Kalundborg της εταιρείας Inbicon (αριστερά) και στη Nevada της εταιρείας DuPont (δεξιά) (Inbicon, Dupont)

Κεφάλαιο 3: Χρήση ξυλανασών στην υδρόλυση της βιομάζας

3.1 Ημικυτταρινάσες-Ξυλανάσες

Οι ξυλανάσες είναι από τις πιο σημαντικές ημικυτταρινάσες και αποτελούν μέλη των οικογενειών 5,7,8,10,11 και 43 της ευρύτερης ομάδας των γλυκοζυλδρολασών. Η βιοαποικοδόμηση της κύριας αλυσίδας της ξυλάνης επιτυγχάνεται με τη δράση δυο ενζύμων, των ενδοξυλανασών, που διασπούν της αλυσίδα της ξυλάνης σε μικρότερους ολιγοσακχαρίτες και των β-ξυλοσιδασών που αποικοδομούν περαιτέρω σε ξυλόζη. Ανάμεσα στους μικροοργανισμούς που παράγουν ξυλανάσες είναι ο *Aspergillus niger*, που παράγει δεκαπέντε εξωκυτταρικές ξυλανάσες και ο *Trichoderma viride* που εκκρίνει δεκατρείς στο εξωκυτταρικό περιβάλλον.

Αναλυτικότερα, οι ενδο-β-1,4-ξυλανάσες αποπολυμερίζουν την ξυλάνη μέσω τυχαίας υδρόλυσης της κύριας αλυσίδας της ξυλάνης και οι 1,4-β-D-ξυλοζιδάσες διαχωρίζουν τους μικρούς ολιγοσακχαρίτες. Οι πλευρικές ομάδες που υπάρχουν στην ξυλάνη απελευθερώνονται από τις α-L-αραβινοφουρανοζιδάσες, τις α-D-γλυκουρονιδάσες, τις γαλακτοζιδάσες και τις ακετυλοεστεράσες. Τα ένζυμα αυτά ενεργούν σε συνεργασία προκειμένου να μετατρέψουν την ξυλάνη στα συστατικά της σάκχαρα (Subramaniam and Prema 2002). Η πλήρης υδρόλυση των φυσικών γλυκουρονοξυλανών απαιτεί εστεράσες για να απομακρύνουν τα δεσμευμένα οξικά και φαινολικά οξέα. Οι εστεράσες σπάνε τους δεσμούς της ξυλόζης με το οξικό οξύ (ακετυλοεστεράσες), τους δεσμούς των πλευρικών αλυσίδων αραβινόζης με το φερουλικό οξύ (εστεράσες του φερουλικού οξέος) και τους δεσμούς των πλευρικών αλυσίδων αραβινόζης με το κουμαρικό οξύ. Η διάσπαση των δεσμών αυτών και η απομάκρυνση των ομάδων των οξέων από την ξυλάνη είναι χρήσιμη για την απομάκρυνση της λιγνίνης. Μπορεί να συμβάλει στη διαλυτοποίηση της λιγνίνης με τη διάσπαση των εστερικών δεσμών ανάμεσα στη λιγνίνη και της ημικυτταρίνης.

Οι ξυλανάσες έχουν ιστορικά διαχωριστεί σε διάφορες κατηγορίες, ανάλογα με το μέγεθος, το ισοηλεκτρικό τους σημείο κλπ. Η πιο επίκαιρη κατηγοριοποίηση είναι της τράπεζας δεδομένων CAZy. Καθώς η δομή και ο μοριακός μηχανισμός ενός ενζύμου βασίζεται στην πρωτοταγή ακολουθία αμινοξέων, αυτό το σύστημα ταξινόμησης αντανακλά ταξινόμηση τόσο ανάλογα με τη δομή όσο και ανάλογα με συγκεκριμένες ακολουθίες. Τα ένζυμα σε μια συγκεκριμένη οικογένεια έχουν παρόμοια τριτοταγή δομή και παρόμοιους μοριακούς μηχανισμούς, ενώ έχει διατυπωθεί ότι έχουν και παρόμοια εκλεκτικότητα σε μικρά διαλυτά υποστρώματα (Collins, Gerday, and Feller 2005).

Οι πιο σημαντικές οικογένειες ξυλανασών είναι οι 10 και 11, όμως ένζυμα με καταλυτική δράση ξυλανάσης εντοπίζονται και στις οικογένειες 5, 7, 8, 10, 11 και 43. Τα μέλη όλων των οικογενειών διαφέρουν στις φυσικοχημικές τους ιδιότητες, τη δομή, τον τρόπο λειτουργίας, και την εκλεκτικότητα των υποστρωμάτων. Για παράδειγμα, οι διαφορές ανάμεσα στις οικογένειες 10 και 11 των ξυλανασών είναι σημαντικές. Οι ξυλανάσες της οικογένειας 10 προσβάλλουν την κύρια αλυσίδα της ξυλάνης και τους δεσμούς που είναι πιο κοντά σε υποκατεστημένα μόρια, ενώ σε αυτές της οικογένειας 11 οι πλευρικοί υποκαταστάτες δρουν προστατευτικά για τους παρακείμενους δεσμούς. Έτσι οι

ξυλανάσες της οικογένειας 10 παράγουν εν γένει προϊόντα μικρότερου μέσου μοριακού βάρους. Οι διαφορές αυτές στη λειτουργία ανιχνεύονται και στις διαφορές της τριτοταγούς δομής των πρωτεϊνών. Οι ξυλανάσες της οικογένειας 11 είναι μικρότερες σε μέγεθος και το καταλυτικό τους κέντρο βρίσκεται σε μια σχισμή, στην οποία μπορεί να χωρίσει μια αλυσίδα ξυλοπυρανόζης μήκους λίγων μονομερών, Αντιθέτως, τα ένζυμα οικογένειας 10 χαρακτηρίζονται από πιο «ανοιχτές» δομές, κάτι που εξηγεί τη μικρότερη καταλυτική εξειδίκευση και τη μεγαλύτερη τους προσαρμοστικότητα. Παράλληλα, εντοπίζονται ομοιότητες ανάμεσα στις οικογένειες 5 και 10, καθώς οι πρωτεΐνες έχουν παρόμοια διαμόρφωση στο χώρο (Motta, Andrade, and Santana 2013).

3.2 Ένζυμα της οικογένειας GH30

Η οικογένεια GH30 συμπεριλαμβάνει τις κατηγορίες ενζύμων: γλυκοσυλκεραμιδάση (glucosylceramidase), β-γλυκοζιδάση, β-ξυλοζιδάση και ενδο-β-1-6-γλουκανάση. Σύμφωνα με φυλογενετική ανάλυση (St John, Gonzalez, and Pozharski 2010) τα γνωστά ένζυμα της οικογένειας GH30 ταξινομήθηκαν σε δύο κύριες ομάδες και οκτώ υποομάδες. Τα ένζυμα της οικογένειας GH30 παρουσιάζουν μια ιδιαιτερότητα δομής σε σχέση με την οικογένεια GH5, καθώς διαθέτουν δύο περιοχές σύνδεσης που συνδέουν μια δομή β-έλικας στο καταλυτικό κέντρο.

Λίγες πρωτεΐνες της οικογένειας GH30 έχουν απομονωθεί και χαρακτηριστεί στη βιβλιογραφία. Σε μια πρόσφατη μελέτη, ανακαλύφθηκε ένα νέο ένζυμο της ομάδας GH30 με ξυλανολυτική δράση (Luo et al. 2010). Το στέλεχος *Bispora*, από όπου προήλθε το γονίδιο που κωδικοποιούσε την πρωτεΐνη, απομονώθηκε από όξινα απόβλητα ορυχείου ουρανίου στο Jiangxi της Κίνας. Το συγκεκριμένο ένζυμο έδειξε σταθερότητα σε ακραίες συνθήκες, με μέγιστη ενεργότητα σε pH 3.0 και βέλτιστη ενεργότητα σε 60-65 °C. Τρεις ακόμα πλήρως χαρακτηρισμένες ξυλανάσες (St. John et al. 2006; Keen, Boyd, and Henrissat 1996; Suzuki et al. 1997) έχουν κατηγοριοποιηθεί στην κατηγορία GH5, παρόλο που παρουσιάζουν περισσότερες ομοιότητες με τα ένζυμα της οικογένειας GH30.

3.3 *Myceliophthora Thermophila*

Ο *Myceliophthora thermophila* (γνωστός και ως *Sporotrichum thermophile*) είναι ένας θερμόφιλος μονοκύτταρος ασκομύκητας, ο οποίος απαντάται στο χώμα και ιδιαίτερα σε σωρούς αποσυντιθέμενης οργανικής ύλης. Αναπτύσσεται βέλτιστα σε θερμοκρασίες 45-50°C και είναι ανθεκτικός σε όξινα περιβάλλοντα. Λόγω της ανθεκτικότητάς του σε ακραίες συνθήκες παρουσιάζει ενδιαφέρον για τη βιοτεχνολογία. Αυτό συμβαίνει γιατί τα ένζυμά του, τα οποία αποδομούν διάφορα κλάσματα φυτικής οργανικής ύλης παρουσιάζουν ενεργότητα σε υψηλές θερμοκρασίες και χαμηλά pH. Ενδεικτικά, ο *M. thermophila* συνθέτει κυτταρινάσες με ικανοποιητική συμπεριφορά σε ακραίες συνθήκες, ξυλανάσες και λακκάσες που μπορούν να αξιοποιηθούν σε εφαρμογές βιοαποτοξικοποίησης (Singh 2014). Το γονιδίωμα του *M. thermophila* έχει πλήρως προσδιοριστεί από το DOE Joint Genome Institute το 2012 και περιλαμβάνει 9099 γονίδια σε 7 χρωμοσώματα (Berka et al. 2011).

II. Πειραματικό μέρος

Κεφάλαιο 4: Υλικά και μέθοδοι

4.1 Υλικά

4.1.1 Πρώτη ύλη στελέχους αραβοσίτου

Το δείγμα στελέχους αραβοσίτου (93.9 ± 0.1 % DM) παραχωρήθηκε από το Τμήμα Γεωπονίας, Φυτικής Παραγωγής και Αγροτικού Περιβάλλοντος του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας. Η συγκομιδή πραγματοποιήθηκε το Σεπτέμβριο του 2013 στον πειραματικό αγρό του Πανεπιστημίου, στο Βελεστίνο Μαγνησίας, ο οποίος καλύπτει εμβαδόν 150 στρεμμάτων καλλιεργήσιμης γης. Το στέλεχος υπέστη ξήρανση στον αγρό και στη συνέχεια αλέσθηκε με εργαστηριακό μύλο ως τελική κοκκομετρία 0.75 mm. Η αποθήκευση πραγματοποιήθηκε σε θερμοκρασία δωματίου σε σφραγισμένα πλαστικά δοχεία.

Στη συνέχεια, το στέλεχος αραβοσίτου υποβλήθηκε σε διαφορετικές προκατεργασίες, με στόχο τον προσδιορισμό των βέλτιστων συνθηκών για τη διεργασία. Η προκατεργασία των υλικών έγινε στο εργαστήριο Βιοτεχνολογίας του πανεπιστημίου Luleå University of Technology στη Σουηδία. Πραγματοποιήθηκε κατεργασία με έκρηξη ατμού σε $T=205^{\circ}\text{C}$ για 10min και σε τρεις διαφορετικές συνθήκες συγκέντρωσης οξέος: α. μηδενική προσθήκη οξέος, β. προσθήκη 0.2% H_2SO_4 , γ. προσθήκη 1.0% H_2SO_4 . Παράλληλα, πραγματοποιήθηκε επιπλέον προκατεργασία με τη μέθοδο organosolv σε τέταρτο δείγμα, με οργανικό διαλύτη αιθανόλη σε συνθήκες 172°C για 1h, με μίγμα 50% αιθανόλη-50% νερό.

4.1.2 Μικροοργανισμοί

4.1.2.1 *Saccharomyces cerevisiae*

Για τη ζύμωση των υδρολυμάτων χρησιμοποιήθηκε η χρησιμοποιήθηκε η ζύμη *S. cerevisiae* *Ethanol RedR* από την Fermentis σε αεροστεγείς συσκευασίες υπό κενό για τα πειράματα ζύμωσης (Lesaffre, France). Ο *S. cerevisiae* έχει τη δυνατότητα να ζυμώνει τις εξόζες που προέρχονται από την λιγνινοκυτταρινούχο βιομάζα με πολύ ψηλές αποδόσεις, αλλά αδυνατεί να ζυμώσει τις πεντόζες. Είναι μεσόφιλος οργανισμός με ευνοϊκή θερμοκρασία ανάπτυξης από 20 έως 40°C . Λειτουργεί σε περιοχές pH 3,0 – 7,5 με την άριστη περιοχή να είναι συνάρτηση και της θερμοκρασίας. Οι συνθήκες αερισμού επηρεάζουν σε μεγάλο βαθμό το μεταβολισμό, καθώς για την παραγωγή αιθανόλης από τη γλυκόζη είναι απαραίτητες αναερόβιες συνθήκες.

4.1.2.2 *Escherichia coli*

Ο μικροοργανισμός *Escherichia coli* χρησιμοποιήθηκε για την αύξηση του πλασμιδίου φορέα του συνθετικού γονιδίου του ερευνώμενου βιοκαταλύτη. Το *E.coli* είναι ένα Gram-αρνητικό, δυνητικά αναερόβιο βακτήριο που απαντάται στο γαστρεντερικό σύστημα θερμόαιμων οργανισμών και αναπτύσσεται βέλτιστα σε θερμοκρασία 37°C . Απαντάται σε πολλές εφαρμογές στην βιοτεχνολογία καθώς αναπτύσσεται με ιδιαίτερα γοργούς

ρυθμούς (20-30 λεπτά σε ιδανικές συνθήκες), ενώ παράλληλα απαιτεί απλά και διαθέσιμα υποστρώματα για την ανάπτυξη του.

Το στέλεχος που χρησιμοποιήθηκε ήταν το *E. coli* TOP10, που αξιοποιείται διότι παρουσιάζει χαμηλή ανασυνδυαστική ικανότητα (*recA*, recombination deficient) και έλλειψη της ενδονουκλεάσης A (*endA*, endonuclease A deficient). Το στέλεχος, δηλαδή, δε διαθέτει το γονίδιο *recA* που προκαλεί αλλαγές σε μετασχηματιζόμενα πλασμίδια, καθώς και το γονίδιο *endA* που κωδικοποιεί ενδονουκλεάση A, η οποία μπορεί να αλλοιώσει τα μετασχηματιζόμενα πλασμίδια. Τα χαρακτηριστικά αυτά το καθιστούν αξιοποιήσιμο σε τεχνικές ανασυνδυασμένου DNA, όπου κρίνεται κρίσιμη η διατήρηση της αλληλουχίας του εισερχόμενου ξένου γονιδίου.

Το στέλεχος TOP10 που χρησιμοποιήθηκε είχε καταστεί επιδεκτικό στο θερμικό σοκ (*heat shock competent*) μέσω επεξεργασίας με CaCl_2 . Ο μετασχηματισμός με θερμικό σοκ χρησιμοποιεί το πλούσιο σε ιόντα ασβεστίου εξωκυτταρικό περιβάλλον για να αντισταθμίσει την ηλεκτροστατική απώθηση ανάμεσα στο πλασμιδιακό DNA και στην κυτταρική μεμβράνη του βακτηρίου. Κατά το μετασχηματισμό, η απότομη αύξηση της θερμοκρασίας οδηγεί στο σχηματισμό πόρων στην κυτταρική μεμβράνη κάτι που επιτρέπει στα πλασμίδια να εισέλθουν στο κύτταρο (Froger and Hall 2007). Για την παρασκευή των επιδεκτικών κυττάρων, αρχικά καλλιεργήθηκαν κύτταρα TOP10 σε θρεπτικό μέσο LB, στη συνέχεια απομονώθηκαν με φυγοκέντρηση και επαναιωρήθηκαν σε διάλυμα 0.1M CaCl_2 . Μετά από μια ακόμα φυγοκέντρηση, τα κύτταρα αποθηκεύτηκαν σε διάλυμα γλυκερόλης 15%/ 0.1M CaCl_2 στους -80°C . Η αποθήκευση των κυττάρων σε τόσο χαμηλή θερμοκρασία γίνεται πάντα προσθήκη γλυκερόλης για την αποτροπή δημιουργίας κρυσταλλών νερού, που προκαλούν ρήξη των κυτταρικών μεμβρανών.

4.1.2.3 *Pichia pastoris*

Για την έκφραση του γονιδίου του καινοτόμου βιοκαταλύτη χρησιμοποιήθηκε το μετασχηματισμένο στέλεχος X33 του ζυμομύκητα *Pichia pastoris*. Ο μονοκύτταρος μεθυλότροφος μικροοργανισμός *P. pastoris* έχει παραδοσιακά αποτελέσει σύστημα ετερόλογης έκφρασης γονιδίων από ευκαρυωτικούς οργανισμούς, λόγω ιδιαίτερων χαρακτηριστικών που τον καθιστούν κατάλληλο. Χαρακτηρίζεται από τα ειδικά λειτουργικά πλεονεκτήματα των ανώτερων συστημάτων έκφρασης, όπως είναι οι μετα-μεταφραστικές τροποποιήσεις (δημιουργία δισουλφιδικών δεσμών και γλυκοζιλίωση πρωτεϊνών). Ως σύστημα είναι εύκολο στη χρήση, με υψηλό ρυθμό αύξησης ακόμη και σε θρεπτικά μέσα ιδιαίτερα χαμηλού κόστους, ενώ η δυνατότητά του να αυξάνεται παρουσία μεθανόλης, ως μοναδικής πηγής άνθρακα, αποτελεί κύριο χαρακτηριστικό του φυσικού στελέχους. Επίσης, η *P. pastoris* εκκρίνει μόνο μικρές ποσότητες εξωκυτταρικών πρωτεϊνών με αποτέλεσμα να διευκολύνεται ο διαχωρισμός της ετερόλογης πρωτεΐνης από το διάλυμα.

Προκειμένου τα κύτταρα του στελέχους X33 να είναι ικανά για μετασχηματισμό θα πρέπει να καταστούν επιδεκτικά σε ηλεκτροδιάτρηση (*electrocompetent*). Για την κατεργασία των κυττάρων ακολουθείται το εξής πρωτόκολλο: αρχικά πραγματοποιείται καλλιέργεια *P. pastoris* X33 σε υγρό μέσο YPD στους 30°C για περίπου 18h έως ότου η

οπτική πυκνότητα της καλλιέργειας στα 600 nm να ανέλθει σε 2.6-3 μονάδες. Στη συνέχεια, ακολουθεί φυγοκέντρηση και επαναιώρηση των κυττάρων σε H₂O τουλάχιστον εις διπλούν και φυγοκέντρηση και επαναιώρηση σε διάλυμα 1M σορβιτόλης. Οι πολλαπλοί κύκλοι επαναιώρησης συμβάλλουν στην αφαίρεση του θρεπτικού υλικού και των λοιπών αλάτων της καλλιέργειας, η παρουσία των οποίων μπορεί να δημιουργήσει βραχυκύκλωμα στην κυψελίδα της ηλεκτροδιάτρησης μειώνοντας σημαντικά την πιθανότητα επιτυχίας της, ενώ η προσθήκη σορβιτόλης ενισχύει τη σταθερότητα των κυτταρικών μεμβρανών, ενισχύοντας τις πιθανότητες επιβίωσής τους.

4.1.3 Χημικά αντιδραστήρια-Αναλώσιμα υλικά

Τα χημικά αντιδραστήρια που χρησιμοποιήθηκαν προμηθεύτηκαν από τις εταιρείες Sigma – Aldrich (Η.Π.Α.), Panreac (Ισπανία), Applichem (Γερμανία), LAB-SCAN (Ιρλανδία) και Fisher Scientific (Η.Π.Α), και η καθαρότητά τους ήταν αναλυτικού βαθμού. Τα πλαστικά και γυάλινα εργαστηριακά είδη που χρησιμοποιήθηκαν ήταν των εταιρειών Greiner-Bio One (Γερμανία), Eppendorf (Γερμανία), Whatman (Η.Π.Α.), Millipore (Η.Π.Α.), Sterilin Limited (Ηνωμένο Βασίλειο), SIMAX (Τσεχία), SCHOTT AG (Γερμανία), BOMEX (Κίνα) και ISO LAB (Γερμανία).

4.1.4 Εμπορικά ένζυμα

Κατά τη διάρκεια των πειραμάτων ενζυμικής υδρόλυσης χρησιμοποιήθηκε το εμπορικό ενζυμικό σκεύασμα Cellic CTec2 (Novozymes, Δανία), που περιέχει κυτταρινάσες από το μικροοργανισμό *Trichoderma reesei*. Στο σκεύασμα εμπεριέχονται ημικυτταρινάσες και ενισχυτικά ένζυμα της οικογένειας AA9 ή Lytic Polysaccharide Monooxygenases, LPMO's (CAZy AA9, πρώην GH61) που επικουρούν την κυτταρινολυτική δράση. Οι βέλτιστες συνθήκες θερμοκρασίας και pH για τη λειτουργία του ενζύμου είναι αντίστοιχα 45-50°C και 5.0-5.5, ενώ η ενεργότητα προσδιορίστηκε σε 84 FPU/mL.

4.1.5 Ρυθμιστικά διαλύματα

Τα ρυθμιστικά διαλύματα που χρησιμοποιήθηκαν και η σύστασή τους παρουσιάζονται στον Πίνακα 4.1.

Πίνακας 4.1: Ρυθμιστικά διαλύματα που χρησιμοποιήθηκαν και σύσταση αυτών

| Ρυθμιστικό διάλυμα | Σύσταση |
|---------------------------------|---|
| ΡΔ sodium citrate | Citric acid 210 g, NaOH 55 g, dH ₂ O 750 mL, pH=4.8 |
| ΡΔ citric phosphate | 200mL citric acid 100mM, 200 mL sodium phosphate 200mM, pH=5 |
| ΡΔ ηλεκτροφόρησης αγαρόζης- TBE | 54 g Trizma Base, 20 ml 0.5M EDTA pH 8, 27.5 g Boric Acid, σε τελικό όγκο 1L (υπερκάθαρο νερό) και pH=8.3 |

4.1.6 Τυποποιημένα πακέτα μεθόδων

Χρησιμοποιήθηκαν ειδικά πακέτα για την απομόνωση των πλασμιδίων από *E.coli* (GenElute Plasmid Miniprep Kit, Sigma-Aldrich), για την απομόνωση και τον καθαρισμό πλασμιδίων από πηκτή αгарόζης και διαλύματα (GenElute Gel Extraction Kit, Sigma-Aldrich).

4.1.7 Θρεπτικά υλικά

Κατά την παραγωγή καινοτόμου βιοκαταλύτη με ξυλανολυτική δράση χρησιμοποιήθηκαν θρεπτικά μέσα για την αύξηση μικροοργανισμών. Τα μέσα που χρησιμοποιήθηκαν διέφεραν ανάλογα με το είδος του μικροοργανισμού που καλλιεργήθηκε. Τα θρεπτικά υλικά που χρησιμοποιήθηκαν, καθώς και η σύσταση και χρήση αυτών παρουσιάζονται στον Πίνακα 4.2.

Πίνακας 4.2: Θρεπτικά υλικά που χρησιμοποιήθηκαν και σύσταση αυτών (μέρος Β: παραγωγή καινοτόμου βιοκαταλύτη)

| Θρεπτικό μέσο | Σύσταση Θρεπτικού μέσου | Χρήση Θρεπτικού Μέσου |
|--------------------------------|--|--|
| LB + Kanamycin (καναμικίνη) | 1% Tryptone 0.5% Yeast Extract 1% NaCl 50 µg/ml Kanamycin | Καλλιέργεια <i>Escherichia coli</i> Top 10 για πολλαπλασιασμό πλασμιδίου pEX-K4-GH30 |
| Low Salt LB + Zeocin | 1% Tryptone 0.5% Yeast Extract 0.5% NaCl 25 µg/ml Zeocin | Καλλιέργεια <i>Escherichia coli</i> TOP10 για πολλαπλασιασμό πλασμιδίου pPICZαC |
| YPD | 1% Yeast Extract 2% Peptone (Tryptone) 2% Dextrose (D-Glucose) | Προκαλλιέργεια <i>Pichia pastoris</i> X33 |
| YPDS | 1% Yeast Extract 2% Peptone (Tryptone) 2% Dextrose (D-Glucose) 1M Sorbitol 10 µg/ml Zeocin | Καλλιέργεια <i>Pichia pastoris</i> X33 μετά την ηλεκτροδιάτρηση |
| Plate Assay Medium | 0.34% YNB medium 1% Ammonium Sulfate 0.5% MetOH 0.4 µg/ml Βιοτίνη 0.4% Xylane Substrate | Ανάπτυξη μετασχηματισμένων X33 για εντοπισμό ενεργότητας ενζύμου |

Η παρασκευή των αντίστοιχων στερεών μέσων γίνεται με προσθήκη 1.5% Agar. Τα θρεπτικά μέσα αποστειρώνονται σε αυτόκλειστο στους 121°C για 20 min, ενώ τα αντιβιοτικά προστίθενται μετά την αποστείρωση, λόγω της ευαισθησίας τους σε υψηλές θερμοκρασίες.

4.1.8 Φορείς κλωνοποίησης

Για την κλωνοποίηση του συνθετικού γονιδίου κατά την παραγωγή ενζύμου με πιθανή ξυλανολυτική δράση χρησιμοποιήθηκε το πλασμίδιο pPICZαC ως φορέας κλωνοποίησης. Το πλασμίδιο pPICZα είναι ένα πλασμίδιο μεγέθους 3593bp το οποίο χρησιμοποιείται συχνά ως φορέας γονιδίων για την ετερόλογη έκφραση πρωτεϊνών στον μικροοργανισμό *Pichia pastoris*.

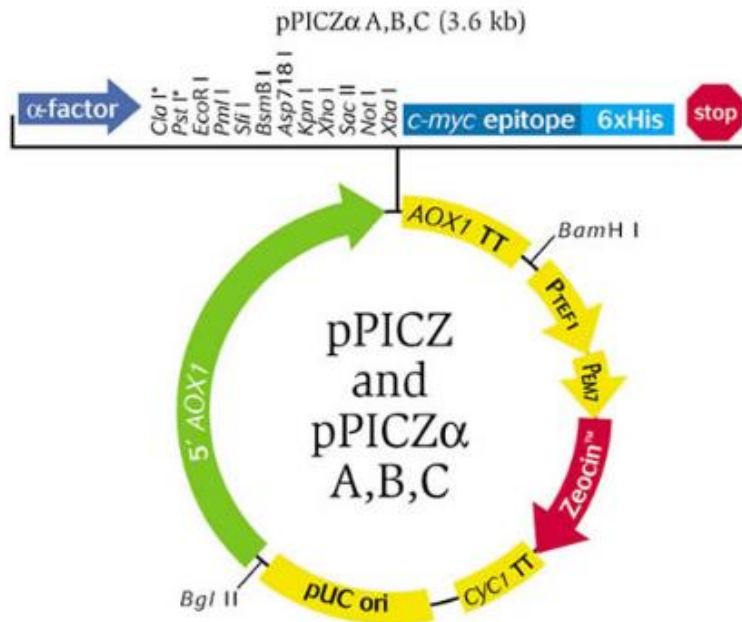
Το πλασμίδιο περιέχει τον εκκινητή AOX1 που ρυθμίζει την έκφραση γονιδίου που συνδέεται με την ανάπτυξη της *P. pastoris* σε περιβάλλον μεθανόλης. Η έκφραση του γονιδίου AOX1 ελέγχεται ταυτόχρονα από δυο μηχανισμούς: παρεμπόδισης από την γλυκόζη και επαγωγής από την μεθανόλη. Συμπεραίνεται ότι η επαγωγή της μεταγραφής του γονιδίου πραγματοποιείται απουσία γλυκόζης και παρουσία μεθανόλης. Ο τρόπος ελέγχου της έκφρασης του γονιδίου AOX1 είναι χρήσιμος για εφαρμογές βιοτεχνολογίας, καθώς είναι δυνατή η εκμετάλλευση του για τον έλεγχο της παραγωγής της ετερόλογης πρωτεΐνης. Αυτό επιτυγχάνεται με εισαγωγή της επιθυμητής αλληλουχίας σε κατάλληλο σημείο μετά τον υποκινητή, ώστε να διενεργείται η έκφραση του μαζί με την έκφραση του AOX1.

Το πλασμίδιο περιέχει επιπλέον περιοχές με λειτουργική σημασία. Σε αυτές περιλαμβάνεται η περιοχή κωδικοποίησης του α-παράγοντα ο οποίος προστίθεται στο αμινοτελικό άκρο της πρωτεΐνης και επιτρέπει την εξωκυτταρική έκκριση των πρωτεϊνών από την *P.pastoris*. Ακόμα περιέχεται μια περιοχή με πολλαπλές θέσεις κλωνοποίησης (MCS, Multiple Cloning Site), η οποία περιέχει ακολουθίες σχεδιασμένες για κοπή από περιοριστικά ένζυμα, για την εύκολη προσάρτηση του επιθυμητού γονιδίου. Η περιοχή κλωνοποίησης του pPICZα περιλαμβάνει περιοχές για την τομή από περιοριστικά ένζυμα με την ακόλουθη σειρά: Cla I (μόνο για την μορφή C του πλασμιδίου), Pst I (μόνο για την μορφή B του πλασμιδίου), EcoR I, Pml I, Sfi I, BsmB I, Asp7 18, Kpn I, Xho I, Sac II, Not I, Xba I.

Στο πλασμίδιο περιλαμβάνεται ακολουθία που κωδικοποιεί το επίτοπο c-myc (Glu-Gln-Lys-Leu-Ile-Ser-Glu-Glu-Asp-Leu) και το 6xHis tag. Η παρουσία αυτών επιτρέπει την ανίχνευση των πρωτεϊνών και τον καθαρισμό τους με τη χρήση στήλης χρωματογραφίας ιοντικής συγγένειας. Όσον αφορά στην αντίσταση σε αντιβιοτικά, το πλασμίδιο περιέχει τον εκκινητή TEF1 του *S. cerevisiae* που καθιστά δυνατή την έκφραση του γονιδίου αντίστασης σε Zeocin από την *P.pastoris* και τον EM7, έναν συνθετικό προκαρυωτικό εκκινητή που καθιστά δυνατή την έκφραση του γονιδίου αντίστασης σε Zeocin από το *E.coli*. Το γονίδιο αντίστασης στη Zeocin (Sh ble) χρησιμοποιείται για την επιλογή των μετασηματισμένων αποικιών. Τέλος, περιέχεται περιοχή έναρξης αντιγραφής (pUC) που επάγει την αύξηση του αριθμού πλασμιδίων σε *E.coli*, ώστε να διευκολυνθεί το στάδιο

του μετασηματισμού. (Invitrogen ; Μουκούλη 2012) Οι παραπάνω περιοχές παρουσιάζονται στο Σχήμα 4.1 όπου απεικονίζεται η δομή του πλασμιδίου pPICZαC.

Το πλασμίδιο pPICZαC πολλαπλασιάστηκε με το στέλεχος *E.coli* TOP10, το οποίο παρουσιάζει μικρή δυνατότητα ανασυνδυασμού (recA, recombination deficient) και από το οποίο εκλείπει το γονίδιο για ενδονουκλεάση A, ώστε να αποφευχθούν αυθόρμητες αλλαγές στο πλασμίδιο κατά την κλωνοποίηση.



Σχήμα 4.1: Χάρτης των περιοχών του πλασμιδίου pPICZαC (Thermofisher Scientific)

4.1.9 Υλικά και στήλες χρωματογραφίας

Στη μέθοδο της υγρής χρωματογραφίας υψηλής απόδοσης (HPLC, High Performance Liquid Chromatography) χρησιμοποιήθηκε η στήλη Animex HPX-87H Ion Exclusion Column (300x7.8 mm, particle size 9 μ m; Bio-rad, Hercules, CA, USA) για τον προσδιορισμό της αιθανόλης.

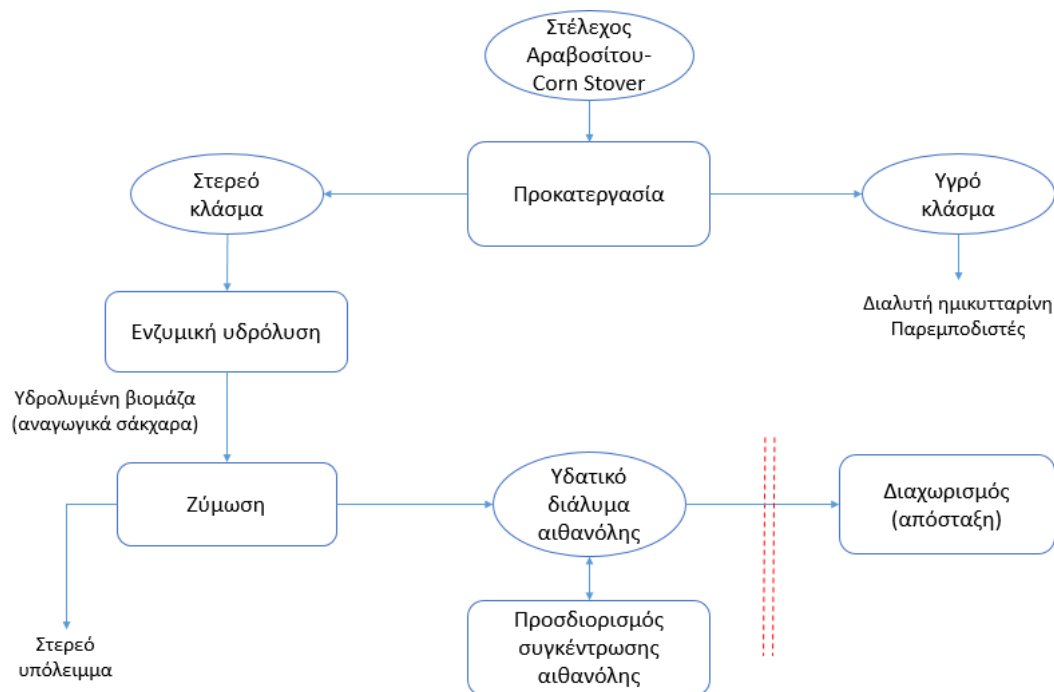
4.1.10 Συσκευές και όργανα

Παρουσιάζονται οι συσκευές και τα όργανα που χρησιμοποιήθηκαν στην παρούσα διπλωματική εργασία.

- Ηλεκτρονικοί ζυγοί ακριβείας Bel Engineering (Ιταλία), Kern ABS (Γερμανία)
- Φωτόμετρο S-22 UV-VIS Spectrophotometer, BOECO (Γερμανία)
- Φωτόμετρο Microplate reader (SpectraMax 250, Molecular Devices)
- Θερμοστατούμενα υδατόλουτρα
- Συσκευή μέτρησης pH WTW 537, WTW (Γερμανία)
- Συσκευή διήθησης υπό κενό
- Ξηραντήρας WTE binder 7200 Tutteigen (Γερμανία)
- Φυγόκεντρος Beckman Coulter (Η.Π.Α.) και μικροφυγόκεντρος πάγκου Eppendorf 3200 (Γερμανία)
- Αυτόκαυστο Labo Autoclave, SANYO (Η.Π.Α.)
- Επωαστήρας ZHWY-211C, Zhicheng (Κίνα)
- Επωαστήρας Orbital incubator S150, Stuart Scientific (Μ. Βρετανία)
- Θερμαινόμενος Επωαστήρας με ανάδευση Eppendorf Thermomixer Comfort, Eppendorf (Γερμανία)
- Σύστημα παραγωγής υπερκαθαρού νερού Direct-Q, Millipore (Η.Π.Α.)
- Σύστημα χρωματογραφίας υψηλής απόδοσης (HPLC) Shimadzu (Ιαπωνία) με σύστημα αυτόματης παροχής διαλύτη (Shimadzu LC-20AD), ανιχνευτή δείκτη διάθλασης (Shimadzu RID 10A), αυτόματο δειγματολήπτη (Shimadzu SIL-20A) και λογισμικό σύστημα (LCsolution Έκδοση 1.24 SP1, Shimadzu)
- Αναμεικτήρας ρευστοποίησης ελεύθερης πτώσης (Freefall Mixer, Εργαστήριο Βιοτεχνολογίας, Ε.Μ.Π.)
- Φούρνος-πυριατήριο Muffle Furnace, Size 1, Gallenkamp (Γερμανία)
- Ιξωδόμετρο Anton Paar Physica MCR rheometer (Anton Paar Gmbh, Styria, Αυστρία)
- Συσκευή υπερήχων Transsonic Digital, Elma (Γερμανία)
- Συσκευή ηλεκτροδιάτρησης MicroPulser, Bio-Rad (Η.Π.Α.)
- Συσκευή ηλεκτροφόρησης πηκτής πολυακρυλαμιδίου (SDS-PAGE), Bio-Rad (Η.Π.Α.)
- Συσκευή φωτογράφισης σε κλειστό θάλαμο InGenius BioImaging, Syngene (Ηνωμένο Βασίλειο)

4.2 Εποπτική θεώρηση της πειραματικής διαδικασίας

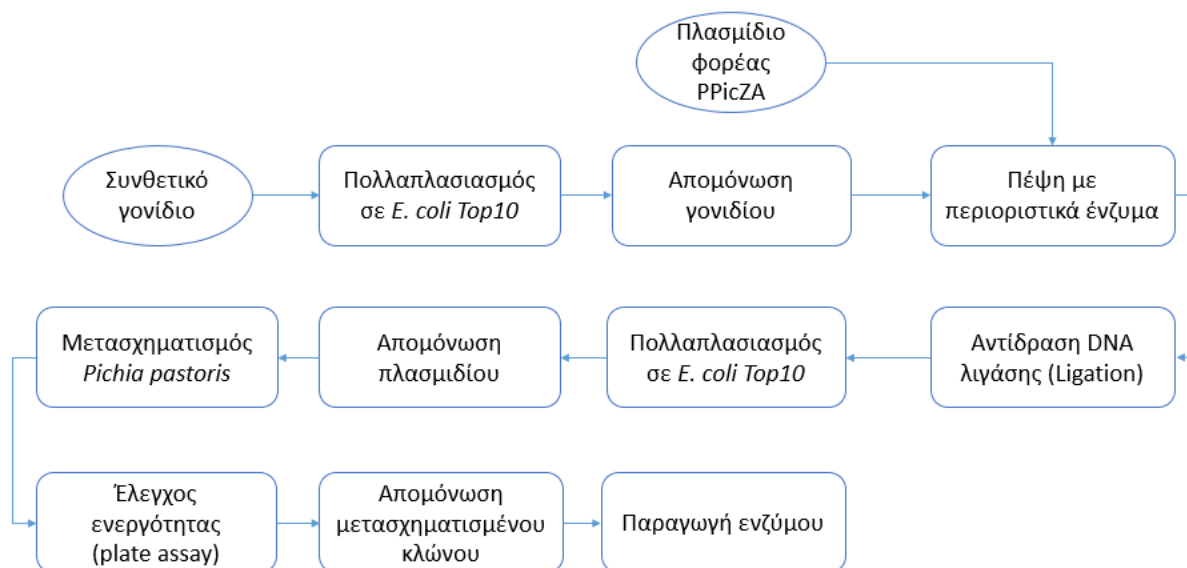
Η πειραματική διαδικασία ακολούθησε τα στάδια της διεργασίας παραγωγής βιοαιθανόλης από λιγνινοκυτταρινούχο βιομάζα. Στο παρακάτω διάγραμμα ροής (Σχήμα 4.2) παρουσιάζονται εποπτικά τα διακριτά στάδια της διεργασίας.



Σχήμα 4.2: Εποπτική θεώρηση της πειραματικής διαδικασίας- διάγραμμα ροής παραγωγής βιοαιθανόλης.

Στην παρούσα εργασία αξιοποιήθηκε το στερεό κλάσμα της προκατεργασίας στελέχους αραβοσίτου. Αναλύθηκαν τρεις σειρές δειγμάτων που προέκυψαν από τη μέθοδο προκατεργασίας έκρηξης ατμού (steam explosion) σε διαφορετικές συνθήκες προκατεργασίας, και μία σειρά δειγμάτων που προέκυψε από τη μέθοδο προκατεργασίας organosolv. Μελετήθηκαν για κάθε δείγμα ως προς τις βέλτιστες συνθήκες οι διεργασίες ενζυμικής υδρόλυσης και ζύμωσης. Η συνολική απόδοση εκτιμήθηκε από τον προσδιορισμό της συγκέντρωσης αιθανόλης στο προϊόν της ζύμωσης (broth), καθώς η διεργασία διαχωρισμού του μίγματος με απόσταξη δε μελετήθηκε.

Παράλληλα με τη μελέτη της κύριας διεργασίας διερευνήθηκε η παραγωγή καινοτόμου βιοκαταλύτη με ξυλανολυτική δράση με τεχνικές ανασυνδυασμένου DNA. Το ένζυμο που μελετήθηκε προέρχεται από το μικροοργανισμό *Myceliophthora thermophila* και χαρακτηρίζεται στις γονιδιωματικές βιβλιοθήκες ως βιοκαταλύτης με πιθανή (putative) δράση ξυλάνης. Η πειραματική διαδικασία παραγωγής του ενζύμου παρουσιάζεται εποπτικά στο παρακάτω διάγραμμα ροής (Σχήμα 4.3).



Σχήμα 4.3: Διάγραμμα ροής παραγωγής βιοκαταλύτη με πιθανή ξυλανολυτική δράση

4.3 Μέθοδοι

4.3.1 Μέτρηση ολικών αναγωγικών σακχάρων με τη μέθοδο DNS

Για τον προσδιορισμό της συγκέντρωσης ολικών αναγωγικών σακχάρων χρησιμοποιήθηκε η μέθοδος του 3,5-δινιτροσαλικυλικού οξέος (Miller 1959). Το 3,5-δινιτροσαλικυλικό οξύ είναι μια αρωματική ένωση η οποία αντιδρά με τα αναγωγικά σάκχαρα προς το σχηματισμό 3-αμινο-5νιτροσαλικυλικού οξέος που απορροφά έντονα στα 540nm. Για το λόγο αυτό χρησιμοποιείται για τον ποσοτικό προσδιορισμό αναγωγικών σακχάρων, χρήση καμπύλης αναφοράς που κατασκευάζεται από διαλύματα γνωστής συγκέντρωσης. Παρακάτω παρουσιάζεται η μέθοδος παρασκευής διαλύματος 3,5-δινιτροσαλικυλικού οξέος.

Παρασκευάστηκε διάλυμα NaOH 8% w/v με διάλυση 16g καθαρού στερεού NaOH σε 200 mL απιονισμένου νερού. Το διάλυμα αυτό αναμίχθηκε με 500 mL απιονισμένου νερού και 10g στερεού DNS μέχρι πλήρους διάλυσης των στερεών. Στη συνέχεια, προστέθηκαν με αργό ρυθμό 402.7g τρυγικού νατρίου-καλίου-potassium sodium tartate (Rochelle Salts) υπό ανάδευση και ήπια θέρμανση. Μετά την πλήρη διάλυση των στερεών προστέθηκε απιονισμένο νερό μέχρι τελικού όγκου 1000mL και το διάλυμα αποθηκεύτηκε σε σκουρόχρωμα δοχείο μακριά από πηγές φωτός.

Για τον προσδιορισμό αναγωγικών σακχάρων σύμφωνα με το πρωτόκολλο προστέθηκαν 250 μL διαλύματος DNS σε 250 μL δείγματος και το μίγμα οδηγήθηκε προς βρασμό για 5 min. Στη συνέχεια προστέθηκαν 2 mL απιονισμένου νερού και ακολούθησε φωτομέτρηση στα 540nm. Τα ολικά αναγωγικά σάκχαρα (Total Reducing Sugar, TRS) εκφράστηκαν μέσω καμπύλης αναφοράς σε ισοδύναμα γλυκόζης. Σε κάθε περίπτωση πραγματοποιήθηκαν οι κατάλληλες αραιώσεις στα δείγματα, ώστε ο προσδιορισμός να γίνεται στα όρια γραμμικότητας της καμπύλης αναφοράς, ενώ οι δοκιμές εκτελέστηκαν εις διπλούν.

4.3.2 Μέτρηση γλυκόζης

Οι μετρήσεις συγκέντρωσης γλυκόζης πραγματοποιήθηκαν με το εμπορικό ενζυμικό σκεύασμα της Biosis GOD/PAP (glucose oxidase/peroxidase assay). Ο προσδιορισμός βασίζεται στη μετατροπή της γλυκόζης σε ένα προϊόν ερυθρού χρώματος το οποίο είναι αποτέλεσμα της διαδοχικής δράσης των ενζύμων οξειδάση και υπεροξειδάση της γλυκόζης και εμφανίζει μέγιστη απορρόφηση στα 510nm. Αναλυτικότερα, παρουσία του ενζύμου οξειδάσης της γλυκόζης (GOD) η γλυκόζη οξειδώνεται και παράγει H_2O_2 . Η αντίδραση του H_2O_2 με φαινολικό παράγωγο και 4-αμινοφαιναζόνη καταλύεται από το ένζυμο υπεροξειδάση (POD) και παράγει έγχρωμο προϊόν ερυθρού χρώματος. Η αύξηση της απορρόφησης στα 510 nm είναι ανάλογη της συγκέντρωσης της γλυκόζης στο δείγμα. Η αντίδραση είναι γραμμική στην περιοχή συγκεντρώσεων από 0,7-500 mg/dl και το όριο ευαισθησίας του προσδιορισμού είναι 0,7 mg/dl.

Σύμφωνα με τη μέθοδο για τον προσδιορισμό της συγκέντρωσης γλυκόζης, προστέθηκαν 240 μ L του σκευάσματος και 10 μ L του δείγματος σε υποδοχή (well) πλακέτας ELISA Microplate, η οποία τοποθετήθηκε στο θάλαμο σταθερής θερμοκρασίας 37°C του φωτόμετρου Microplate reader για 15 min. Η απορρόφηση μετρήθηκε στα 510 nm κατά την επίτευξη ισορροπίας της αντίδρασης (End point). Η γλυκόζη προσδιορίστηκε μέσω καμπύλης αναφοράς, ενώ κάθε μέτρηση εκτελέστηκε τουλάχιστον εις διπλούν.

4.3.3 Μέτρηση ενεργότητας κυτταρινασών

4.3.3.1 Σκοπός

Σκοπός της μέτρησης είναι ο προσδιορισμός της κυτταρινολυτικής ενεργότητας του εμπορικού ενζυμικού σκευάσματος που χρησιμοποιήθηκε για τις υδρολύσεις της βιομάζας στις σειρές πειραμάτων. Η μέτρηση είναι απαραίτητη για τη σύνδεση προστιθέμενου όγκου σκευάσματος και πραγματικής ενζυμικής ενεργότητας σε κάθε περίπτωση. Αν και το εμπορικό σκεύασμα εμπεριέχει συντηρητικές ουσίες για τη μακροχρόνια αποθήκευσή του, ενδέχεται η ενεργότητά του να μειωθεί με την πάροδο του χρόνου, ακόμα και σε περίπτωση που αποθηκεύεται σε χαμηλές θερμοκρασίες. Για το λόγο αυτό, η συγκεκριμένη μέτρηση κρίνεται απαραίτητη πριν την έναρξη πειραμάτων υδρόλυσης. Ο προσδιορισμός της ενεργότητας πραγματοποιήθηκε βάσει του πρωτοκόλλου NREL (Adney 2008) για τη μέτρηση ενεργότητας κυτταρινασών, το οποίο υπάγεται στις οδηγίες της IUPAC, και εκφράστηκε σε Filter Paper Activity- FPA Units. Παράλληλα, μετρήθηκε η πρωτεϊνική πυκνότητα του σκευάσματος μέσω της μεθόδου Bradford και η συγκέντρωση ενζύμου εκφράστηκε ως mg πρωτεΐνης/mL σκευάσματος.

4.3.3.2 Μέτρηση ενεργότητας κυτταρινασών

Η μέθοδος εκφράζει την ενεργότητα κυτταρινασών σε “filter paper units-FPU” ανά mL του αρχικού αναραιώτου ενζυμικού διαλύματος, κατά IUPAC. Για τον υπολογισμό αυτής της έκφρασης ενεργότητας, η μέθοδος υπαγορεύει την παραγωγή 2.0mg αναγωγικού σακχάρου (εκφρασμένου ως γλυκόζη) από 50mg διηθητικού χαρτιού Whatman No. 1 (που αντιστοιχεί σε μετατροπή 4%) σε 60 min. Η ενεργότητα τότε προσδιορίζεται από τη σχέση:

$$\text{Filter Paper Activity} = \frac{0.37}{[\text{ένζυμο}] \text{ που απελευθερώνει } 2.0 \text{ mg γλυκόζης}} \text{ units/mL}$$

Όπου

[ένζυμο]: η συγκέντρωση ενζύμου στην κατάλληλη αραιώση που απελευθερώνει 2.0 mg γλυκόζης

Η μέθοδος βασίζεται σε αυτό τον υπολογισμό, διότι η απόδοση σε αναγωγικά σάκχαρα δεν είναι γραμμική συνάρτηση της ποσότητας του ενζύμου στο μίγμα της αντίδρασης. Για παράδειγμα, διπλάσια ποσότητα κυτταρινολυτικού ενζύμου δε θα απέδιδε απαραίτητως διπλάσια ποσότητα αναγωγικών σακχάρων στον ίδιο χρόνο (Ghose 1987). Το πρωτόκολλο βασίζεται στην προετοιμασία διαφορετικών αραιώσεων του αρχικού σκευάσματος ώστε να βρεθεί εκείνη η αραιώση που αποδίδει 2.0 mg γλυκόζης σε 60min. Πρακτικά, αυτό που απαιτείται είναι η εύρεση δύο αραιώσεων εκατέρωθεν της επιζητούμενης τιμής (για παράδειγμα 1.9 και 2.1 mg γλυκόζης) ώστε να είναι δυνατή η γραμμική παλινδρόμηση μεταξύ των δύο τιμών με ακρίβεια.

Τα μίγματα της αντίδρασης μπορεί σε ορισμένες περιπτώσεις να περιέχουν αναγωγικά σάκχαρα που δεν προέρχονται από διάσπαση του γλυκοζιτικού δεσμού της κυτταρίνης. Για παράδειγμα, η παρουσία τους στο σκεύασμα του ενζύμου δικαιολογείται, αφού κατά την παραγωγή του σκευάσματος χρησιμοποιούνται σάκχαρα ως θρεπτικό μέσο των μικροοργανισμών και μέρος αυτών παραμένει στο ενζυμικό διάλυμα. Αντίστοιχα, αναγωγικά σάκχαρα μπορεί να ανιχνευθούν και στο υπόστρωμα-διηθητικό χαρτί, λόγω των αναγωγικών άκρων στο τέρμα των αλυσίδων κυτταρίνης πριν από τη δράση ενζύμου. Για το λόγο αυτό η μέθοδος προβλέπει την παρασκευή διαλυμάτων control (διαλύματα ελέγχου) που αποτελούνται από: (α) ένζυμο άνευ υποστρώματος και (β) υπόστρωμα άνευ ενζύμου. Το σφάλμα αποφεύγεται αφαιρώντας τις τιμές των διαλυμάτων control από αυτές των εξεταζόμενων δειγμάτων.

Η μέθοδος βασίζεται στην προετοιμασία τριών ειδών μιγμάτων σε δοκιμαστικούς σωλήνες: μίγματα ενζυμικού σκευάσματος (assay mixtures), τυφλά διαλύματα και διαλύματα ελέγχου (blanks and controls) και διαλύματα γλυκόζης γνωστής συγκέντρωσης (glucose standards).

Το υπόστρωμα της αντίδρασης, διηθητικό χαρτί Whatman No.1 κόπηκε σε τμήματα βάρους 50mg (διαστάσεων περίπου 1.0 x 6.0 cm) και δείγματα τοποθετήθηκαν σε δοκιμαστικούς σωλήνες. Στη συνέχεια, προστέθηκε 1.0 mL buffer 0.05 M κιτρικού νατρίου, pH=4.8 σε κάθε δοκιμαστικό σωλήνα, ώστε να διαβραχεί πλήρως το υπόστρωμα. Όλοι οι δοκιμαστικοί σωλήνες τοποθετήθηκαν σε υδατόλουτρο στους 50°C για αρκετό χρονικό διάστημα ώστε να σταθεροποιηθεί η θερμοκρασία τους.

Στη συνέχεια, προστέθηκε σε κάθε δοκιμαστικό σωλήνα 0.5mL κατάλληλης αραιώσης ενζύμου. Στόχος ήταν η επίτευξη τιμών απελευθέρωσης γλυκόζης εκατέρωθεν της τιμής 2.0mg. Επιλέχθηκαν αραιώσεις 1:100, 1:200, 1:300, 1:400, 1:500, 1:600, 1:800. Οι δοκιμαστικοί σωλήνες παρέμειναν στο υδατόλουτρο στους 50°C για 60min. Στο τέλος της

περιόδου επώασης προστέθηκαν σε κάθε δοκιμαστικό σωλήνα 3.0mL διαλύματος DNS ώστε να τερματιστεί άμεσα η αντίδραση.

Το τυφλό διάλυμα αποτελούταν από 1.5 mL buffer κιτρικού νατρίου, ενώ τα διαλύματα ελέγχου αποτελούνταν από 1.0 mL buffer και 0.5 mL διαλύματος ενζύμου (ένα για κάθε αραιώση) άνευ υποστρώματος, και από 1.5 mL buffer και υπόστρωμα (άνευ ενζύμου). Παράλληλα με αυτές τις μετρήσεις, παρασκευάστηκαν πρότυπα διαλύματα γλυκόζης με τον ακόλουθο τρόπο. Από διάλυμα εργασίας 100 mg/mL άνυδρης γλυκόζης ακολουθήθηκαν οι αραιώσεις:

Πίνακας 4.3: Αραιώσεις για την κατασκευή πρότυπων διαλυμάτων γλυκόζης (μέτρηση ενεργότητας κυτταρινασών)

| Αραιώση | Συγκέντρωση γλυκόζης (mg/mL) | Συγκέντρωση γλυκόζης (mg/0.5 mL) | Όγκος διαλύματος εργασίας γλυκόζης (mL) | Όγκος citrate buffer (mL) |
|---------|------------------------------|----------------------------------|---|---------------------------|
| 1:1.5 | 6.7 | 3.35 | 1.0 | 0.5 |
| 1:2 | 5 | 2.5 | 1.0 | 1.0 |
| 1:3 | 3.3 | 1.65 | 1.0 | 2.0 |
| 1:5 | 2 | 1.0 | 1.0 | 4.0 |

Τα διαλύματα γλυκόζης στη συνέχεια παρασκευάστηκαν προσθέτοντας 0.5 mL από κάθε αραιώση σε 1.0mL buffer σε δοκιμαστικούς σωλήνες. Τα πρότυπα γλυκόζης, το τυφλό διάλυμα και τα διαλύματα ελέγχου επώαστηκαν στις ίδιες ακριβώς συνθήκες με τα δείγματα που εμπεριείχαν ένζυμο και προστέθηκαν σε αυτά 3.0 mL DNS.

Για τον προσδιορισμό της απορρόφησης των δειγμάτων όλοι οι δοκιμαστικοί σωλήνες οδηγήθηκαν προς βρασμό σε λουτρό νερού αρκετό ώστε να καλύπτει το πληρωμένο μέρος των δοκιμαστικών σωλήνων. Μετά το βρασμό μεταφέρθηκαν σε παγόλουτρο και αφέθηκαν μέχρι να κατακαθίσει ο πολτός του υποστρώματος. Στη συνέχεια, ελήφθησαν 200μL από το υπερκείμενο υγρό κάθε δοκιμαστικού σωλήνα και αραιώθηκαν σε 2.5mL απεσταγμένου νερού. Ακολούθησε φωτομέτρηση όλων των δειγμάτων στα 540nm, όπου ο μηδενισμός πραγματοποιήθηκε με το τυφλό διάλυμα. Στη συνέχεια κατασκευάστηκε καμπύλη αναφοράς αναγωγικών σακχάρων εκφρασμένων ως προς γλυκόζη από τα πρότυπα διαλύματα γλυκόζης, ώστε να υπολογιστεί η ενεργότητα του σκευάσματος.

4.3.3.3 Υπολογισμός της συγκέντρωσης πρωτεΐνης στο σκεύασμα με τη μέθοδο Bradford

Η συγκέντρωση ενζύμου μετρήθηκε μέσω της μεθόδου Bradford (Bradford 1976) για τον προσδιορισμό συγκέντρωσης πρωτεϊνών. Η μέθοδος είναι φωτομετρική και βασίζεται στην αλλαγή χρώματος της βαφής Coomassie Brilliant Blue G-250 κατά την πρόσδεσή της στις πρωτεΐνες. Η ελεύθερη μορφή της βαφής έχει ερυθρό-καφέ χρώμα, ενώ με την πρόσδεση στην πρωτεΐνη το σύμπλοκο αποκτά έντονο μπλε χρώμα. Η μέθοδος

χρησιμοποιείται για την ανίχνευση πρωτεϊνών και για την ποσοτικοποίησή τους, χρήσει πρότυπων πρωτεϊνικών μιγμάτων που συνιστούν καμπύλη αναφοράς.

Για τη μέτρηση πραγματοποιήθηκαν αραιώσεις 1:200, 1:300, 1:400, 1:500 και 1:600 του ενζυμικού σκευάσματος. Προστέθηκαν 25μL από κάθε δείγμα σε 1.250 mL διαλύματος Bradford, ακολούθησε έντονη ανάδευση και φωτομέτρηση στα 595nm.

4.3.4 Ανάλυση σύστασης στελεχών αραβοσίτου

4.3.4.1 Σκοπός

Σκοπός της μέτρησης είναι ο προσδιορισμός της περιεχόμενης κυτταρίνης, ημικυτταρίνης, λιγνίνης και τέφρας στα δείγματα στελέχους αραβοσίτου. Τα αποτελέσματα της ανάλυσης σύστασης είναι ενδεικτικά της επιτυχίας της προκατεργασίας που στοχεύει στη μερική απολιγνινοποίηση και μερική υδρόλυση της ημικυτταρίνης. Τα δείγματα που αναλύθηκαν ήταν: ακατέργαστη πρώτη ύλη στελέχους αραβοσίτου (Corn Stover), Corn Stover με προκατεργασία έκρηξης ατμού άνευ προσθήκης όξινου καταλύτη (Δείγμα Α), Corn Stover με προκατεργασία έκρηξης ατμού με προσθήκη 0.2 % θειικού οξέος (Δείγμα Β), Corn Stover με προκατεργασία έκρηξης ατμού με προσθήκη 1% θειικού οξέος (Δείγμα Γ), Corn Stover με προκατεργασία οργανικού διαλύτη-organosolv (Δείγμα Δ).

4.3.4.1 Ανάλυση σύστασης

Προσδιορίστηκαν τα ποσοστά κυτταρίνης, ημικυτταρίνης, λιγνίνης και περιεχόμενης τέφρας στο corn stover με το πρωτόκολλο σύστασης βιομάζας NREL (Sluiter et al. 2012). Σύμφωνα με τη μέθοδο, αρχικά πραγματοποιήθηκε όξινη υδρόλυση 300 mg ξηρού υλικού με προσθήκη 3 mL διαλύματος 72% w/w θειικού οξέος (H₂SO₄), με στόχο τη διαλυτοποίηση της κυτταρίνης, της ημικυτταρίνης και της λιγνίνης. Η υδρόλυση έλαβε χώρα σε κωνικές φιάλες Erlenmeyer των 100mL και το μίγμα περιοδικά αναδεύονταν, ώστε το θειικό οξύ να έχει πρόσβαση σε όλο τον όγκο της βιομάζας και η υδρόλυση να είναι ομοιόμορφη. Οι κωνικές φιάλες τοποθετήθηκαν σε επωαστήρα για 60 min στους 30°C με υψηλή ανάδευση (180rpm), ενώ συχνά πραγματοποιούνταν επιπλέον ανάδευση με υάλινο ραβδί.

Μετά το πέρας της όξινης υδρόλυσης, ακολούθησε αραιώση του πυκνού οξέος με προσθήκη 84 mL απιονισμένου νερού, ώστε η τελική συγκέντρωση να είναι 4% w/w. Οι φιάλες τοποθετήθηκαν σε κλίβανο αποστείρωσης στους 121°C για 60min, όπου ολοκληρώνεται η αποδόμηση της βιομάζας. Τα υδρολύματα στη συνέχεια αφέθηκαν ώστε να αποκτήσουν θερμοκρασία δωματίου, με το στερεό υπόλειμμα της βιομάζας να παραμένει στον πυθμένα της φιάλης.

Το μίγμα στη συνέχεια διηθήθηκε υπό κενό χρήσει αντλίας κενού και προζυγισμένου ξηρού υάλινου ηθμού. Αφενός, το διήθημα απομονώθηκε και χρησιμοποιήθηκε για τον προσδιορισμό της κυτταρίνης, της ημικυτταρίνης και της διαλυτής λιγνίνης της βιομάζας. Αφετέρου, το στερεό υπόλειμμα μεταφέρθηκε ποσοτικά στον ηθμό χρήσει απιονισμένου νερού, προκειμένου να προσδιορισθούν η αδιάλυτη λιγνίνη και η τέφρα της βιομάζας.

Για τη μέτρηση αδιάλυτης λιγνίνης και τέφρας ακολουθήθηκε η εξής διαδικασία: Ο υάλινος ηθμός που περιείχε το στερεό υπόλειμμα ξηράνθηκε μέχρι σταθερού βάρους στους 105°C και ζυγίσθηκε σε αναλυτικό ζυγό. Το ξηρό στερεό υπόλειμμα απομακρύνθηκε από τον ηθμό με τη βοήθεια σπαθίδας και μεταφέρθηκε σε προζυγισμένη κάψα, ενώ μετρήθηκε και το μικτό βάρος δείγματος και κάψας. Η κάψα τοποθετήθηκε σε φούρνο στους 575°C με στόχο την αποτέφρωση του στερεού. Η αύξηση της θερμοκρασίας στο φούρνο πραγματοποιήθηκε σταδιακά, ώστε να αποφευχθεί η πιθανή ανάφλεξη των δειγμάτων. Με το πέρας της αποτέφρωσης οι κάψες αφέθηκαν να αποκτήσουν θερμοκρασία περιβάλλοντος και επαναζυγίσθηκαν. Τέλος, παρόμοια διαδικασία ακολουθήθηκε και για τον προσδιορισμό της ολικής τέφρας της βιομάζας. Ορισμένη ποσότητα δείγματος τοποθετήθηκε σε προζυγισμένη κάψα, και οδηγήθηκε προς αποτέφρωση στους 575°C στις ίδιες συνθήκες. Η ζύγιση της κάψας μετά το πέρας της αποτέφρωσης δίνει αποτελέσματα για τη συνολική περιεχόμενη τέφρα της βιομάζας.

Για τον προσδιορισμό των ποσοστών κυτταρίνης, ημικυτταρίνης και διαλυτής λιγνίνης της βιομάζας αξιοποιήθηκε το διήθημα που προέκυψε από την ανωτέρω διαδικασία. Μέρος του διηθήματος φωτομετρήθηκε στα 320nm για τη μέτρηση της διαλυτής λιγνίνης, μετά από κατάλληλη αραιώση με H₂SO₄ 4% w/w. Η φωτομέτρηση πραγματοποιήθηκε στο υπεριώδες φάσμα, για το λόγο αυτό έγινε χρήση κυψελίδας χαλαζία. Το λοιπό μέρος του διηθήματος εξουδετερώθηκε με ανθρακικό ασβέστιο (CaCO₃) ως pH 5-6 σε ποτήρι ζέσεως των 100mL. Η προσθήκη του αντιδρώντος πραγματοποιήθηκε με αργό ρυθμό και υπό ανάδευση, καθώς κατά την εξουδετέρωση παράγεται CO₂ που οδηγεί σε αφρισμό του μίγματος. Με το πέρας της εξουδετέρωσης τα δείγματα αφέθηκαν σε ηρεμία για να διαχωριστούν οι δύο φάσεις. Από την ανωτέρα φάση ελήφθη δείγμα όγκου 1mL με πιπέτα, το οποίο φυγοκεντρήθηκε συντόμως ώστε να εξασφαλιστεί η πλήρης απομάκρυνση του ιζήματος. Το υπερκείμενο υγρό αραιώθηκε σε απιονισμένο νερό (αραιώση 1:4) και οδηγήθηκε προς μέτρηση ολικών αναγωγικών σακχάρων (μέθοδος DNS) και γλυκόζης (μέθοδος σκευάσματος GOD-PAP). Η μέτρηση περιεχόμενης γλυκόζης δίνει πληροφορίες για το περιεχόμενο ποσοστό κυτταρίνης, ενώ τα ολικά αναγωγικά σάκχαρα συνδέονται με την ημικυτταρίνη που είναι παρούσα στο δείγμα. Σε κάθε περίπτωση, τα πειράματα πραγματοποιήθηκαν εις διπλούν για όλα τα υλικά.

4.3.5 Ανάλυση κρυσταλλικότητας πρώτης ύλης με περίθλαση ακτίνων X- XRD

4.3.5.1 Σκοπός

Σκοπός της μέτρησης είναι ο προσδιορισμός της κρυσταλλικότητας της πρώτης ύλης και των δειγμάτων από τις διαφορετικές προκατεργασίες, και η μεταξύ τους σύγκριση. Σκοπός της προκατεργασίας, εκτός από τη μερική απολιγνινοποίηση και τη μερική υδρόλυση της ημικυτταρίνης, είναι και η μείωση της κρυσταλλικότητας του υλικού. Έτσι, η προκατεργασία διευκολύνει την πρόσβαση του ενζύμου στην κυτταρίνη, ενώ ταυτόχρονα οι άμορφες περιοχές της κυτταρίνης υδρολύονται με μεγαλύτερη ευκολία από τα κυτταρινολυτικά ένζυμα. Παρόλα αυτά, έχει αναφερθεί αύξηση της

κρυσταλλικότητας της βιομάζας σε ορισμένες προκατεργασίες, καθώς μπορεί να προκύψει μερική υδρόλυση της κυτταρίνης από τις άμορφες περιοχές κατά την κατεργασία. Επομένως ο προσδιορισμός της κρυσταλλικότητας και η συσχέτιση αυτής με την απόδοση σε σάκχαρα παρουσιάζει ενδιαφέρον.

4.3.5.2 Μετρήσεις περίθλασης ακτίνων X- XRD

Ο προσδιορισμός του δείκτη κρυσταλλικότητας πραγματοποιήθηκε σε όργανο περίθλασης ακτίνων X (Bruker D8 Advance, Γερμανία). Τα δείγματα τοποθετήθηκαν σε κατάλληλο δειγματοφορέα από χαλαζία, και στη συνέχεια στο γωνιόμετρο της συσκευής, το οποίο περιστρέφεται με σταθερή γωνιακή ταχύτητα θ στο επίπεδο ανάκλασης των ακτίνων X. Για την παραγωγή των ακτίνων X χρησιμοποιήθηκε λυχνία Cu και οι συνθήκες τέθηκαν σε 40 kV και 40mA. Η ακτινοβολία που χρησιμοποιήθηκε ήταν μήκους κύματος $\lambda=1.5418\text{\AA}$. Η σάρωση των γωνιών 2θ έγινε στο διάστημα $3^\circ-30^\circ$ με βήμα $0,02^\circ/s$.

Με τον τρόπο αυτό ελήφθη διάγραμμα που αποτυπώνει την ένταση της ανακλώμενης ακτινοβολίας I συναρτήσει της γωνίας 2θ από το οποίο προσδιορίζεται ο δείκτης κρυσταλλικότητας. Στο διάγραμμα παρουσιάζεται η άμορφη περιοχή, η «κοιλιάδα» της οποίας εμφανίζεται σε $2\theta=18.7^\circ$ και η κρυσταλλική περιοχή, η κορυφή της οποίας εμφανίζεται σε $2\theta= 22.5^\circ$. Ο δείκτης κρυσταλλικότητας υπολογίζεται από τη σχέση (Segal, 1959):

$$CrI = 100 \cdot [(I_{002} - I_{amorphous})/I_{002}]$$

Όπου I_{002} : η ένταση της κρυσταλλικής περιοχής (ύψος της κορυφής) σε $2\theta= 22.5^\circ$, και

$I_{amorphous}$: η ελάχιστη ένταση της άμορφης περιοχής (ύψος της κοιλιάδας) σε $2\theta=18.7^\circ$

4.3.6 Υδρόλυση στελεχών αραβοσίτου

4.3.6.1 Σκοπός

Στόχος της διεργασίας ενζυμικής υδρόλυσης είναι η απελευθέρωση των μονομερών σακχάρων που αποτελούν τις αλυσίδες της κυτταρίνης και, δευτερευόντως, της ημικυτταρίνης. Το εμπορικό ενζυμικό σκεύασμα που χρησιμοποιήθηκε στην παρούσα εργασία, περιέχει ένζυμα που διασπούν το γλυκοζιτικό δεσμό στις αλυσίδες της κυτταρίνης (κυτταρινάσες) όσο και ένζυμα που διασπούν τις αλυσίδες της ημικυτταρίνης (ημικυτταρινάσες). Τα ζυμώσιμα σάκχαρα που απελευθερώνονται από την ενζυμική δράση στη συνέχεια ζυμώνονται αναερόβια για την παραγωγή αιθανόλης. Ωστόσο, καθώς στην παρούσα εργασία χρησιμοποιήθηκε ο μικροοργανισμός *Saccharomyces cerevisiae* που έχει τη δυνατότητα να ζυμώνει εξόζες αλλά όχι πεντόζες, ιδιαίτερη προσοχή δίνεται στις αποδόσεις της υδρόλυσης σε γλυκόζη, παρά σε λοιπά αναγωγικά σάκχαρα.

Η υδρόλυση της προκατεργασμένης βιομάζας μελετήθηκε σε τρεις άξονες. Αρχικά, για κάθε ένα από τα τέσσερα υλικά διεξήχθη μελέτη της συγκέντρωσης ενζύμου στην απόδοση σακχάρων (enzyme loading). Στη συνέχεια, μελετήθηκε η επίδραση της

συγκέντρωσης στερεών (ποσοστό βιομάζας στο μίγμα της αντίδρασης) στην απόδοση της διεργασίας. Τελικώς, έγινε συνολική σύγκριση της απόδοσης της υδρόλυσης στα τέσσερα διαφορετικά υλικά, ώστε να επιλεγούν αυτά με την καλύτερη συμπεριφορά για υδρόλυση και ζύμωση σε υψηλότερες συγκεντρώσεις βιομάζας (high gravity).

4.2.6.2 Υδρόλυση σε διαφορετικές συγκεντρώσεις ενζύμου (enzyme loading)

Πραγματοποιήθηκαν πειραματικές δοκιμές για την επίδραση της ενζυμικής υδρόλυσης σε κάθε δείγμα στελέχους αραβοσίτου. Η υδρόλυση πραγματοποιήθηκε με συγκέντρωση στερεών 10% και σε pH βέλτιστο για τη δράση των ενζύμων της υδρόλυσης (pH=5) που εξασφαλίστηκε από τη χρήση ρυθμιστικού διαλύματος (buffer) citric phosphate. Η σειρά αυτή πειραμάτων ήταν μικρής κλίμακας και έλαβε χώρα σε κωνικές φιάλες Erlenmeyer των 50mL, όπου τοποθετήθηκαν 0.5 g δείγματος βιομάζας και 5 mL ενζυμικού σκευάσματος καταλλήλως αραιωμένου για την επίτευξη της επιθυμητής ενεργότητας. Οι ενζυμικές συγκεντρώσεις που ελέγχθηκαν είναι: 6, 9, 12, 15 και 18 mg /g DM (ξηρής βιομάζας). Οι αραιώσεις που πραγματοποιήθηκαν στο ενζυμικό σκεύασμα ώστε να προκύψουν τα επιθυμητά ενζυμικά φορτία παρουσιάζονται στον παρακάτω πίνακα:

Πίνακας 4.4: Αραιώσεις ενζυμικού σκευάσματος Cellic CTec2 για την επίτευξη των επιθυμητών ενζυμικών φορτίων (enzyme loading)

| Ενζυμικό φορτίο (mg ενζ./g βιομάζας) | Όγκος Cellic CTec2 (mL) | Όγκος buffer citric phosphate (mL) |
|---|-------------------------|---------------------------------------|
| 18 | 0.2 | 9.8 |
| 15 | 0.1 | 5.9 |
| 12 | 0.1 | 7.4 |
| 9 | 0.1 | 9.9 |
| 6 | 0.1 | 11.9 |

Η διαδικασία ενέχει κίνδυνο μικροβιακής μόλυνσης των δειγμάτων, ειδικά στα αργότερα στάδια της όπου η συγκέντρωση σακχάρων είναι υψηλή, και η πιθανή ανάπτυξη των μικροοργανισμών στα υδρολύματα θα οδηγούσε σε μείωση της παρατηρούμενης συγκέντρωσης σακχάρων. Για το λόγο αυτό προστέθηκε αζίδιο του νατρίου (sodium azide) στο ρυθμιστικό διάλυμα που χρησιμοποιήθηκε σε συγκέντρωση 0,02% w/v. Το αζίδιο του νατρίου είναι τοξικό για τους οργανισμούς και δεν επιτρέπει την ανάπτυξη μικροοργανισμών ακόμα και σε μικρές συγκεντρώσεις. Σημειώνεται πως η χρήση του περιορίστηκε σε πειράματα αμιγώς ενζυμικής υδρόλυσης και όχι ζύμωσης, καθώς η παρουσία του σε υδρολύματα που οδηγούνται προς ζύμωση θα ήταν ανασταλτική για οποιαδήποτε ανάπτυξη και του ίδιου του ζυμομύκητα.

Η ενζυμική υδρόλυση πραγματοποιήθηκε για 72 ώρες, σε επωαστήρα με συνθήκες σταθερής θερμοκρασίας 50°C και υπό έντονη ανάδευση 180 rpm. Σε κάθε σειρά πειραμάτων ελήφθησαν δείγματα στις εξής χρονικές στιγμές, όπου χρόνος μηδέν

ορίζεται η στιγμή εισαγωγής της κωνικής φιάλης στον επωαστήρα: 2, 4, 6, 8, 24, 48, 72h. Η λήψη δειγμάτων πραγματοποιήθηκε ώστε το δείγμα να είναι όσο το δυνατόν πιο αντιπροσωπευτικό, καθώς το περιεχόμενο της φιάλης αναδευόταν καλά πριν την ανάμιξη και υπήρχε φροντίδα λήψης τόσο υγρού όσο και στερεού κλάσματος. Τα δείγματα στη συνέχεια φυγοκεντρήθηκαν ώστε να διαχωριστεί η υγρή φάση που περιείχε τα διαλυτά σάκχαρα και μέρος το υπερκείμενο υγρού αραιώθηκε σε απιονισμένο νερό. Η αραιώση ήταν κατάλληλη ώστε η συγκέντρωση των σακχάρων στο μετρούμενο δείγμα να εμπίπτει στη γραμμική περιοχή της καμπύλης αναφοράς, και προέκυψε 1:50 για τις μετρήσεις των 2h και 1:100 για τις λοιπές μετρήσεις σε όλα τα υλικά. Οι μετρήσεις σε κάθε περίπτωση πραγματοποιήθηκαν εις διπλούν.

4.3.6.3 Υδρόλυση σε διαφορετικές συγκεντρώσεις στερεών

Πραγματοποιήθηκε μελέτη της επίδρασης συγκέντρωσης στερεών (ποσοστό περιεχόμενης βιομάζας στο μίγμα της αντίδρασης) στην απόδοση της υδρόλυσης. Το πείραμα πραγματοποιήθηκε ενδεικτικά στο Δείγμα Β (0.2% H₂SO₄) που επέδειξε εν γένει καλύτερη συμπεριφορά στα πειράματα enzyme loading. Οι συγκεντρώσεις στερεών που επιλέχθηκαν ήταν 6%, 8%, 10% και 12% και οι υδρολύσεις πραγματοποιήθηκαν σε κωνικές φιάλες των 50 mL με την ίδια διαδικασία που περιγράφηκε προηγουμένως.

4.3.6.4 Υδρόλυση στελεχών αραβοσίτου σε υψηλές συγκεντρώσεις στερεών (high gravity) χρήσει free fall mixer

Προκειμένου ο διαχωρισμός της αιθανόλης από το τελικό μίγμα της ζύμωσης να είναι αποδοτικός, είναι απαραίτητο να ξεπεραστεί το όριο συγκέντρωσης αιθανόλης 4% σε αυτό. Λαμβάνοντας υπόψιν τη στοιχειομετρία μετατροπής γλυκόζης σε αιθανόλη και βιομάζας σε γλυκόζη, γίνεται κατανοητό πως η συγκέντρωση βιομάζας στο αρχικό μίγμα πρέπει να είναι υψηλή για να είναι εφικτό αυτό το σενάριο. Ωστόσο, η υψηλή συγκέντρωση στερεών στα συμβατικά συστήματα οδηγεί σε σοβαρά προβλήματα ανάδευσης, δυσχεραίνει τα φαινόμενα μεταφοράς και άρα και την πρόσβαση του ενζύμου στις αλυσίδες της κυτταρίνης.

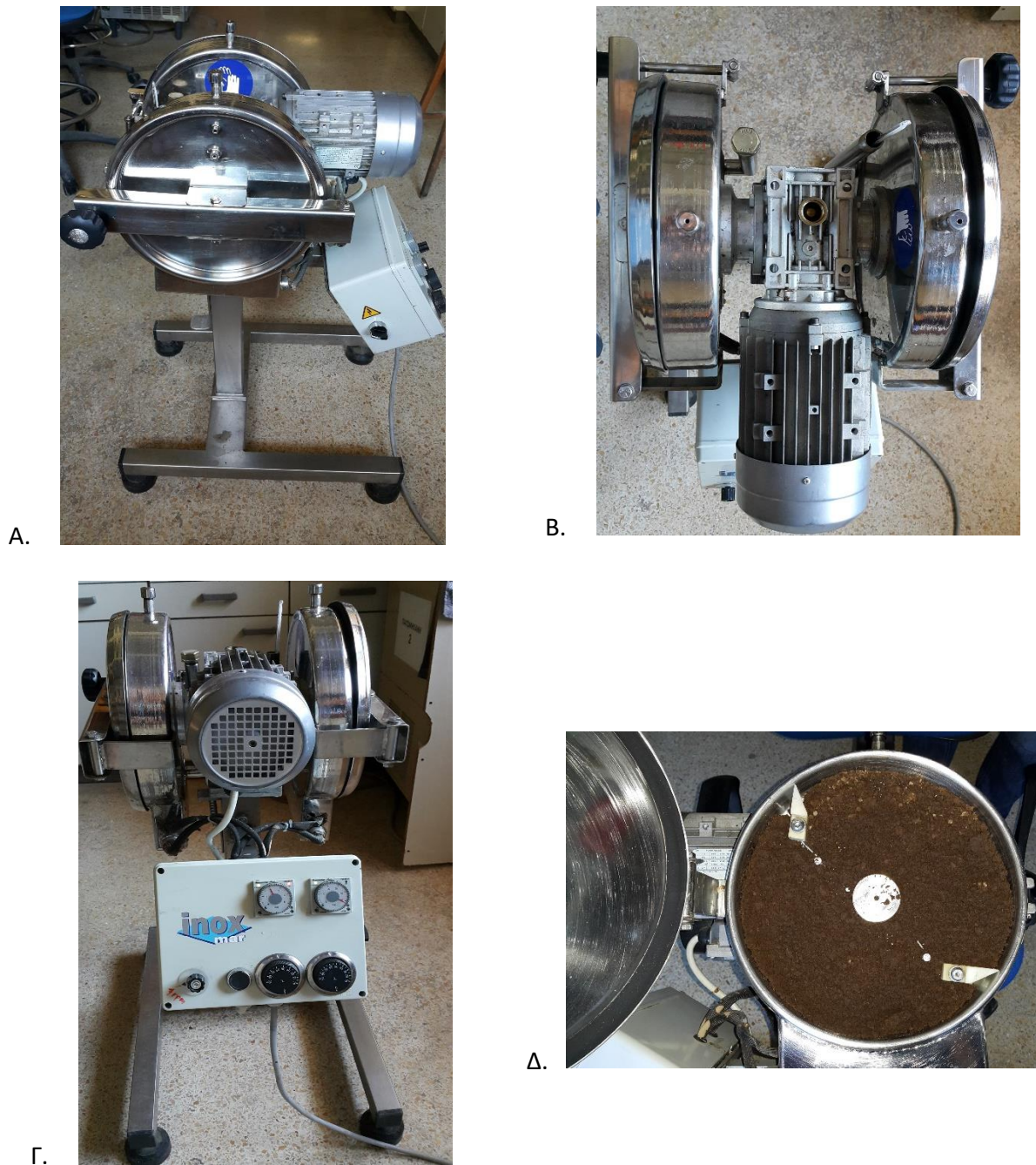
Το φαινόμενο αυτό μπορεί να ανασταλεί με τη χρήση εναλλακτικών μεθόδων ανάμιξης κατά την υδρόλυση, όπως τη χρήση αναδευτήρα ελεύθερης πτώσης (free falling mixer). Η συσκευή αυτή κατασκευάστηκε στο εργαστήριο Βιοτεχνολογίας και αποτελείται από δύο κάθετους κυλινδρικούς θαλάμους πλάτους 6 cm και διαμέτρου 25 cm με την ικανότητα ανάδευσης, μέσα στους οποίους τοποθετείται το μίγμα της υδρόλυσης. Η συσκευή διαθέτει δυνατότητα θερμοστάτησης των θαλάμων, μέσω της κυκλοφορίας θερμού ελαίου σε μανδύα που τους περιβάλλει. Επίσης, είναι δυνατή η ανάδευση σε δεξιόστροφη ή/και αριστερόστροφη φορά με σταθερό αριθμό στροφών που ορίζεται μέσω του πίνακα ελέγχου. Ο εργαστηριακός αναδευτήρας ελεύθερης πτώσης παρουσιάζεται στο Σχήμα 4.4. Απεικονίζεται πρόοψη, κάτοψη και πλάγια όψη της συσκευής, ενώ διακρίνονται ο ηλεκτροκινητήρας και ο πίνακας ελέγχου της συσκευής.

Η σακχαροποίηση του προκατεργασμένου στελέχους αραβοσίτου πραγματοποιήθηκε σε υψηλό αρχικό ποσοστό βιομάζας 24% (w/w) για τα δείγματα Β (0.2% H₂SO₄) και Δ (organosoln). Τα δείγματα αυτά επιλέχθηκαν να εξετασθούν σε συνθήκες υψηλών

συγκεντρώσεων, διότι είχαν παρουσιάσει καλύτερες αποδόσεις στα πειράματα μικρότερης κλίμακας. Επίσης, οι πειραματικές συνθήκες της υδρόλυσης high gravity ήταν οι βέλτιστες που είχαν προσδιορισθεί από τις λοιπές σειρές πειραμάτων για τα δύο αυτά υλικά.

Κατά την πειραματική διαδικασία της υδρόλυσης, η στερεά βιομάζα διαβράχθηκε με την απαιτούμενη ποσότητα αραιωμένου σε buffer ενζύμου και τοποθετήθηκε ποσοτικά στο θάλαμο υδρόλυσης. Η ταχύτητα ανάδευσης τέθηκε σε 7rpm και η φορά της εναλλασσόταν από δεξιόστροφη σε αριστερόστροφη ανά δύο λεπτά. Οι θάλαμοι της υδρόλυσης διατηρούνταν σε σταθερή θερμοκρασία 50°C μέσω του μανδύα στον οποίο κυκλοφορούσε έλαιο. Αν και μόνο ένας εκ των δύο θαλάμων χρησιμοποιούνταν για την υδρόλυση και οι δύο θερμαίνονταν, για λόγους σταθερότητας του συστήματος και αποφυγής έντονων αυξομειώσεων της θερμοκρασίας.

Το ενζυμικό φορτίο επιλέχθηκε 12 mg/g DM και 9 mg/g DM για τα δείγματα Β και Δ, αντίστοιχα και χρησιμοποιήθηκε ρυθμιστικό διάλυμα citric phosphate για τη διατήρηση του pH= (βέλτιστες συνθήκες). Ελήφθησαν δείγματα τόσο στις 12h όσο και στις 24h υδρόλυσης, τα οποία μεταφέρθηκαν σε κωνικές φιάλες προκειμένου να ζυμωθούν. Επίσης, ελήφθησαν δείγματα ανά χρονικά διαστήματα 2, 4, 6, 8, 12, 24h για τη μελέτη της ρευστοποίησης του μίγματος μέσω ιξωδομετρίας.



Σχήμα 4.4: Ο εργαστηριακός αναδευτήρας ελεύθερης πτώσης (free fall mixer). Πρόοψη (Α) , Κάτοψη (Β) και Πλάγια Όψη (Γ). Διακρίνονται οι δύο κυλινδρικοί θάλαμοι, ο ηλεκτροκινητήρας που παρέχει την ισχύ της ανάδευσης και ο πίνακας ελέγχου. Απεικονίζεται επίσης πληρωμένος κυλινδρικός θάλαμος κατά την έναρξη της υδρόλυσης (Δ).

4.3.7 Ζύμωση υδρολυμάτων στελεχών αραβοσίτου

4.3.7.1 Σκοπός

Ο σκοπός της μεθόδου είναι η αναερόβια παραγωγή αιθανόλης από στέλεχος του ζυμομύκητα *Saccharomyces cerevisiae*, με πηγή άνθρακα αποκλειστικά τα σάκχαρα που προέκυψαν από τη διεργασία ενζυμικής υδρόλυσης. Είναι επιθυμητή όσο το δυνατόν μεγαλύτερη συγκέντρωση αιθανόλης στο τελικό μίγμα, καθώς η επίτευξη υψηλής απόδοσης στη ζύμωση μειώνει το κόστος του διαχωρισμού και συμβάλλει στη μείωση του κόστους της συνολικής διεργασίας.

4.3.7.2 Ζύμωση υδρολυμάτων που προέκυψαν από υδρολύσεις χαμηλού αρχικού ποσοστού στερεών (10%)

Σε αρχικό στάδιο πραγματοποιήθηκαν πειράματα ζύμωσης σε υδρολύματα χαμηλότερης συγκέντρωσης σακχάρων, τα οποία είχαν προκύψει από υδρολύσεις χαμηλής συγκέντρωσης στερεών 10%, προκειμένου να μελετηθεί ενδεικτικά η απόδοση κάθε υλικού σε αιθανόλη σε αυτές τις συνθήκες. Η σειρά πειραμάτων στοχεύει στον προσδιορισμό των υλικών που εμφανίζουν την καλύτερη συμπεριφορά, προκειμένου να μελετηθούν σε μεγαλύτερη κλίμακα (μεγαλύτερες συγκεντρώσεις στερεών στα πειράματα υδρόλυσης).

Τα πειράματα έλαβαν χώρα σε κωνικές φιάλες Erlenmeyer των 50mL για όλα τα υλικά (Δείγματα Α-Δ). Σε αρχικό στάδιο, πραγματοποιήθηκε προϋδρόλυση στις κωνικές φιάλες με αρχικό ποσοστό στερεών 10%, και πιο συγκεκριμένα με ποσότητα βιομάζας 1.5 g και όγκο αραιωμένου κυτταρινολυτικού σκευάσματος 15mL. Για τα δείγματα προκατεργασίας με έκρηξη ατμού η προϋδρόλυση πραγματοποιήθηκε με ενζυμικό φορτίο 12mg ενζύμου/g DM, ενώ για το Δείγμα Δ (προκατεργασία organosolv) μελετήθηκαν τα ενζυμικά φορτία 9mg ενζύμου/g DM και 12mg ενζύμου/g DM. Η προϋδρόλυση διήρκεσε 12h και στο πέρας αυτής ελήφθη δείγμα για τη μέτρηση σακχάρων στο μίγμα της αντίδρασης.

Την προϋδρόλυση ακολούθησε εισαγωγή του στελέχους Ethanol Red® (Lesaffre, France), στις κωνικές φιάλες, με συγκέντρωση 15 mg/g DM. Η ζύγιση του ζυμομύκητα πραγματοποιήθηκε σε αναλυτικό ζυγό με μεγάλη ακρίβεια και η προσθήκη του έγινε με τέτοιο τρόπο ώστε να αποφευχθεί η προσκόλληση του στα τοιχώματα της κωνικής φιάλης. Ακολούθησε ήπια ανάδευση για την ομοιόμορφη διασπορά στο μίγμα της αντίδρασης. Οι χειρισμοί ήταν τέτοιοι ώστε να περιοριστεί η πιθανότητα μόλυνσης των καλλιεργειών από άλλους μικροοργανισμούς.

Η ζύμωση απαιτεί αναερόβιες συνθήκες για το λόγο αυτό οι φιάλες πωματίστηκαν, ενώ στο πώμα υπήρχε οπή για την απομάκρυνση του παραγόμενου CO₂ ώστε να μη δημιουργείται υπερπίεση στις φιάλες. Για λόγους αποφυγής μικροβιακών μόλυνσεων η οπή καλυπτόταν με βαμβάκι ώστε ο διερχόμενος αέρας να φιλτράρεται. Οι αναερόβιες συνθήκες εξασφαλίζονται και με την ήπια ανάδευση (80 rpm), ενώ η θερμοκρασία στον επωαστήρα τέθηκε στους 35°C (βέλτιστες συνθήκες για τη δράση του ζυμομύκητα). Δεν προστέθηκαν επιπλέον θρεπτικά στοιχεία στο μίγμα της αντίδρασης, ενώ το pH διατηρήθηκε στην τιμή pH=5, λόγω της παρουσίας ρυθμιστικού διαλύματος citric

phosphate. Στις κωνικές φιάλες παρέμεινε ποσότητα ενζύμου από την προϋδρόλυση, οπότε η παραγωγή σακχάρων συνεχιζόταν κατά τη διάρκεια της ζύμωσης. Μάλιστα, με την κατανάλωση των σακχάρων που είχαν παραχθεί κατά την προϋδρόλυση η παρεμπόδιση του κυτταρινολυτικού συστήματος από το προϊόν αναστέλλεται και ο ρυθμός παραγωγής σακχάρων αυξάνεται.

Η δειγματοληψία πραγματοποιήθηκε στις χρονικές στιγμές 8, 24, 48, 72, 96, 120h, όπου χρόνος μηδέν θεωρείται η στιγμή εισαγωγής του ζυμομύκητα στο μίγμα της αντίδρασης. Ελήφθησαν δείγματα όγκου 1.2 mL, ενώ μέσω ανάδευσης επιχειρήθηκε το δείγμα να είναι όσο το δυνατόν πιο αντιπροσωπευτικό. Τα πειράματα πραγματοποιήθηκαν εις διπλούν.

4.3.7.3 Ζύμωση υδρολυμάτων που προέκυψαν από υδρολύσεις υψηλού αρχικού ποσοστού στερεών (high gravity)

Το υδρόλυμα που προέκυψε από τη διαδικασία high gravity οδηγήθηκε προς ζύμωση σε κωνικές φιάλες των 100 mL. Μεταφέρθηκαν 25g μίγματος (slurry) από τον αναδευτήρα ελεύθερης πτώσης σε κωνικές φιάλες, μετά από υδρόλυση 12h (1^η σειρά κωνικών φιαλών) και μετά από υδρόλυση 24h (2^η σειρά κωνικών φιαλών). Για να ελεγχθεί η επίδραση που έχει η επιπλέον προσθήκη φρέσκου ενζυμικού διαλύματος, πραγματοποιήθηκαν δύο επιπλέον σειρές ζυμώσεων (για τις 12h και 24h προϋδρόλυσης), όπου στην αρχή της ζύμωσης προστέθηκε ποσότητα ενζυμικού διαλύματος ίση με 6mg ενζύμου/g στερεού. Η διαδικασία και συνθήκες της ζύμωσης ήταν παρόμοιες με αυτές που περιγράφηκαν παραπάνω.

4.3.8 Προσδιορισμός αιθανόλης με υγρή χρωματογραφία- HPLC

4.3.8.1 Σκοπός

Σκοπός της εφαρμογής υγρής χρωματογραφίας υψηλής πίεσης- HPLC είναι ο ποσοτικός προσδιορισμός της αιθανόλης στο προϊόν μίγμα της ζύμωσης.

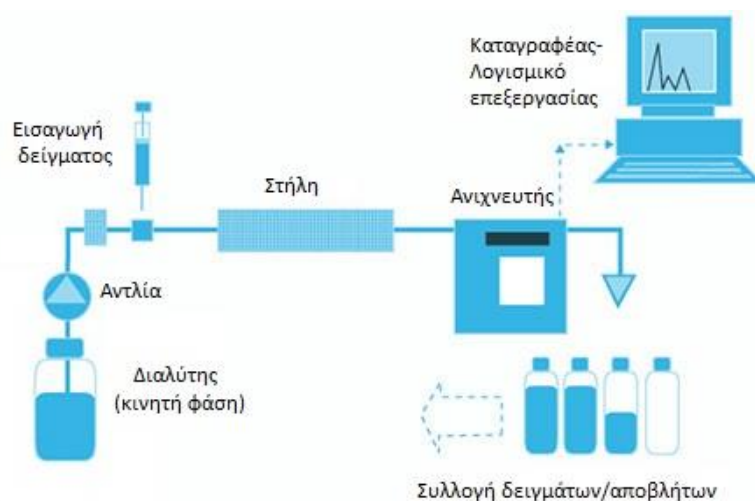
4.3.8.2 Οργανολογία και επιλογή συνθηκών

Σε όλους τους χρωματογραφικούς διαχωρισμούς το δείγμα κινείται στην κινητή φάση (διαλύτης έκλουσης) και εξαναγκάζεται να διέλθει μέσω μιας στατικής φάσης (στήλη). Οι δύο φάσεις επιλέγονται ώστε τα συστατικά της κινητής φάσης να κατανέμονται μεταξύ σταθερής και κινητής φάσης σε διαφορετικό βαθμό. Η επιτυχία ενός υγρού χρωματογραφικού διαχωρισμού εξαρτάται από τις αλληλεπιδράσεις μεταξύ δείγματος, σταθερής φάσης και διαλύτη έκλουσης. Η επιλογή της κατάλληλης κινητής φάσης γίνεται με βάση τη δύναμη (solvent strength) και την εκλεκτικότητα (selectivity) του διαλύτη. Όταν η κινητή φάση έχει σταθερή σύσταση η έκλυση είναι ισοκρατική, ενώ όταν μεταβάλλεται βαθμιαία η έκλυση είναι βαθμιδωτή.

Η υγρή χρωματογραφία υψηλής απόδοσης είναι η πιο διαδεδομένη αναλυτική τεχνική, λόγω της ευαισθησίας της, της εύκολης προσαρμογής σε ακριβείς ποσοτικούς προσδιορισμούς και της ευκολίας διαχωρισμού ευαίσθητων ενώσεων. Μια συσκευή χρωματογραφίας HPLC αποτελείται από το σύστημα παροχής κινητής φάσεως, το

σύστημα εισαγωγής δείγματος, τη στήλη, τον ανιχνευτή και τον καταγραφέα. Στο Σχήμα 4.5 απεικονίζεται παραστατικά το σύστημα HPLC, όπου διακρίνονται και τα βασικά του συστατικά στοιχεία.

Η συσκευή υγρής χρωματογραφίας υψηλής απόδοσης (HPLC) που χρησιμοποιήθηκε στην παρούσα εργασία αποτελείται από ένα πλήρως ολοκληρωμένο σύστημα παροχής διαλύτη (Shimadzu LC-20AD), σε συνδυασμό με ανιχνευτή δείκτη διάθλασης (Shimadzu RID 10A), αυτόματο δειγματολήπτη (Shimadzu SIL-20A) και σύστημα εισαγωγής δεδομένων στον υπολογιστή (LCsolution Έκδοση 1.24 SP1, Shimadzu).



Σχήμα 4.5: Σχηματική αναπαράσταση του συστήματος HPLC. Διακρίνονται τα βασικά του συστατικά στοιχεία: σύστημα παροχής κινητής φάσεως, σύστημα εισαγωγής δείγματος, στήλη, ανιχνευτής και καταγραφέας (προσαρμοσμένο, Merck Millipore)

Για την ανάλυση χρησιμοποιήθηκε στήλη χρωματογραφίας Aminex HPX-87H (Bio-Rad, 300x7.8 mm, μέγεθος σωματιδίων 9 μm) ενώ πριν την αναλυτική στήλη παρεμβάλλοταν μικρή προστατευτική στήλη (προ-στήλη) για να αυξήσει το χρόνο ζωής της, απομακρύνοντας τα αιωρούμενα σωματίδια, τις προσμίξεις από το διαλύτη και τα συστατικά του δείγματος που συνδέονται με αντιστρεπτά με τη στατική φάση. Η κινητή φάση ήταν 5 mM θειικό οξύ σε απαερωμένο νερό υψηλής καθαρότητας (Millipore). Ο συνδυασμός αυτός σταθερής και κινητής φάσης επιλέχθηκε διότι οδηγεί στον αποτελεσματικό διαχωρισμό της αιθανόλης από τα λοιπά συστατικά του μίγματος και στην εμφάνιση καθαρής κορυφής στο εικοστό περίπου λεπτό της ανάλυσης.

Για την παρασκευή του διαλύτη 5mM H₂SO₄ αραιώθηκε πυκνό θειικό οξύ σε νερό με μεγάλη ακρίβεια υπό ζύγιση. Το διάλυμα αναδεύτηκε επαρκώς και στη συνέχεια απαερώθηκε σε συσκευή υπερήχων σε υψηλή συχνότητα για 60min. Η απαέρωση είναι απαραίτητη για να αποφευχθεί η εισαγωγή φυσαλίδων στο σύστημα. Οι φυσαλίδες αέρα προκαλούν διεύρυνση των κορυφών, εμποδίζουν τη σωστή λειτουργία του ανιχνευτή και οδηγούν σε απότομες πτώσεις πίεσης στο σύστημα. Τα δείγματα προετοιμάστηκαν για ανάλυση και υπέστησαν φιλτράρισμα με φίλτρο σύριγγας 0.45μm (Olim Peak Teknokroma Syringe Filter, Ισπανία).

Όσον αφορά στις συνθήκες λειτουργίας, η ταχύτητα της κινητής φάσης ήταν σταθερή 0.6 mL/min και η θερμοκρασία της στήλης διατηρήθηκε στους 40°C μέσω θαλάμου θέρμανσης στήλης (Merck Millipore, Darmstadt, Γερμανία). Ο όγκος δειγματοληψίας ήταν 50 μ L και ο χρόνος ανάλυσης δείγματος τέθηκε στα 30min, ώστε να δοθεί αρκετός χρόνος για την έκλυση της αιθανόλης στα 20 περίπου λεπτά ανάλυσης. Το πρώτο δείγμα που αναλύθηκε σε κάθε περίπτωση ήταν υπερκάθαρο νερό, για την εξασφάλιση του καθαρισμού της στήλης, ενώ αναλύθηκαν και πρότυπα δείγματα γνωστής συγκέντρωσης αιθανόλης για τον έλεγχο βαθμονόμησης του οργάνου.

4.3.9 Μέτρηση ιξώδους υδρολυμάτων

4.3.9.1. Σκοπός

Η καταλληλότητα του ενζυμικού κυτταρινολυτικού σκευάσματος σε συνδυασμό με τον αναδευτήρα ελεύθερης πτώσης για την υδρόλυση της βιομάζας μπορεί να συνδεθεί με τη μείωση του ιξώδους του μίγματος. Καθώς η βιομάζα αποδομείται, το ιξώδες μειώνεται και επέρχεται ρευστοποίηση στο σύστημα, που διευκολύνει ακόμα περισσότερο την υδρόλυση λόγω της καλύτερης ανάμιξης. Έτσι, οι ρεολογικές ιδιότητες του υδρολύματος προσδιορίζονται με ιξωδομετρία, ως ενδεικτικές της έκτασης της υδρόλυσης.

4.3.9.2 Ιξωδομετρία

Κατά την υδρόλυση σε υψηλές συγκεντρώσεις στερεών (high gravity) ελήφθησαν δείγματα για τον προσδιορισμό των ρεολογικών ιδιοτήτων στις 2, 4, 6, 8, 12 και 24h. Το ιξώδες των υδρολυμάτων μετρήθηκε με το ροόμετρο Anton Paar Physica MCR (Anton Paar GmbH, Styria, Austria) που χρησιμοποιεί σύστημα παράλληλων πλακών. Οι μετρήσεις ελήφθησαν στους 25°C με γωνιακές ταχύτητες ατράκτου από 10 ως 100 rad/s, ενώ η δύναμη των παράλληλων πλακών τέθηκε στα 0N.

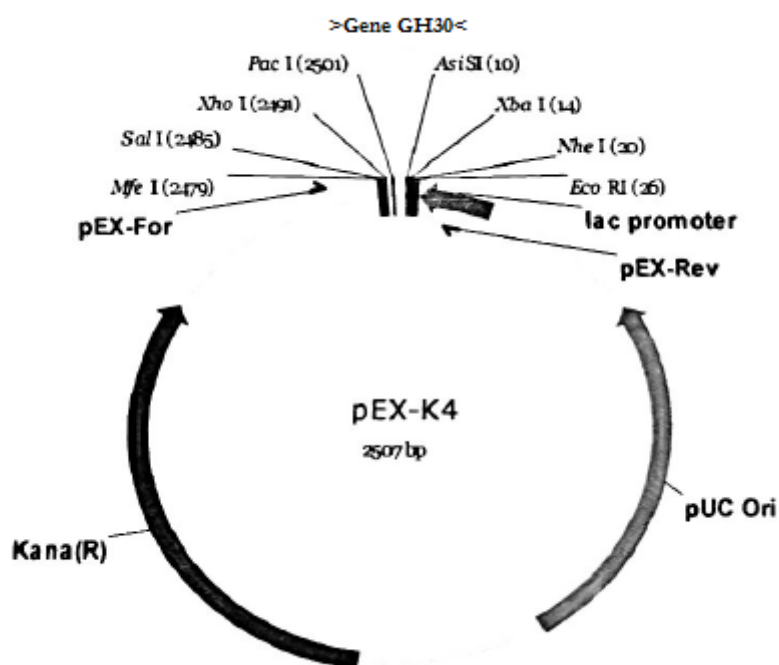
4.3.10 Έκφραση γονιδίου *Myceliophthora thermophila* οικογένειας GH30 για την παραγωγή καινοτόμου βιοκαταλύτη

4.3.10.1 Σκοπός

Σκοπός του πειράματος είναι ο πολλαπλασιασμός και η έκφραση γονιδίου του μικροοργανισμού *Myceliophthora thermophila*, το οποίο κωδικοποιεί ένζυμο της οικογένειας GH30 (CAZy). Σύμφωνα με βιοπληροφορικά εργαλεία, το γονίδιο ενδέχεται να κωδικοποιεί ένζυμο με ξυλανολυτική δράση (putative xylanase). Επιδιώκεται ο πολλαπλασιασμός του γονιδίου σε ξενιστή *Pichia pastoris*, μικροοργανισμό κατάλληλο για την έκφραση του γονιδίου, αφού διαθέτει τη δυνατότητα μετα-μεταφραστικών τροποποιήσεων. Μετά τον αποτελεσματικό πολλαπλασιασμό και έκφραση του γονιδίου ακολουθεί εκτίμηση της ενζυμικής δράσης, για να διαπιστωθεί αν το ένζυμο διαθέτει όντως ξυλανολυτική δράση. Το επόμενο βήμα μετά την εξασφάλιση της ξυλανολυτικής δράσης θα ήταν ο χαρακτηρισμός του ενζύμου και η εκτίμηση της συνεργιστικής δράσης του στην υδρόλυση της βιομάζας.

4.3.10.2 Τεχνητή σύνθεση γονιδίου

Το γονίδιο παρασκευάστηκε συνθετικά από την εταιρεία Eurofins Scientific (Λουξεμβούργο) βάσει της γνωστής ακολουθίας. Από το γονίδιο του wild type μικροοργανισμού αφαιρέθηκαν τα ιντρόνια προκειμένου να περιοριστούν οι πιθανότητες κωδικοποίησης λανθασμένης πρωτεΐνης από το μικροοργανισμό ξενιστή και έγινε βελτιστοποίηση κωδικονίων (codon optimization) για να ενισχυθεί η έκφραση στον ξενιστή. Το συνθετικό γονίδιο έχει μήκος 1386 bp και εμπεριέχεται στο πλασμίδιο pEX-K4. Το πλασμίδιο pEX-K4 περιέχει δύο θέσεις δράσης των περιοριστικών ενζύμων *Cla*I και *Xba*I, καθώς και γονίδιο αντίστασης στην καναμικίνη (kanamycin). Παρακάτω παρουσιάζεται ο χάρτης του πλασμιδίου pEX-K4 (Σχήμα 4.6). Το πλασμίδιο που περιέχει το συνθετικό γονίδιο ήταν λυοφιλιωμένο, ενώ η ποσότητά του ήταν 3.6 μg. Επαναδιαλύθηκε σε 20μL υπερκάθαρου νερού προκειμένου να αξιοποιηθεί στα επόμενα στάδια του πειράματος.



Σχήμα 4.6: Χάρτης πλασμιδίου pEX-K4 (φορέα συνθετικού γονιδίου) (Eurofins)

4.3.10.3 Μετασηματισμός κυττάρων *Escherichia coli* TOP10 για τον πολλαπλασιασμό του πλασμιδίου φορέα του συνθετικού γονιδίου

Μετασηματισμός κυττάρων (Cell Transformation)

Ο μετασηματισμός των κυττάρων- ξενιστών στελέχους *E. coli* TOP10 πραγματοποιήθηκε με τη μέθοδο του θερμικού σοκ (heat shock). Τα κύτταρα TOP10 είχαν ήδη καταστεί επιδεκτικά (heat shock competent), μέσω κατεργασίας με CaCl_2 .

Για το μετασηματισμό με τη μέθοδο του θερμικού σοκ αναμείχθηκαν 1μL διαλύματος πλασμιδίου pEX-K4 (φορέας συνθετικού γονιδίου) και 100μL stock κυττάρων TOP10 σε

σωληνάριο Errendorf και τοποθετήθηκαν σε παγόλουτρο για 30min. Στη συνέχεια, το μίγμα εκτέθηκε για 90s σε θερμοκρασία 42°C και επανήλθε στο παγόλουτρο για 5min ώστε να ψυχθεί. Η απότομη μεταβολή θερμοκρασίας συντελεί στην εισαγωγή του πλασμιδίου στα κύτταρα. Στο μίγμα προστέθηκαν 200μL θρεπτικού μέσου LB και ακολούθησε επώαση στους 37°C για 1h. Η αρχική αυτή επώαση σε θρεπτικό μέσο που στερείται αντιβιοτικού επιτρέπει στα κύτταρα TOP10, τα οποία έχουν καταπονηθεί κατά το θερμικό σοκ, να αναπτυχθούν πριν τη μεταφορά τους σε στερεές καλλιέργειες. Μετά το πέρας της επώασης, το μίγμα μεταφέρθηκε σε δύο τρυβλία LB-καναμικίνης (100μL και 200μL, αντίστοιχα), ώστε να αναπτυχθούν σε αυτά μόνο τα κύτταρα εκείνα που είχαν προσλάβει το πλασμίδιο.

Μετά την ανάπτυξη των αποικιών επιλέχθηκαν ορισμένες εξ αυτών και εμβολιάστηκαν υγρές καλλιέργειες, οι οποίες επώαστηκαν overnight (12-18h). Από τα κύτταρα των υγρών καλλιεργειών απομονώθηκε το πλασμίδιο pEX-K4, χρησιμοποιώντας το GenElute Plasmid Miniprep Kit (Sigma-Aldrich).

Απομόνωση πλασμιδίου (Plasmid DNA Purification)

Ακολουθήθηκε η μέθοδος απομόνωσης και καθαρισμού πλασμιδίου του τυποποιημένου πακέτου GenElute Plasmid Miniprep Kit. Σύμφωνα με αυτό, οι υγρές καλλιέργειες φυγοκεντρήθηκαν και αποχύθηκε το υπερκείμενο υγρό (θρεπτικό υλικό). Τα κύτταρα επαναδιαλύθηκαν σε 250 μL ρυθμιστικού διαλύματος (A1+RNase), ενώ ακολούθησε προσθήκη 250μL ρυθμιστικού διαλύματος λύσης των κυττάρων (A2). Το μίγμα επώαστηκε για 5min σε θερμοκρασία δωματίου (25°C) ώστε να ολοκληρωθεί η λύση των βακτηρίων. Η δράση αναστάληκε με την προσθήκη 300μL ρυθμιστικού διαλύματος εξουδετέρωσης (A3). Ακολούθησε φυγοκέντρηση και απόρριψη του ιζήματος (τμήματα κυττάρων), ενώ το υγρό κλάσμα (στο οποίο είναι διαλυμένο το DNA) μεταφέρθηκε σε στήλη φιλτραρίσματος. Το DNA προσδένεται στη στήλη, καθώς το υγρό διέρχεται μέσα σε αυτή και απομακρύνεται μέσω φυγοκέντρησης. Η στήλη εκπλύθηκε με τη διαδοχική προσθήκη 500μL ρυθμιστικού διαλύματος AW και 600μL ρυθμιστικού διαλύματος A4, ώστε να απομακρυνθούν όλες οι ουσίες εκτός του πλασμιδιακού DNA από τη στήλη. Η στήλη ξηράνθηκε με φυγοκέντρηση σε υψηλές στροφές για την απομάκρυνση υπολειμμάτων ρυθμιστικών διαλυμάτων. Τελικά το DNA εκλούθηκε από τη στήλη χρήσει 30 μL διαλύματος έκλουσης (AE).

4.3.10.4 Επεξεργασία πλασμιδίου φορέα και συνθετικού γονιδίου με περιοριστικά ένζυμα και ανασυνδυασμός (DNA ligation)

Επεξεργασία με περιοριστικά ένζυμα-πέψη (Digestion)

Κατά το σχεδιασμό της ακολουθίας του συνθετικού γονιδίου έχουν προβλεφθεί θέσεις δράσης των περιοριστικών ενζύμων *ClaI* και *XbaI* εκατέρωθεν της αλληλουχίας που κωδικοποιεί το ένζυμο. Τα ίδια περιοριστικά ένζυμα δρουν στο πλασμίδιο pPICZαC που θα χρησιμοποιηθεί για τον ανασυνδυασμό. Με τον τρόπο αυτό, πλασμίδιο φορέας (pPICZαC) και γονίδιο αποκτούν κολλώδη άκρα ("sticky ends") λόγω της δράσης των

περιοριστικών ενζύμων και στη συνέχεια ενώνονται με τη δράση της λιγάσης (DNA ligase).

Η διαδικασία που ακολουθήθηκε για την πέψη γονιδίου και πλασμιδίου φορέα παρουσιάζεται παρακάτω. Για το πλασμίδιο, σε σωληνάριο Eppendorf αναμίχθηκαν 15 μL pPICZαC, 3 μL ρυθμιστικού διαλύματος- buffer M (10x), 1.5 μL περιοριστικού ενζύμου *Cla*I, 1.5 μL περιοριστικού ενζύμου *Xba*I και 9 μL υπερκάθαρου νερού. Για το γονίδιο, σε διαφορετικό σωληνάριο αναμίχθηκαν 15 μL pEX-K4, 3 μL ρυθμιστικού διαλύματος- buffer M (10x), 1.5 μL περιοριστικού ενζύμου *Cla*I, 1.5 μL περιοριστικού ενζύμου *Xba*I και 9 μL υπερκάθαρου νερού. Τα μίγματα τοποθετήθηκαν στους 37°C για 4h, ενώ στις 2h προστέθηκε επιπλέον ποσότητα 1μL από κάθε περιοριστικό ένζυμο σε κάθε σωληνάριο.

Ηλεκτροφόρηση σε πηκτή αγαρόζης (DNA Electrophoresis)

Για τον έλεγχο της αποτελεσματικότητας της ενζυμικής πέψης γονιδίου και πλασμιδίου χρησιμοποιήθηκε η τεχνική ηλεκτροφόρησης DNA σε πηκτή αγαρόζης. Η τεχνική έχει στόχο τον διαχωρισμό μορίων DNA με βάση το μέγεθος τους, και αξιοποιήθηκε στην παρούσα εργασία τόσο για διαγνωστικούς σκοπούς (ανίχνευση της αποτελεσματικότητας της επεξεργασίας με περιοριστικά ένζυμα, αξιολόγηση των αποτελεσμάτων της αντίδρασης λιγάσης) όσο και για διαχωρισμό (μέθοδος Gel Extraction).

Η πηκτή αγαρόζης παρασκευάστηκε με την προσθήκη αγαρόζης (1%) και βρωμιούχου αιθιδίου (Ethidium Bromide, 1 mg/ml) σε ρυθμιστικό διάλυμα TBE. Η διάλυση της αγαρόζης στο ρυθμιστικό διάλυμα και η θέρμανση του μίγματος οδηγεί σε ζελατινοποίηση και πήξη. Σχηματίζεται έτσι ένα δίκτυο πηκτής μέσα από το οποίο είναι δυνατό να διέλθουν και να διαχωριστούν βάσει του μεγέθους τα μόρια του DNA. Η προσθήκη του βρωμιούχου αιθιδίου γίνεται προκειμένου να επιτευχθεί η ανίχνευση των μορίων DNA υπό υπεριώδη φωτισμό. Το βρωμιούχο αιθίδιο προσδένεται σε δίκλινα νουκλεϊκά οξέα, καταλαμβάνοντας τον χώρο μεταξύ δυο διαδοχικών ζευγών βάσεων και εμφανίζει φθορισμό υπό την υπεριώδη ακτινοβολία.

Η πήξη του μίγματος έλαβε χώρα στη διάταξη της ηλεκτροφόρησης με προσθήκη ειδικών φραγμάτων που αποτρέπουν την άμεση επαφή της πηκτής με τα ηλεκτρόδια και με προσθήκη τμήματος- μήτρας για το σχηματισμό εσοχών στην πηκτή. Οι εσοχές (wells) χρησιμοποιούνται για την τοποθέτηση των δειγμάτων στην πηκτή. Με το πέρας της πήξης, τα φράγματα αφαιρέθηκαν και η πηκτή καλύφθηκε με ρυθμιστικό διάλυμα TBE ώστε να κλείσει το ηλεκτροφορητικό κύκλωμα.

Η προετοιμασία των δειγμάτων πραγματοποιήθηκε με ανάμειξη δείγματος DNA με διάλυμα φόρτωσης (loading buffer, 10x). Το διάλυμα φόρτωσης περιέχει γλυκερόλη (που συμβάλει στην καταβύθιση του δείγματος στην υποδοχή λόγω της μεγαλύτερης πυκνότητάς της), βαφή BPB, BromoPhenol Blue (που λειτουργεί ως ένδειξη της προόδου της ηλεκτροφόρησης) και SDS (που λειτουργεί αποδιατακτικά στις πρωτεΐνες, εμποδίζοντας τυχόν περιέλιξη αυτών με το DNA). Τα δείγματα τοποθετήθηκαν στις ειδικές υποδοχές συνοδεία ενός πρότυπου δείγματος αναφοράς (Ladder) που περιείχε

τμήματα DNA γνωστού μήκους. Εφαρμόστηκαν συνθήκες 190mA και 60V, και με το πέρας της ηλεκτροφόρησης η πηκτή τοποθετήθηκε υπό υπεριώδη φωτισμό και φωτογραφήθηκε.

Για την εκτίμηση της αποτελεσματικότητας της πέψης του πλασμιδίου pPICZαC, επιζητήθηκε η εμφάνιση ζώνης DNA στο ύψος που αντιστοιχεί στο κομμένο πλασμίδιο. Αντίστοιχα, για την εκτίμηση της επιτυχίας της πέψης του γονιδίου (pEX-K4/GH30), επιζητείται η εμφάνιση έντονης φθορίζουσας λωρίδας στο ύψος που αντιστοιχεί στο γονίδιο (1386 bp) και στο ύψος που αντιστοιχεί στο κομμένο πλασμίδιο pEX-K4.

Καθαρισμός πλασμιδίου και γονιδίου (Gel Extraction & PCR CleanUp)

Με τον τερματισμό της αντίδρασης πέψης, το πλασμίδιο pPICZαC και ο γονίδιο GH30 καθαρίστηκαν με τεχνικές PCR-clean up και Gel Extraction, αντίστοιχα, χρήση του τυποποιημένου πακέτου GenElute Gel Extraction Kit (Sigma-Aldrich). Σύμφωνα με τη μέθοδο Gel Extraction του τυποποιημένου πακέτου, αρχικά αποκόπηκε από την πηκτή αгарόζης η περιοχή όπου βρισκόταν το γονίδιο μετά το πέρας της ηλεκτροφόρησης. Η πηκτή μεταφέρθηκε σε προζυγισμένα σωληνάρια Eppendorf και επαναζυγίστηκε. Στη συνέχεια, προστέθηκε ρυθμιστικό διάλυμα (NT1), με αναλογία 200μL διαλύματος ανά 100μL δείγματος πηκτής προς καθαρισμό, θεωρώντας την πυκνότητα της πηκτής ίση με του νερού. Το μίγμα θερμάνθηκε μέχρι την τήξη της πηκτής και μεταφέρθηκε σε στήλη φιλτραρίσματος ώστε να προσδεθεί το DNA σε αυτήν. Ακολουθήσε φυγοκέντρηση και απόρριψη του υγρού κλάσματος, ενώ η στήλη εκπλύθηκε με 700μL ρυθμιστικού διαλύματος καθαρισμού (NT3). Μετά την απόρριψη του διαλύματος καθαρισμού η στήλη ξηράνθηκε με φυγοκέντρηση για 1min. Τέλος, πραγματοποιήθηκε έκλουση του DNA σε 30μL ρυθμιστικού διαλύματος έκλουσης.

Παρόμοια είναι η διαδικασία PCR cleanup που ακολουθήθηκε για τον καθαρισμό του πλασμιδίου. Τα στάδια του καθαρισμού είναι τα ίδια με τον καθαρισμό Gel Extraction, με τη διαφορά ότι το μίγμα μεταφέρεται απευθείας στη στήλη φιλτραρίσματος χωρίς να απαιτείται τήξη του gel αгарόζης. Το πρωτόκολλο PCR cleanup είναι πιο απλό και σύντομο, δεν ενδείκνυται, όμως, για την περίπτωση καθαρισμού του γονιδίου. Είναι απαραίτητη η ηλεκτροφόρηση DNA για να απομονωθεί το γονίδιο από το φορέα κλωνοποίησης από όπου έχει αποκοπεί (pEX-K4).

Αντίδραση Λιγάσης (DNA Ligation)

Μετά τον καθαρισμό του πλασμιδίου-φορέα και του γονιδίου που επεξεργάστηκαν με περιοριστικά ένζυμα, ακολουθεί η αντίδραση λιγάσης που στοχεύει στην ένωση των δύο αυτών τμημάτων DNA.

Η αντίδραση λιγάσης πραγματοποιήθηκε σε τρεις διαφορετικές αναλογίες (A-C) πλασμιδίου φορέα (vector) και γονιδίου (insert), προκειμένου να εξασφαλιστεί η εμφάνιση ικανοποιητικού αριθμού αποικιών στα επόμενα στάδια της μεθόδου. Η αντίδραση καταλύθηκε χρήση του ενζύμου T4 DNA ligase (λιγάση) στους 16°C για 4h.

Παρασκευάσθηκαν επίσης, δύο μίγματα ελέγχου (control), τα οποία δεν περιείχαν γονίδιο (D) και γονίδιο και λιγάση (E). Στον Πίνακα 4.5 εμφανίζεται η σύσταση των μιγμάτων που παρασκευάστηκαν.

Πίνακας 4.5: Σύσταση των μιγμάτων αντίδρασης λιγάσης (A-E). Παρουσιάζονται τα δείγματα αντίδρασης (A-C) και τα δείγματα control (D,E)

| | A (1:3) | B (1:5) | C (1:7) | D (control) | E (control) |
|----------------------------|----------------|----------------|----------------|--------------------|--------------------|
| H ₂ O | 13 μL | 11 μL | 9 μL | 16 μL | 17 μL |
| Buffer 10x | 2 μL | 2 μL | 2 μL | 2 μL | 2 μL |
| Πλασμίδιο pPICZαC (vector) | 1 μL | 1 μL | 1 μL | 1 μL | 1 μL |
| Γονίδιο GH30 (insert) | 3 μL | 5 μL | 7 μL | - | - |
| T4 DNA Ligase | 1 μL | 1 μL | 1 μL | 1 μL | - |
| Ολικός όγκος | 20 μL | 20 μL | 20 μL | 20 μL | 20 μL |

Μετά το πέρας της αντίδρασης λιγάσης, ακολούθησε μετασχηματισμός κυττάρων TOP10 με το εκάστοτε μίγμα της αντίδρασης (A-E). Ο μετασχηματισμός πραγματοποιήθηκε με τη μέθοδο του θερμικού σοκ. Τα κύτταρα μεταφέρθηκαν στη συνέχεια σε τρυβλία Low Salt LB+ Zeocin, ώστε να αναπτυχθούν σε αυτά μόνο τα κύτταρα που έλαβαν το πλασμίδιο pPICZαC (ανασυνδυασμένο ή μη) και διαθέτουν αντίσταση στο αντιβιοτικό. Πραγματοποιήθηκαν δύο επαναλήψεις για κάθε δείγμα (διπλός αριθμός τρυβλίων) και τα τρυβλία αφέθηκαν να επωαστούν στους 37°C overnight (16h).

Από τις αποικίες που αναπτύχθηκαν στα τρυβλία A-C επιλέχθηκαν τυχαία 10, σημειώθηκαν και χρησιμοποιήθηκαν για εμβολιασμό υγρών καλλιέργειών Low Salt LB+ Zeocin. Κάθε υγρή καλλιέργεια αντιστοιχούσε σε μία αποικία, και όλες οι καλλιέργειες επώαστηκαν στους 37°C overnight (16h). Ακολούθησε φυγοκέντρηση των καλλιέργειών, απόχυση του υγρού κλάσματος και απομόνωση του πλασμιδίου από κάθε καλλιέργεια με το τυποποιημένο πακέτο GenElute Gel Extraction Kit.

Τέλος, πραγματοποιήθηκε ανάλυση ώστε να διαπιστωθεί ποιες από τις αποικίες που επιλέχθηκαν διέθεταν το ανασυνδυασμένο πλασμίδιο (restriction analysis). Η ανάλυση έγινε με τη χρήση των ίδιων περιοριστικών ενζύμων που χρησιμοποιήθηκαν κατά την πέψη πλασμιδίου και γονιδίου (*Xba*I, *Cla*I) και οι αναλογίες της αντίδρασης που χρησιμοποιήθηκαν ήταν: 11μL H₂O, 5 μL δείγματος πλασμιδίου, 1 μL *Xba*I, 1μL *Cla*I, 2 μL buffer 10x (τελικός όγκος 20 μL). Ακολούθησε ηλεκτροφόρηση αγαρόζης για κάθε δείγμα, ώστε να διαπιστωθεί ποιες από τις αποικίες που επιλέχθηκαν διέθεταν το ανασυνδυασμένο πλασμίδιο, μέσω της εμφάνισης ζωνών στις κατάλληλες περιοχές.

Ο προσδιορισμός της αποικίας/ των αποικιών που διαθέτουν το ανασυνδυασμένο πλασμίδιο ακολουθείται από εμβολιασμό νέων υγρών καλλιιεργειών από αυτή/αυτές, με στόχο την παραγωγή του πλασμιδίου σε μεγάλες ποσότητες. Το ανασυνδυασμένο πλασμίδιο απομονώθηκε, καθαρίστηκε και αποθηκεύτηκε.

4.3.10.5 Μετασηματισμός κυττάρων *Pichia pastoris*

Την εξακρίβωση της επιτυχίας του πολλαπλασιασμού του επιθυμητού πλασμιδίου ακολούθησε ο τελικός μετασηματισμός με ηλεκτροδιάτρηση (electroporation) σε κύτταρα *P. pastoris*. Προϋπόθεση για την επιτυχία του μετασηματισμού είναι η γραμμικοποίηση (linearization) του πλασμιδίου, ώστε αυτό να εισέλθει με μεγαλύτερη ευκολία εντός του κυττάρου. Το γραμμικοποιημένο πλασμίδιο έχει μεγαλύτερες πιθανότητες να παραληφθεί από τα κύτταρα και να ενσωματωθεί στο γονιδίωμα της *P. pastoris*.

Η γραμμικοποίηση πραγματοποιήθηκε με το ένζυμο *SacI*, το οποίο επιλέχθηκε διότι διαπιστώθηκε ότι δε δρα περιοριστικά σε ακολουθία εντός του γονιδίου GH30, ούτε τέμνει σε περιοχή που επηρεάζει τις λειτουργικές περιοχές του πλασμιδίου. Η αντίδραση έλαβε χώρα στους 37°C για 4h και οι αναλογίες που χρησιμοποιήθηκαν είναι: 25μL ανασυνδυασμένου πλασμιδίου, 10 μL buffer 10x, 5 μL *SacI* και 60 μL H₂O (τελικός όγκος 100μL). Ο έλεγχος της επιτυχίας της γραμμικοποίησης πραγματοποιήθηκε με ηλεκτροφόρηση πηκτής αγαρόζης και για τον καθαρισμό του γραμμικοποιημένου πλασμιδίου χρησιμοποιήθηκε η μέθοδος PCR cleanup.

Η ηλεκτροδιάτρηση των κυττάρων πραγματοποιήθηκε σε κυψελίδα με αγώγιμα τοιχώματα σε συσκευή που εφαρμόζει παλμούς ρεύματος συγκεκριμένης τάσης για μικρά χρονικά διαστήματα. Το μίγμα που τοποθετήθηκε στην κυψελίδα αποτελούνταν από 30 μL διαλύματος γραμμικοποιημένου πλασμιδίου και 80 μL κυττάρων *P. pastoris* X33, δεκτικών στην ηλεκτροδιάτρηση (competent). Ο παλμός είχε τάση 2 kV και εφαρμόστηκε για 4 ms. Με τον τερματισμό του παλμού προστέθηκε άμεσα 1 mL διαλύματος σορβιτόλης στην κυψελίδα και τα κύτταρα μεταφέρθηκαν και επωάστηκαν στους 30°C για 2h. Η άμεση προσθήκη του θρεπτικού μέσου στοχεύει στην ενίσχυση των κυττάρων που έχουν καταπονηθεί από την ηλεκτροδιάτρηση, ώστε να επιβιώσουν. Τέλος, εμβολιάστηκαν τρυβλία YPDS + Zeocin, στα οποία έχουν τη δυνατότητα ανάπτυξης μόνο τα κύτταρα εκείνα που έχουν προσλάβει το ανασυνδυασμένο πλασμίδιο, και επωάστηκαν στους 30°C overnight (12-18h).

4.3.10.6 Έλεγχος ενεργότητας παραγόμενου ενζύμου (Plate Assay)

Προκειμένου να επιλεχθούν οι αποικίες εκείνες που είναι ικανές για την παραγωγή του ενζύμου σε ικανοποιητικές ενεργότητες πραγματοποιήθηκε έλεγχος σε κατάλληλο τρυβλίο (Plate Assay). Το τρυβλίο ελέγχου περιείχε θρεπτικά συστατικά για την ανάπτυξη της *P. pastoris*, μεθανόλη για την επαγωγή της έκφρασης του ενζύμου και ξυλάνη για την παρατήρηση της ενεργότητας του ενζύμου. Ελέγχθηκαν τρία διαφορετικά υποστρώματα: αραβινοξυλάνη, ξυλάνη από σημύδα (birchwood xylane) και ξυλάνη από βρώμη (oat

spelt xylane). Παρατηρείται θετικό αποτέλεσμα στο τρυβλίο ελέγχου σε περίπτωση που η έκφραση του ενζύμου έχει πραγματοποιηθεί επιτυχώς και το ένζυμο παρουσιάζει όντως ξυλανολυτική δράση.

Το τρυβλίο ελέγχου χωρίστηκε σε περιοχές, κάθε μια εμβολιάστηκε από μια μετασηματισμένη αποικία και το τρυβλίο επώαστηκε στους 30°C για 48h και στη συνέχεια στους 50°C για 2h. Έπειτα, το τρυβλίο βάφτηκε με βαφή Congo Red 1%, που έχει τη δυνατότητα πρόσδεσης σε πολυσακχαρίτες. Ακολούθησε έκπλυση με νερό και διάλυμα 1M NaCl για την απομάκρυνση της μη προσδεμένης στο υπόστρωμα βαφής. Η παρουσία ενζύμου με ξυλανολυτική δράση σηματοδοτείται με την παρουσία αποχρωματισμένου δίσκου πέριξ της αποικίας, λόγω της αποδόμησης της ξυλάνης στην περιοχή.

III. Αποτελέσματα

Κεφάλαιο 5: Ανάλυση σύστασης και κρυσταλλικότητας υλικών

5.1 Ανάλυση σύστασης

Η ανάλυση πραγματοποιήθηκε σύμφωνα με το πρωτόκολλο σύστασης βιομάζας NREL. Στον παρακάτω πίνακα παρουσιάζονται τα αποτελέσματα της ανάλυσης σύστασης της ακατέργαστης πρώτης ύλης (Corn Stover) και των δειγμάτων Α-Δ που αντιστοιχούν σε διαφορετικές συνθήκες προκατεργασίας.

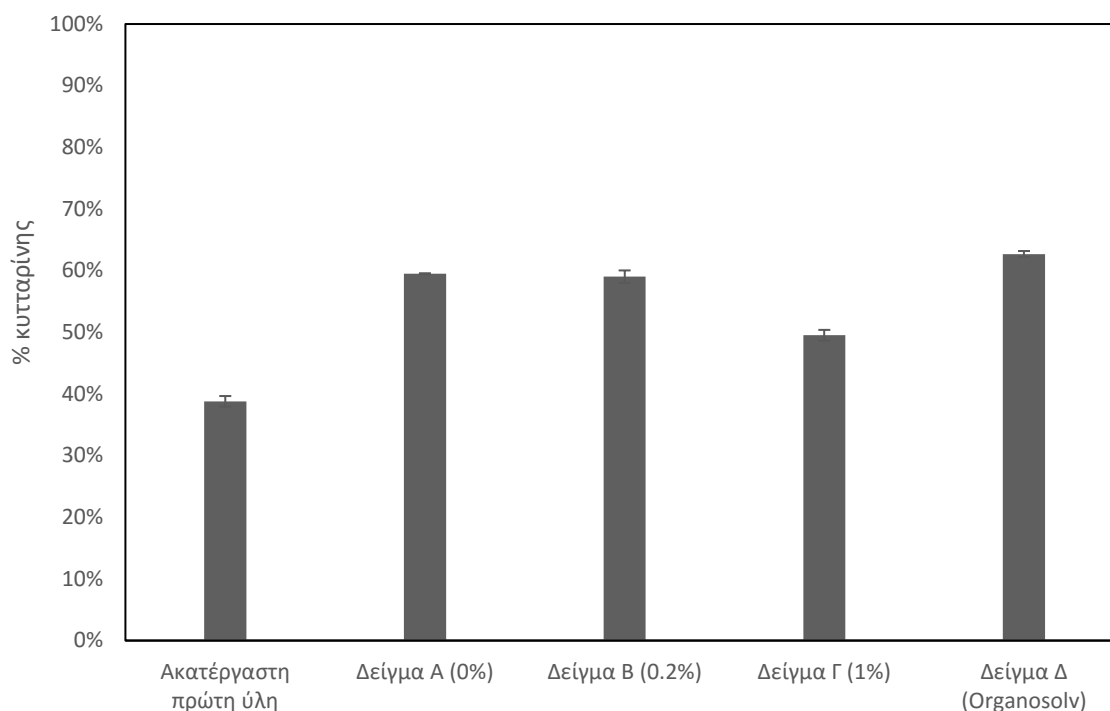
Πίνακας 5.1: Αποτελέσματα ανάλυσης σύστασης ακατέργαστης πρώτης ύλης και δειγμάτων Α-Δ (διαφορετικές συνθήκες προκατεργασίας). Τα δείγματα Α-Γ αντιστοιχούν στη μέθοδο έκρηξης ατμού, με μεταβαλλόμενες συγκεντρώσεις προστιθέμενου H_2SO_4 , και το δείγμα Δ αντιστοιχεί στη μέθοδο organosolv

| | | Κυτταρίνη | Ημικυτταρίνη | Λιγνίνη | Τέφρα |
|--------------------------|----------------|---------------|---------------|---------------|---------------|
| Ακατέργαστη πρώτη ύλη | | 38.8 ± 0.86 % | 23.5 ± 1.12 % | 20.2 ± 0.72 % | 5.3 ± 0.19 % |
| A | 0% H_2SO_4 | 59.5 ± 0.08 % | 6.7 ± 1.11 % | 28.1 ± 0.83 % | 1.2 ± 0.18 % |
| B | 0.2% H_2SO_4 | 59.0 ± 1.02 % | 13.8 ± 0.08 % | 26.6 ± 0.14 % | 6.6 ± 0.16 % |
| Γ | 1.0% H_2SO_4 | 49.5 ± 0.88 % | 0.7 ± 0,9 % | 41.8 ± 2.17 % | 11.8 ± 1.34 % |
| Δ | Organosolv | 62.7 ± 0.49 % | 19.3 ± 2.60 % | 16.6 ± 0.02 % | 23.7 ± 8.78 % |

Τα ποσοστά κυτταρίνης, ημικυτταρίνης και λιγνίνης των δειγμάτων Α-Δ αναφέρονται στο στερεό κλάσμα της προκατεργασίας. Ανάλογα με τη μέθοδο, ημικυτταρίνη ή/και λιγνίνη απομακρύνονται κατά την κατεργασία στο υγρό κλάσμα, κάτι που οδηγεί στην αύξηση της σχετικής ποσότητας των λοιπών συστατικών στο τελικό δείγμα βιομάζας.

Παρατηρείται πως σε κάθε περίπτωση η προκατεργασία της βιομάζας έχει ως αποτέλεσμα την αύξηση του ποσοστού της κυτταρίνης στο στερεό κλάσμα της κατεργασίας (τη βιομάζα, δηλαδή, που οδηγείται προς υδρόλυση και ζύμωση). Επιβεβαιώνεται, έτσι, η αποτελεσματικότητα της προκατεργασίας, στόχος της οποίας είναι η διευκόλυνση της κυτταρινολυτικής δράσης. Όπως έχει αναφερθεί, η αποτελεσματική υδρόλυση εξαρτάται άμεσα από την πρόσβαση των κυτταρινασών στην κυτταρίνη, επομένως και από το ποσοστό της κυτταρίνης στη βιομάζα.

Στο παρακάτω διάγραμμα (Διάγραμμα 5.1) παρουσιάζεται το τελικό ποσοστό περιεχόμενης κυτταρίνης στα δείγματα που μελετήθηκαν. Υψηλότερα ποσοστά κυτταρίνης εμφανίζουν τα δείγματα Α, Β και Δ και για το λόγο αυτό συμπεραίνεται εκ πρώτης όψεως ότι τα δείγματα αυτά θα εμφανίζουν καλύτερες αποδόσεις σε ζυμώσιμα σάκχαρα στο στάδιο της υδρόλυσης. Το συμπέρασμα αυτό ωστόσο δεν είναι ασφαλές πριν ολοκληρωθεί η δοκιμαστική υδρόλυση των δειγμάτων, καθώς άλλοι παράγοντες όπως η κρυσταλλικότητα της βιομάζας και η πιθανή ύπαρξη παρεμποδιστών επιδρούν επίσης στην απόδοση της διεργασίας.



Διάγραμμα 5.1: Ποσοστό κυτταρίνης στα δείγματα στελέχους αραβοσίτου με διαφορετικές συνθήκες προκατεργασίας, σε σύγκριση με το ποσοστό κυτταρίνης ακατέργαστου στελέχους αραβοσίτου

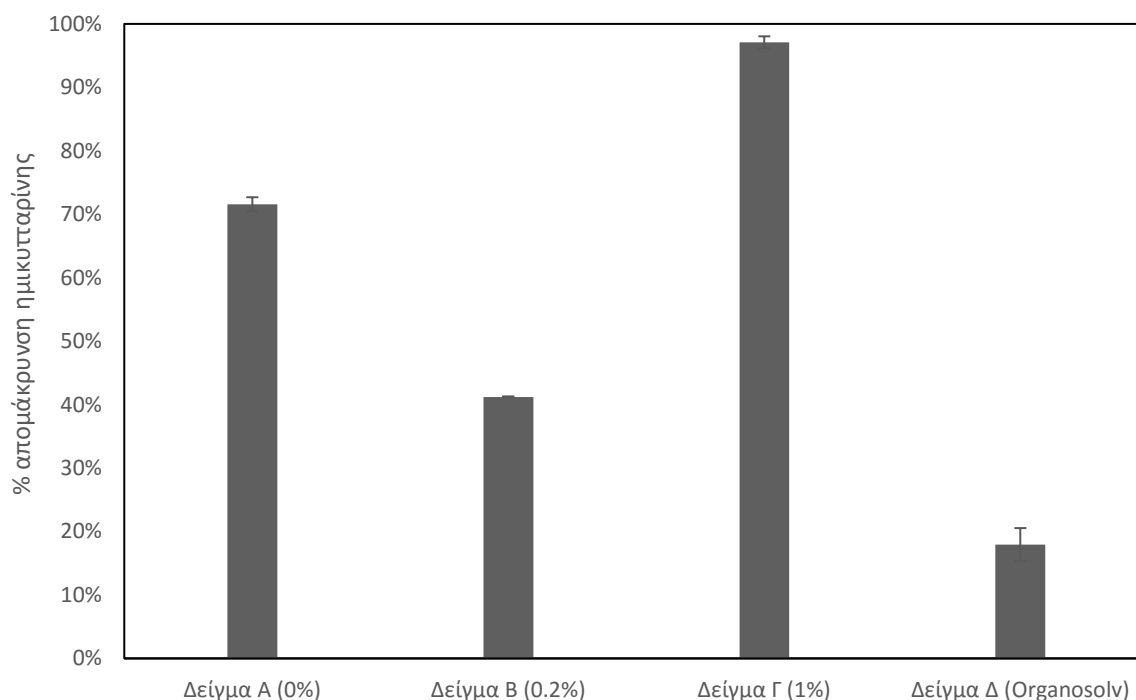
Αξίζει να αναφερθεί ότι παρουσιάζονται διαφορές στη σύσταση της βιομάζας που έχει προκατεργαστεί με τη μέθοδο έκρηξης ατμού από τη βιομάζα που έχει προκατεργαστεί με τη μέθοδο organosolv. Αναλυτικότερα, στο δείγμα Δ έχει πραγματοποιηθεί σημαντική μείωση του ποσοστού λιγνίνης, ενώ το ποσοστό της ημικυτταρίνης έχει παραμείνει σχεδόν αμετάβλητο. Αντιθέτως, η προκατεργασία έκρηξης ατμού εν γένει έχει οδηγήσει σε μείωση των ποσοστών ημικυτταρίνης στη βιομάζα, με μεταβαλλόμενη αποτελεσματικότητα ανάλογα με τις συνθήκες κατεργασίας. Ωστόσο, τα ποσοστά της λιγνίνης στα δείγματα Α-Γ παραμένουν υψηλά και μάλιστα παρουσιάζουν αύξηση. Η αύξηση αυτή είναι φαινομενική, καθώς δεν λαμβάνει χώρα παραγωγή λιγνίνης, αλλά η απομάκρυνση άλλων συστατικών κατά την προκατεργασία οδηγεί στην κάλυψη μεγαλύτερου ποσοστού της προκατεργασμένης βιομάζας από αυτή.

Οι διαφορές στη σύσταση των δειγμάτων συνάδουν με τις ιδιαιτερότητες της κάθε μεθόδου προκατεργασίας. Η μέθοδος έκρηξης ατμού στοχεύει κατά κύριο λόγο στην απομάκρυνση των ημικυτταρινασών από τη βιομάζα μέσω της όξινης υδρόλυσής τους, ενώ η μέθοδος organosolv απομακρύνει κυρίως τη λιγνίνη εκχυλίζοντάς την από την πρώτη ύλη.

Αναλυτικότερα για τα δείγματα προκατεργασίας με έκρηξη ατμού (Α-Γ), η μεγαλύτερη αποτελεσματικότητα στην απομάκρυνση της ημικυτταρίνης παρατηρείται στο Δείγμα Γ (1% H_2SO_4), όπου η ημικυτταρίνη διαλυτοποιείται σχεδόν καθ' ολοκληρίαν. Αξιόλογη μείωση παρατηρείται και στα δείγματα Α (0%) και Β (0.2%) που κατεργάστηκαν σε πιο ήπιες συνθήκες συγκέντρωσης οξέων. Παρ' όλα αυτά, το ποσοστό κυτταρίνης του

Δείγματος Γ είναι αρκετά χαμηλότερο από τα ποσοστά κυτταρίνης των δειγμάτων Α και Β, κάτι που υποδεικνύει ταυτόχρονη υδρόλυση κυτταρίνης κατά την προκατεργασία. Αυτό δεν είναι επιθυμητό, λόγω της απώλειας κλάσματος της βιομάζας που μπορεί να αξιοποιηθεί για την παραγωγή βιοαιθανόλης, και προοιωνίζει χαμηλότερες αποδόσεις της συνολικής διεργασίας για το δείγμα Γ.

Στο παρακάτω διάγραμμα (Διάγραμμα 5.2) παρουσιάζεται η ποσοστιαία απομάκρυνση ημικυτταρίνης από το στέλεχος αραβοσίτου για τα δείγματα Α-Δ.



Διάγραμμα 5.2: Ποσοστιαία απομάκρυνση ημικυτταρίνης από το στέλεχος αραβοσίτου (δείγματα Α-Δ).

Γίνεται και γραφικά εμφανές ότι η προκατεργασία έκρηξης ατμού στοχεύει στην απομάκρυνση ημικυτταρίνης, σε αντίθεση με τη μέθοδο organosolv στην οποία η απομάκρυνσή της είναι περιορισμένη. Ανάμεσα στα δείγματα Α-Γ, το δείγμα με την υψηλότερη συγκέντρωση προστιθέμενου οξέος (Γ) παρουσιάζει μεγαλύτερη αποτελεσματικότητα υδρόλυσης, όπως είναι αναμενόμενο. Η μέθοδος αυτή ωστόσο κρίνεται δριμεία, αφού η υδρόλυση είναι εκτεταμένη με αποτέλεσμα να μειώνεται και το ποσοστό κυτταρίνης στο δείγμα.

5.2 Ανάλυση κρυσταλλικότητας

Πραγματοποιήθηκε ανάλυση με περίθλαση ακτίνων Χ (XRD) για τα Δείγματα Α-Δ και για την ακατέργαστη πρώτη ύλη. Η ακτινοβολία που χρησιμοποιήθηκε ήταν μήκους κύματος $\lambda=1.5418\text{\AA}$ και σάρωση των γωνιών 2θ έγινε στο διάστημα $3^\circ\text{-}30^\circ$ με βήμα $0,02^\circ/\text{s}$.

Ελήφθη έτσι διάγραμμα που αποτυπώνει την ένταση της ανακλώμενης ακτινοβολίας I συναρτήσει της γωνίας 2θ από το οποίο προσδιορίζεται ο δείκτης κρυσταλλικότητας. Στο διάγραμμα παρουσιάζεται η άμορφη περιοχή, η «κοιλάδα» της οποίας εμφανίζεται σε $2\theta=18.7^\circ$ και η κρυσταλλική περιοχή, η κορυφή της οποίας εμφανίζεται σε $2\theta=22.5^\circ$. Ο δείκτης κρυσταλλικότητας υπολογίζεται από τη σχέση (Segal, 1959):

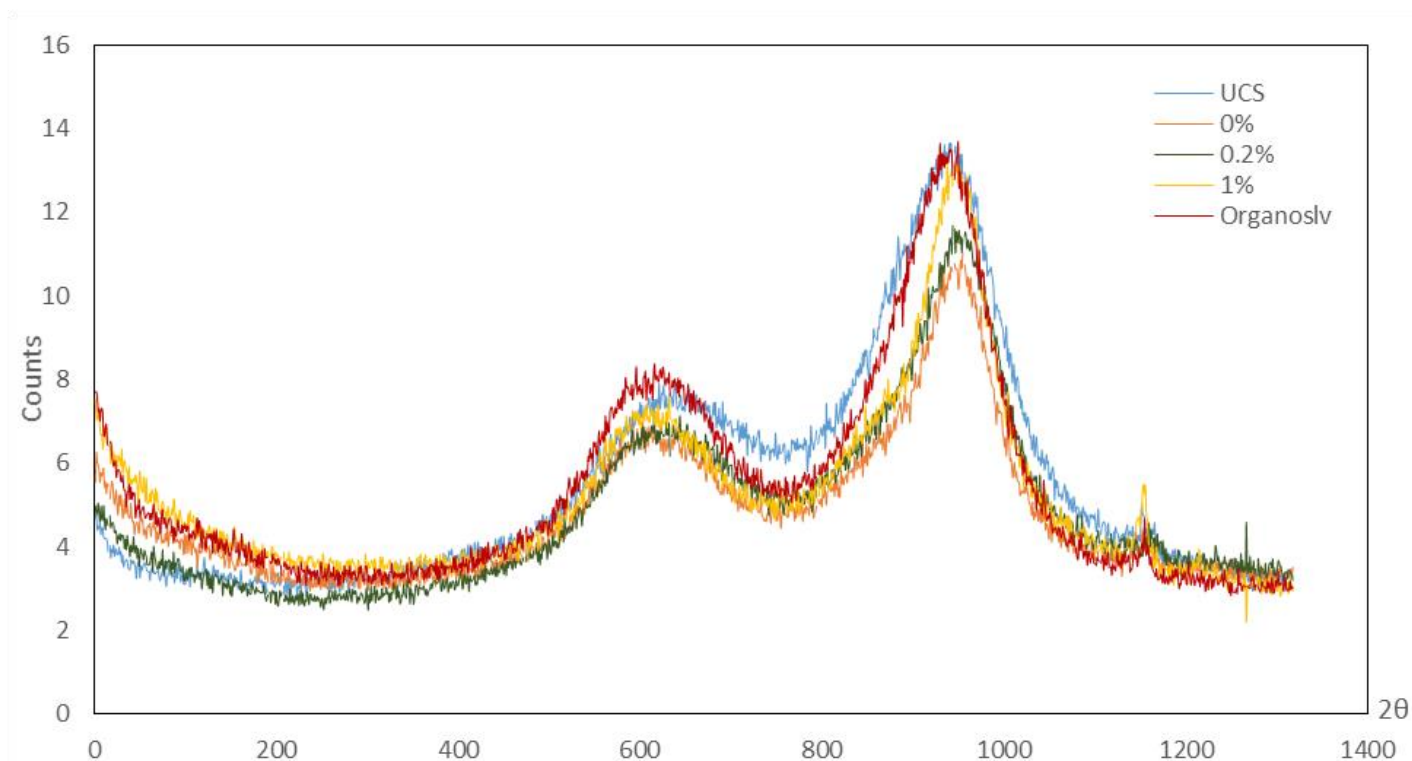
$$CrI = 100 \cdot [(I_{002} - I_{amorphous})/I_{002}]$$

Όπου:

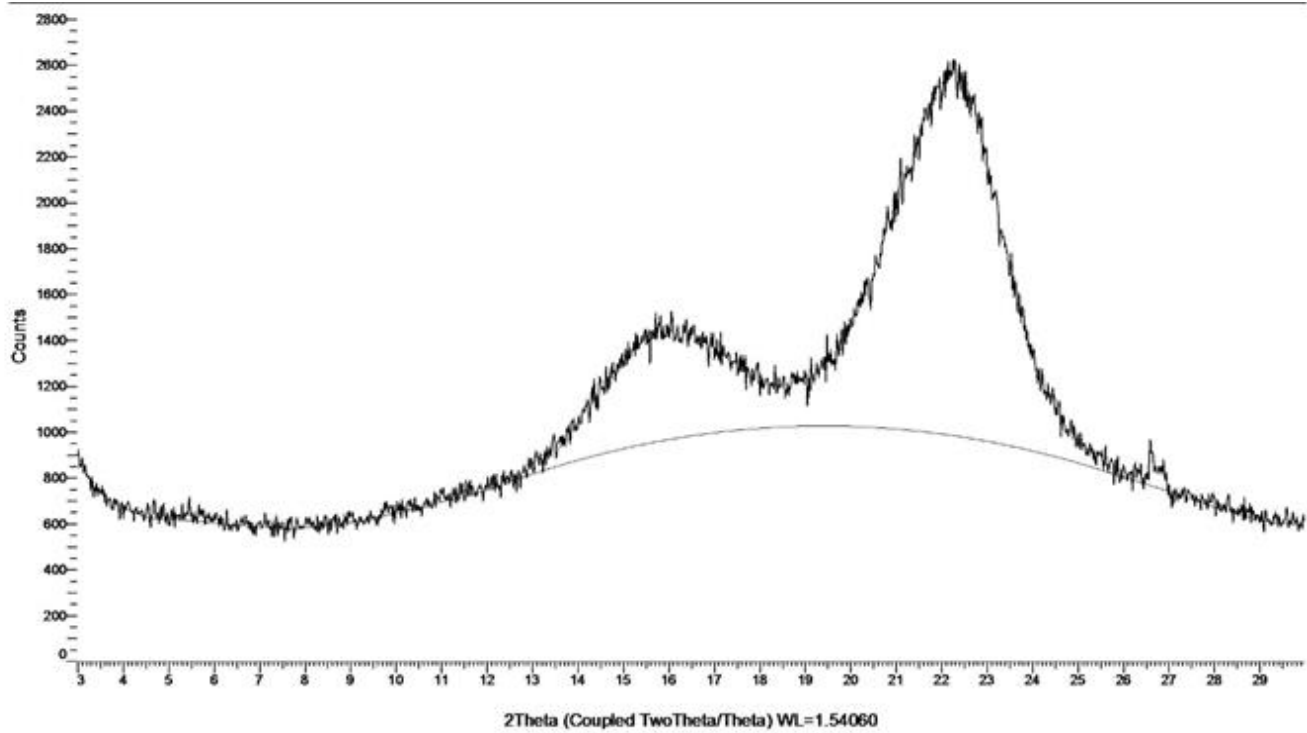
I_{002} : η ένταση της κρυσταλλικής περιοχής (ύψος της κορυφής) σε $2\theta= 22.5^\circ$, και

$I_{amorphous}$: η ελάχιστη ένταση της άμορφης περιοχής (ύψος της κοιλάδας) σε $2\theta=18.7^\circ$

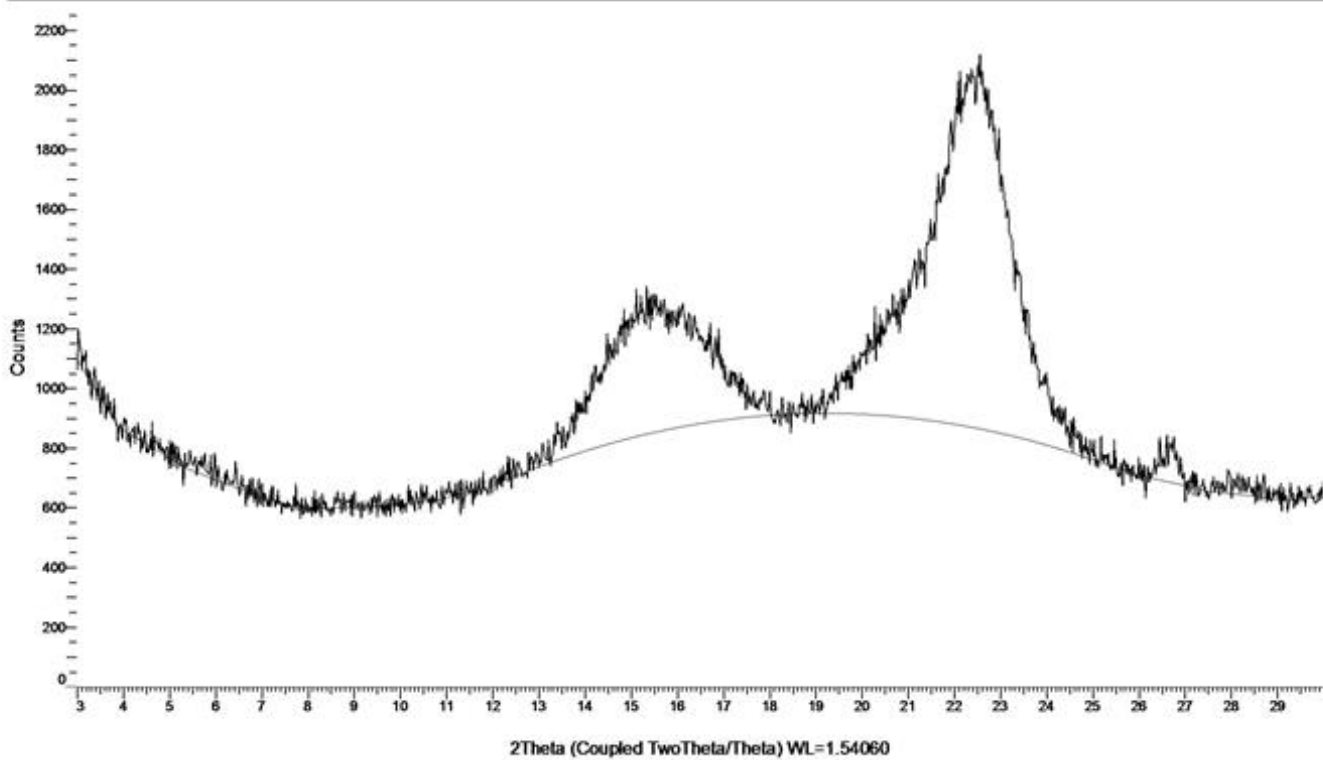
Τα διαγράμματα έντασης ανακλώμενης ακτινοβολίας συναρτήσει της γωνίας σάρωσης για τα Δείγματα Α-Δ και την ακατέργαστη πρώτη ύλη παρουσιάζονται παρακάτω (Διαγράμματα 5.4-5.8). Παρουσιάζονται επίσης εποπτικά τα αποτελέσματα των υλικών Α-Δ συγκριτικά με την πρώτη ύλη (Διάγραμμα 5.3).



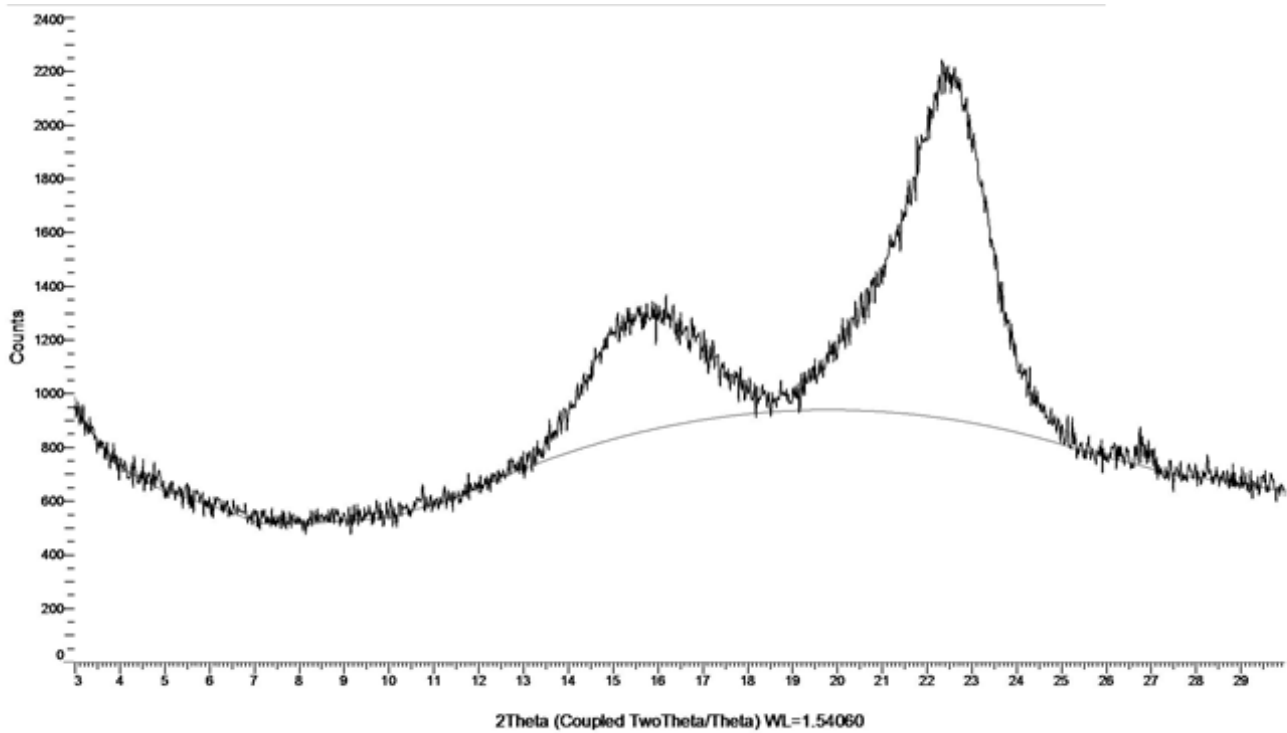
Διάγραμμα 5.3: Διάγραμμα ανάλυσης κρυσταλλικότητας μέσω XRD για την ακατέργαστη πρώτη ύλη (στέλεχος αραβοσίτου), και τα Δείγματα Α-Δ



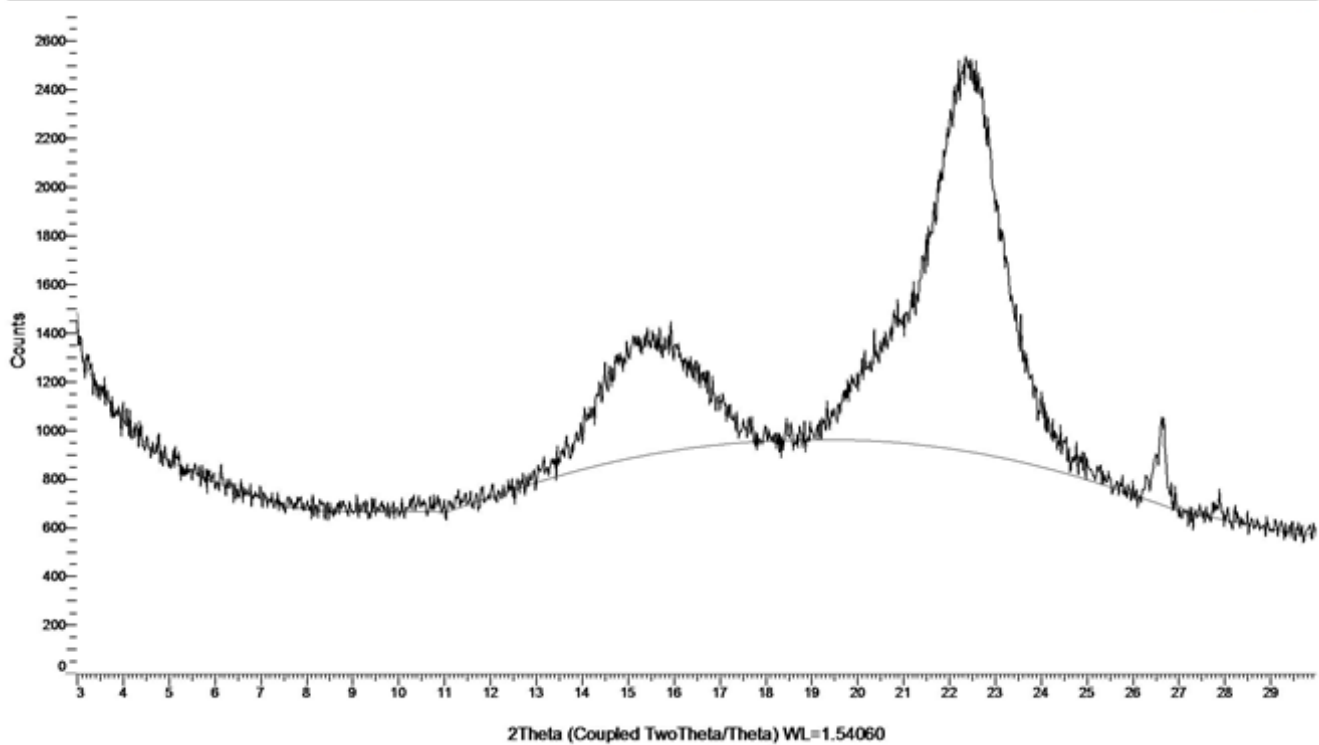
Διάγραμμα 5.4: Διάγραμμα ανάλυσης κρυσταλλικότητας μέσω XRD για την ακατέργαστη πρώτη ύλη (στέλεχος αραβοσίτου)



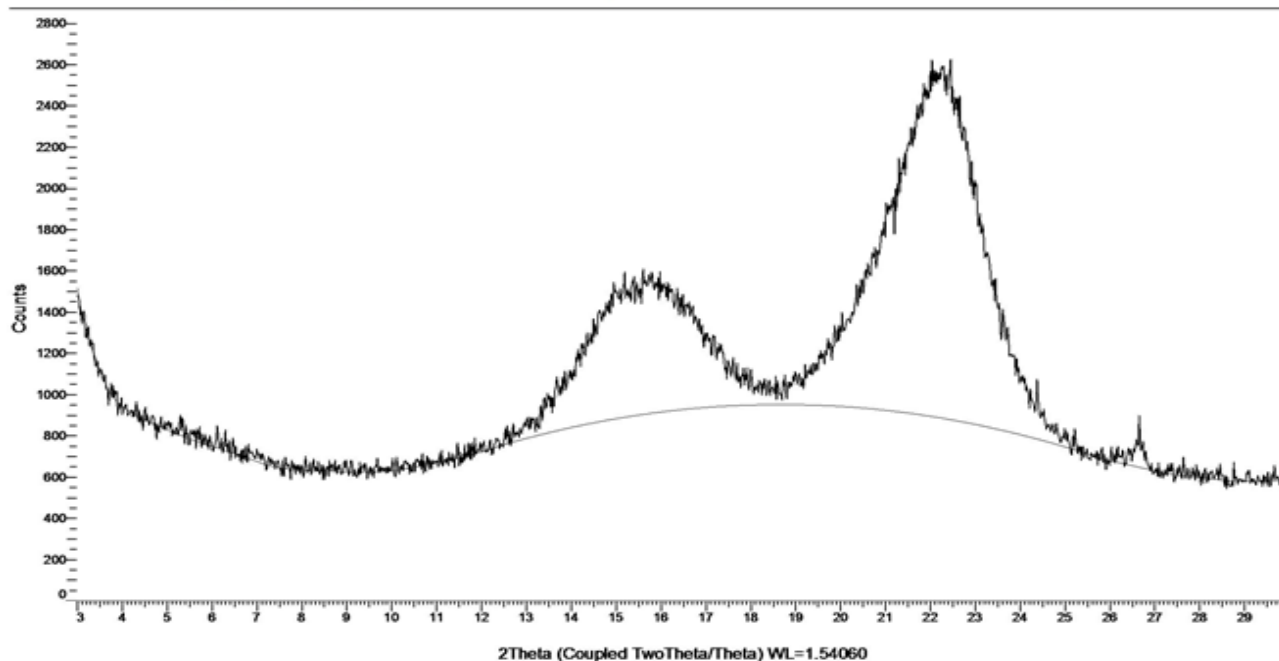
Διάγραμμα 5.5: Διάγραμμα ανάλυσης κρυσταλλικότητας μέσω XRD για το Δείγμα Α (έκρηξη ατμού, 0% H_2SO_4)



Διάγραμμα 5.6: Διάγραμμα ανάλυσης κρυσταλλικότητας μέσω XRD για το Δείγμα Β (έκρηξη ατμού, 0.2% H₂SO₄)



Διάγραμμα 5.7: Διάγραμμα ανάλυσης κρυσταλλικότητας μέσω XRD για το Δείγμα Γ (έκρηξη ατμού, 1% H₂SO₄)



Διάγραμμα 5.8: Διάγραμμα ανάλυσης κρυσταλλικότητας μέσω XRD για το Δείγμα Δ (organosolv)

Ακολουθώντας τη μέθοδο Segal υπολογίζεται ο δείκτης κρυσταλλικότητας για κάθε υλικό:

Πίνακας 5.2: Ανάλυση κρυσταλλικότητας για τα Δείγματα Α-Δ και την ακατέργαστη πρώτη ύλη

| | Δείκτης κρυσταλλικότητας (<i>CrI</i>) |
|---|---|
| Ακατέργαστη πρώτη ύλη | 55.5 |
| Δείγμα Α (0% H ₂ SO ₄) | 59.8 |
| Δείγμα Β (0.2% H ₂ SO ₄) | 57.7 |
| Δείγμα Γ (1% H ₂ SO ₄) | 64.8 |
| Δείγμα Δ (organosolv) | 62.1 |

Συμπεραίνεται πως η προκατεργασία φαίνεται να αυξάνει την κρυσταλλικότητα των υλικών σε κάθε περίπτωση. Αξίζει να αναφερθεί ότι η κρυσταλλικότητα που μελετάται αφορά το σύνολο της βιομάζας και όχι τις περιοχές της κυτταρίνης, καθώς η κρυσταλλικότητα της αμιγούς κυτταρίνης δε μπορεί να διευκρινιστεί με αυτή τη μέθοδο. Οι άμορφες περιοχές των διαγραμμάτων XRD συνδέονται με την παρουσία ημικυτταρίνης και λιγνίνης, ενώ η κρυσταλλική περιοχή αντιστοιχεί στο κρυσταλλικό μέρος της κυτταρίνης. Επομένως, η προκατεργασία οδηγεί σε μείωση της άμορφης περιοχής απομακρύνοντας την ημικυτταρίνη ή/και τη λιγνίνη και άρα και σε αύξηση της κρυσταλλικότητας του υλικού.

Παρατηρείται πως μεγαλύτερη αύξηση στο δείκτη κρυσταλλικότητας παρουσίασαν τα Δείγματα Γ και Δ. Συγκρίνοντας με τα αποτελέσματα της ανάλυσης σύστασης, διαπιστώνεται πως στα ίδια δείγματα πραγματοποιήθηκε η ισχυρότερη απομάκρυνση ημικυτταρίνης και λιγνίνης, αντίστοιχα. Τα Δείγματα Α και Β, των οποίων η σύσταση είναι παρόμοια, παρουσιάζουν και παρόμοιους δείκτες κρυσταλλικότητας, με την αύξηση κρυσταλλικότητας στο Δείγμα Α να είναι μεγαλύτερη κάτι που συνάδει με τη μεγαλύτερη απομάκρυνση ημικυτταρίνης που επέδειξε. Επομένως, συμπεραίνεται γενικώς πως τα αποτελέσματα ανάλυσης κρυσταλλικότητας παρουσιάζουν συσχέτιση με τα αποτελέσματα ανάλυσης σύστασης.

Κεφάλαιο 6: Ενζυμική υδρόλυση

6.1 Προσδιορισμός ενεργότητας κυτταρινολυτικού σκευάσματος

Ο προσδιορισμός της ενζυμικής ενεργότητας του κυτταρινολυτικού σκευάσματος πραγματοποιήθηκε βάσει του πρωτοκόλλου NREL (Adney 2008) για τη μέτρηση ενεργότητας κυτταρινασών, το οποίο υπάγεται στις οδηγίες της IUPAC, και εκφράστηκε σε Filter Paper Activity- FPA Units. Παράλληλα, μετρήθηκε η πρωτεϊνική πυκνότητα του σκευάσματος μέσω της μεθόδου Bradford και η συγκέντρωση ενζύμου εκφράστηκε ως mg πρωτεΐνης/mL σκευάσματος. Τα στοιχεία ενεργότητας του ενζύμου παρουσιάζονται στον παρακάτω πίνακα (Πίνακας 6.1).

Πίνακας 6.1: Στοιχεία κυτταρινολυτικής ενεργότητας σκευάσματος Cellic CTec2 (Novozymes)

| | Filter Paper Activity- FPA Units | mg πρωτεΐνης/mL σκευάσματος |
|--------------|----------------------------------|-----------------------------|
| Cellic CTec2 | 84 | 90 |

6.2 Μελέτη της υδρόλυσης συναρτήσει της συγκέντρωσης ενζύμου (enzyme loading)

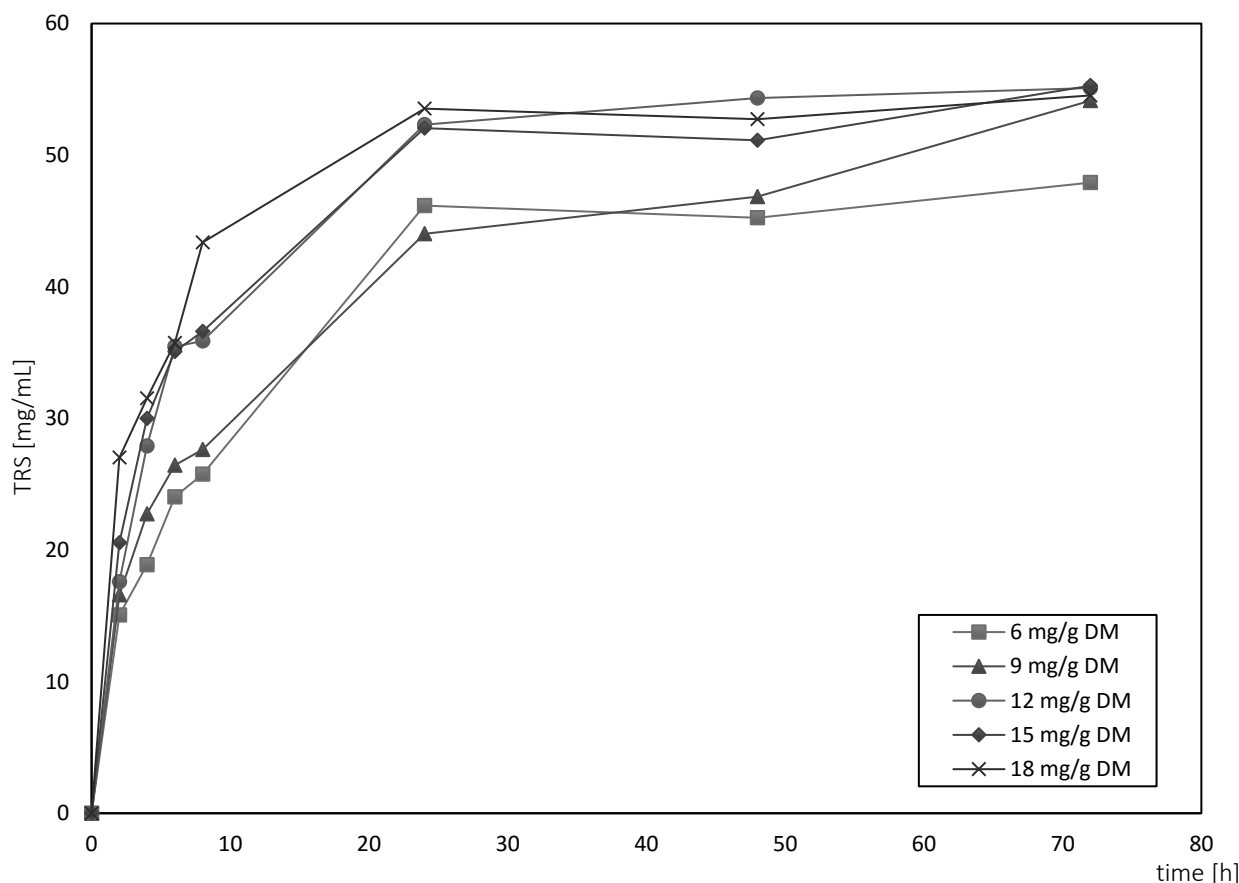
Πραγματοποιήθηκε ενζυμική υδρόλυση στα δείγματα Α-Δ με διαφορετικά ενζυμικά φορτία ώστε να επιλεγεί η βέλτιστη ποσότητα ενζύμου για την υδρόλυση. Οι σειρές πειραμάτων έχουν επιπλέον ως στόχο τη μελέτη της συμπεριφοράς των δειγμάτων και της απόδοσης αυτών σε ολικά αναγωγικά σάκχαρα και γλυκόζη. Ιδιαίτερη σημασία δίνεται στη συγκέντρωση γλυκόζης, καθώς ο αιθανολοπαραγωγός μικροοργανισμός που χρησιμοποιήθηκε στη παρούσα εργασία είναι ο *Saccharomyces cerevisiae* και διαθέτει τη δυνατότητα ζύμωσης μόνο εξοζών.

Αρχικά, μελετήθηκε η υδρόλυση του δείγματος Α (έκρηξη ατμού χωρίς προσθήκη οξέος) σε διαφορετικά ενζυμικά φορτία και σε μικρή κλίμακα (κωνικές φιάλες 50mL). Μετρήθηκε η απελευθέρωση ολικών αναγωγικών σακχάρων με τη μέθοδο DNS και γλυκόζης με τη μέθοδο εμπορικού σκευάσματος GOD-PAP. Τα ολικά αναγωγικά σάκχαρα που μετρήθηκαν με τη μέθοδο DNS εκφράστηκαν σε ισοδύναμα γλυκόζης. Τα ενζυμικά φορτία ήταν 6 mg ενζύμου/g ξηρής βιομάζας (DM), 9 mg/g DM, 12 mg/g DM, 15 mg/g DM, 18 mg/g DM και το ποσοστό στερεών ήταν 10% (0.5 g βιομάζας και 5mL κατάλληλα αραιωμένου κυτταρινολυτικού σκευάσματος). Τέλος, δείγματα ελήφθησαν στα χρονικά διαστήματα: 2h, 4h, 6h, 8h, 24h, 48h, 72h όπου χρόνος μηδέν ορίζεται η στιγμή εισαγωγής του ενζύμου στη φιάλη. Η ενζυμική υδρόλυση πραγματοποιήθηκε για 72 ώρες, σε επωαστήρα με συνθήκες σταθερής θερμοκρασίας 50°C και υπό έντονη ανάδευση 180 rpm.

Παρακάτω παρουσιάζονται τα διαγράμματα χρονικής εξέλιξης της απελευθέρωσης ολικών αναγωγικών σακχάρων-TRS (Διάγραμμα 6.1) και γλυκόζης (Διάγραμμα 6.2) για τα διαφορετικά ενζυμικά φορτία, για το Δείγμα Α (0% H₂SO₄).

Σημειώνεται πως το ενζυμικό σκεύασμα περιέχει αναγωγικά σάκχαρα, τα οποία προέρχονται από τη διαδικασία παραγωγής του, όπου χρησιμοποιούνται για την ανάπτυξη των μικροοργανισμών-παραγωγών του ενζύμου. Μετρήθηκε η συγκέντρωση του ενζύμου σε γλυκόζη και αναγωγικά σάκχαρα και τέθηκε σε κάθε περίπτωση ως αρχική τιμή ($t=0$) των υδρολύσεων

Enzyme Loading - Time Course: Δείγμα A (0% H_2SO_4)

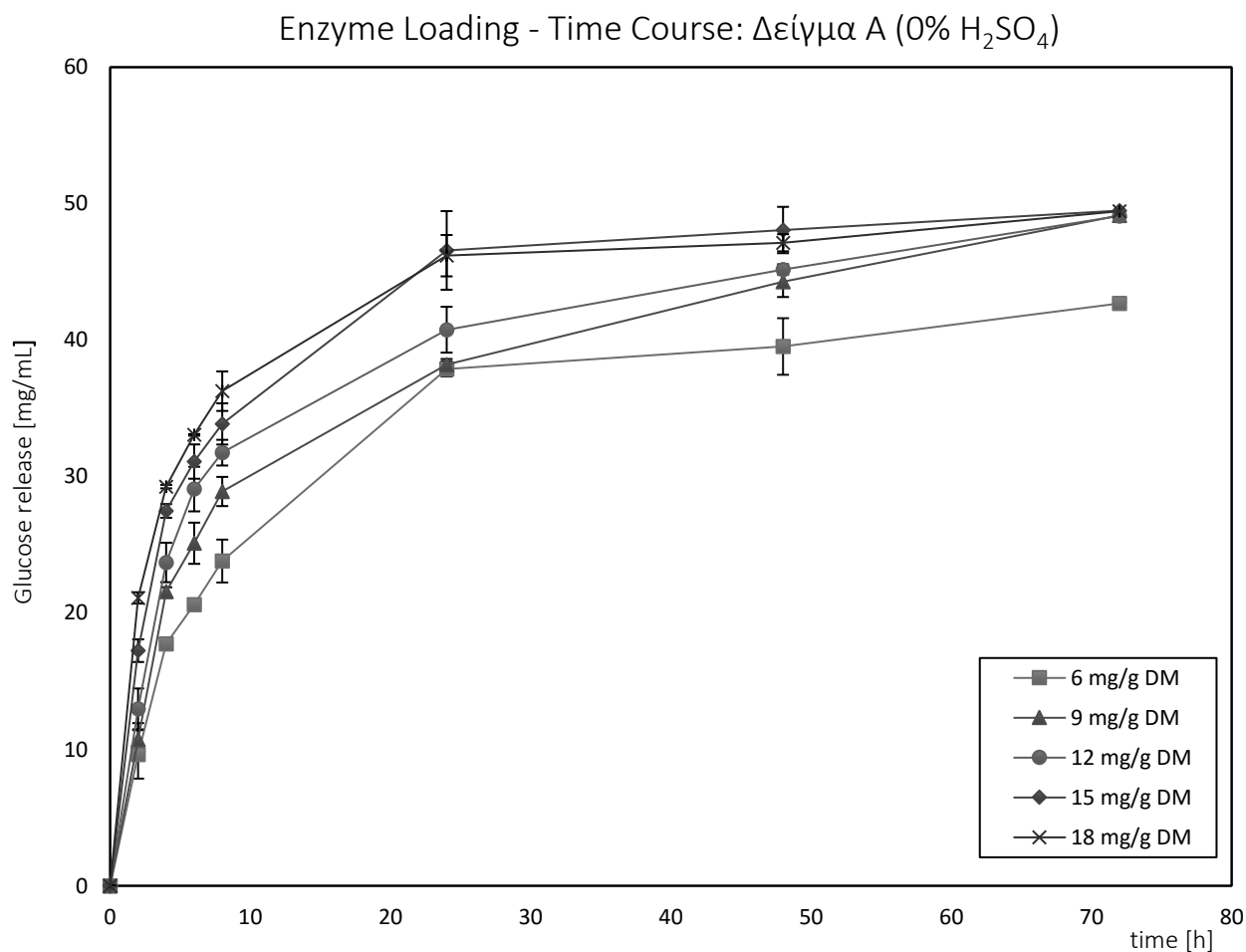


Διάγραμμα 6.1: Χρονική εξέλιξη της απελευθέρωσης ολικών αναγωγικών σακχάρων για το δείγμα A (0% H_2SO_4). Απεικονίζονται οι σειρές ενζυμικών φορτίων 6 mg/g DM (□), 9 mg/g DM (Δ), 12 mg/g DM (●), 15 mg/g DM (◇), 18 mg/g DM (x).

Από το διάγραμμα χρονικής εξέλιξης της συγκέντρωσης σακχάρων παρατηρείται σχεδόν γραμμική αύξηση της συγκέντρωσης αναγωγικών σακχάρων στο χρονικό διάστημα 0- 8h, ενώ σε μεγαλύτερες ώρες (24-72h) παρουσιάζεται πλατώ. Η συμπεριφορά αυτή είναι αναμενόμενη για το κυτταρινολυτικό σύστημα.

Σε μικρούς χρόνους οι κυτταρινάσες έχουν πρόσβαση στην κυτταρίνη του συστήματος, ενώ η συγκέντρωση των σακχάρων στο υγρό κλάσμα είναι χαμηλή. Επομένως, η παρεμπόδιση του κυτταρινολυτικού συστήματος από το προϊόν (γλυκόζη) είναι περιορισμένη και έτσι ο ρυθμός της αντίδρασης στην αρχή του πειράματος είναι υψηλός. Αυτό γίνεται ακόμα πιο σαφές αν παρατηρηθεί ότι η απελευθέρωση της γλυκόζης στις

2h πειράματος αποτελεί περίπου το 40% της ολικής απελευθέρωσης (72h). Καθώς εξελίσσεται η αντίδραση, η αύξηση της συγκέντρωσης γλυκόζης συντελεί στην παρεμπόδιση της ενζυμικής δραστηριότητας και ο ρυθμός αντίδρασης μειώνεται. Παρατηρείται ότι περαιτέρω υδρόλυση δεν επιφέρει αλλαγές στη συγκέντρωση των σακχάρων και παρουσιάζεται πλατώ στο διάστημα 24h-72h. Συμπεραίνεται πως η επέκταση της ενζυμικής υδρόλυσης της βιομάζας σε ώρες άνω των 24h δε θα ήταν συμφέρουσα, καθώς οδηγεί σε μείωση της παραγωγικότητας λόγω της επίτευξης ίδιου αποτελέσματος σε περισσότερο χρόνο.



Διάγραμμα 6.2: Χρονική εξέλιξη της απελευθέρωσης γλυκόζης για το δείγμα A (0% H₂SO₄). Απεικονίζονται οι σειρές ενζυμικών φορτίων 6 mg/g DM (□), 9 mg/g DM (Δ), 12 mg/g DM (●), 15 mg/g DM (◇), 18 mg/g DM (x)

Όπως είναι αναμενόμενο, παρόμοια μορφή παρουσιάζει το διάγραμμα χρονικής εξέλιξης της απελευθέρωσης γλυκόζης για τα διάφορα ενζυμικά φορτία. Σε κάθε περίπτωση, η συγκέντρωση της γλυκόζης είναι μικρότερη από τη συγκέντρωση ολικών αναγωγικών σακχάρων, κάτι που επιβεβαιώνει εν μέρει την ακρίβεια των μετρήσεων.

Γενικώς, παρατηρείται μεγαλύτερη ταχύτητα αντίδρασης στα υψηλότερα ενζυμικά φορτία, όπως είναι αναμενόμενο. Η παρουσία μεγαλύτερης ποσότητας ενζύμου

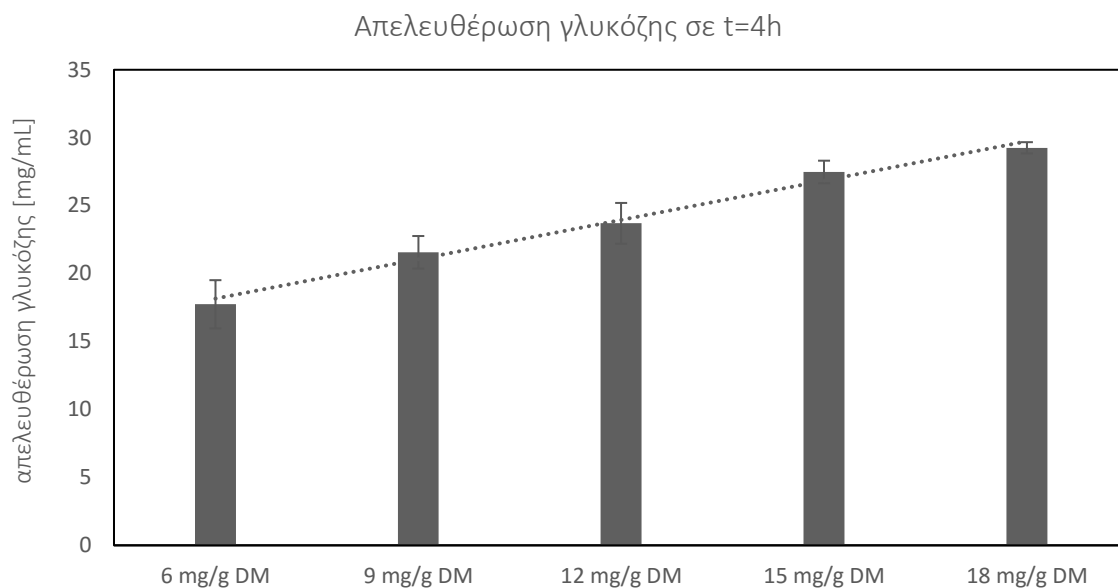
επιταχύνει καταλυτικά την αντίδραση υδρόλυσης, οδηγώντας στην επίτευξη της τελικής συγκέντρωσης γλυκόζης σε μικρότερο χρονικό διάστημα και σε αύξηση της παραγωγικότητας. Ωστόσο, το κόστος των ενζύμων αποτελεί σημαντικό παράγοντα για τη συνολική βιωσιμότητα της διεργασίας και έτσι είναι ευκαταίεη η χρήση όσο το δυνατόν χαμηλότερου φορτίου. Οι δύο αυτές αντίθετες επιρροές στο κόστος συμβιβάζονται με την επιλογή του βέλτιστου ενζυμικού φορτίου. Το βέλτιστο ενζυμικό φορτίο θα συντελεί σε αποτελεσματική υδρόλυση της βιομάζας στο συνολικό χρόνο διεργασίας χωρίς δαπανάται ένζυμο αναποτελεσματικά. Στην παρούσα σειρά πειραμάτων ως βέλτιστο ενζυμικό φορτίο επιλέχθηκε η συγκέντρωση 12 mg/g DM. Επισημαίνεται πως τα φορτία που μελετήθηκαν ήταν ορισμένα, και ενδεχομένως άλλη ενδιάμεση συγκέντρωση ενζύμου να παρουσίαζε επίσης καλά αποτελέσματα.

Στον Πίνακα 6.2 παρουσιάζονται τα αποτελέσματα απελευθέρωσης ολικών αναγωγικών σακχάρων –TSR (mg/mL) και γλυκόζης (mg/mL) για το βέλτιστο ενζυμικό φορτίο (12 mg/g DM), για το Δείγμα Α (0% H₂SO₄).

Πίνακας 6.2: Συγκέντρωση Γλυκόζης και Ολικών Αναγωγικών Σακχάρων στο βέλτιστο ενζυμικό φορτίο (12 mg/g DM) για το Δείγμα Α (0% H₂SO₄)

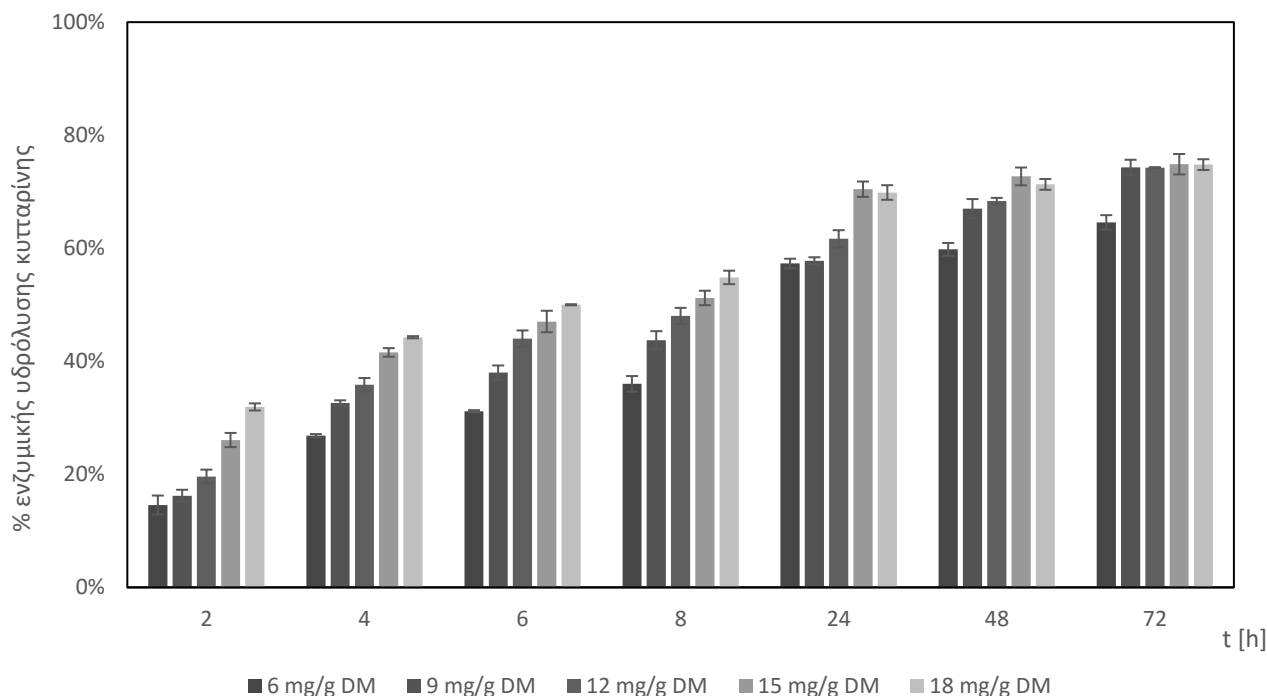
| Χρόνος (h) | Συγκέντρωση Γλυκόζης (mg/mL) | Συγκέντρωση Ολικών αναγωγικών σακχάρων (mg/mL) |
|------------|------------------------------|--|
| 0h | 0.7 ± 0.01 | 0.8 ± 0.01 |
| 2h | 12.9 ± 0.23 | 17.6 ± 1.50 |
| 4h | 23.7 ± 0.10 | 27.9 ± 1.45 |
| 6h | 29.1 ± 0.94 | 35.5 ± 1.63 |
| 8h | 31.8 ± 1.52 | 35.9 ± 0.94 |
| 24h | 40.8 ± 1.32 | 52.3 ± 1.68 |
| 48h | 45.2 ± 0.35 | 54.3 ± 0.38 |
| 72h | 49.1 ± 0.49 | 55.1 ± 0.48 |

Στο παρακάτω διάγραμμα (Διάγραμμα 6.3) γίνεται εμφανής η γραμμικότητα της απελευθέρωσης γλυκόζης από τα διαφορετικά ενζυμικά φορτία σε μικρούς χρόνους. Επιλέχθηκε να παρασταθεί η απελευθέρωση της γλυκόζης συναρτήσει των διαφορετικών ενζυμικών φορτίων στις 4h, όπου η σχέση είναι ακόμα γραμμική.



Διάγραμμα 6.3: Απελευθέρωση γλυκόζης στις 4h συναρτήσει των ενζυμικών φορτίων για το Δείγμα A (0% H₂SO₄)

Ωστόσο, σημασία έχει να μελετηθεί εκτός από τις απόλυτες συγκεντρώσεις γλυκόζης στο υδρόλυμα και το ποσοστό ενζυμικής υδρόλυσης κυτταρίνης. Το ποσοστό της υδρόλυσης προσδιορίζεται χρησιμοποιώντας τη θεωρητική απόδοση της κυτταρίνης σε εξόζες (1 g κυτταρίνης/ 1.111 g εξοζών). Στο ακόλουθο διάγραμμα παριστάνεται η ποσοστιαία ενζυμική υδρόλυση κυτταρίνης για όλα τα ενζυμικά φορτία συναρτήσει του χρόνου.



Διάγραμμα 6.4: Ποσοστιαία ενζυμική υδρόλυση κυτταρίνης για τα ενζυμικά φορτία συναρτήσει του χρόνου υδρόλυσης, για το Δείγμα A (0% H₂SO₄)

Παρατηρείται πως η ποσοστιαία υδρόλυση της κυτταρίνης παρουσιάζει πλατώ σε τιμή κοντά στο 80%, τιμή που προσεγγίζεται από όλα σχεδόν τα ενζυμικά φορτία. Η παρουσία του πλατώ οφείλεται στην παρεμπόδιση της κυτταρινολυτικής δράσης από τη γλυκόζη (προϊόν), όπως έχει αναλυθεί παραπάνω.

Η διαδικασία της ενζυμικής υδρόλυσης ακολουθήθηκε με τις ίδιες συνθήκες για τα λοιπά δείγματα. Παρακάτω παρουσιάζονται τα διαγράμματα χρονικής εξέλιξης της απελευθέρωσης ολικών αναγωγικών σακχάρων-TRS (Διάγραμμα 6.5) και γλυκόζης (Διάγραμμα 6.6) για τα διαφορετικά ενζυμικά φορτία, για το Δείγμα Β (0.2% H₂SO₄).

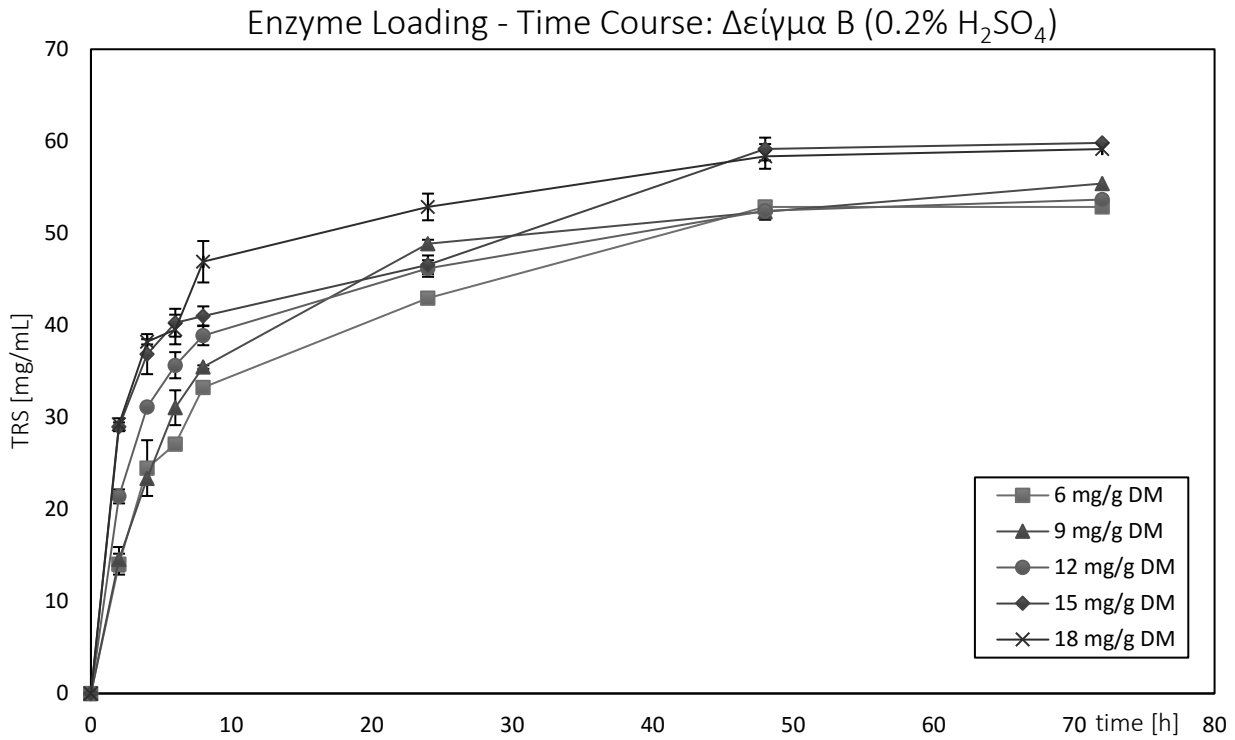
Η συμπεριφορά του Δείγματος Β (0.2% H₂SO₄) είναι παρόμοια με του Δείγματος Α (0% H₂SO₄), καθώς οι γενικές αρχές της κυτταρινολυτικής δράσης αφορούν και τα δυο συστήματα. Έτσι, και σε αυτή την περίπτωση εμφανίζεται γραμμικότητα στην απελευθέρωση της γλυκόζης σε χαμηλούς χρόνους και επίτευξη πλατώ στη συγκέντρωση μετά τις 24h, λόγω της παρεμπόδισης από το προϊόν.

Παρατηρείται ότι η απελευθέρωση γλυκόζης στο Δείγμα Β ευνοείται σε σχέση με το Δείγμα Α, καθώς τόσο η τελική συγκέντρωση γλυκόζης (72h) όσο και οι περισσότερες ενδιάμεσες συγκεντρώσεις είναι πιο αυξημένες. Το φαινόμενο αυτό επαληθεύει την αποτελεσματικότητα της προκατεργασίας και δικαιολογεί έτσι την προσθήκη μικρής ποσότητας οξέος κατά την έκρηξη ατμού. Τέλος, σε κάθε περίπτωση η συγκέντρωση των ολικών αναγωγικών σακχάρων είναι μεγαλύτερη από την αντίστοιχη συγκέντρωση γλυκόζης κάτι που επιβεβαιώνει μερικώς την ακρίβεια των μετρήσεων.

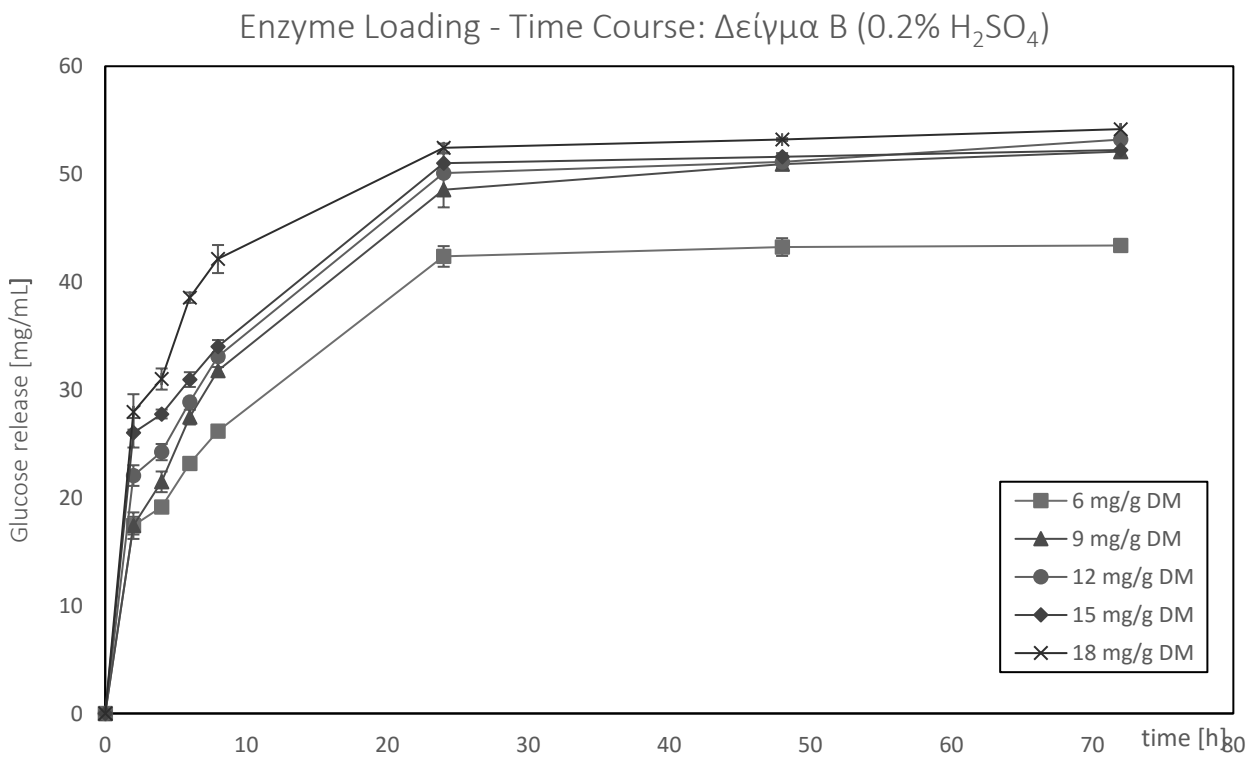
Και σε αυτήν την περίπτωση ως βέλτιστο ενζυμικό φορτίο επιλέχθηκε η συγκέντρωση 12mg/g DM. Οι συγκεντρώσεις γλυκόζης και αναγωγικών σακχάρων στο υδρόλυμα συναρτήσε του χρόνου, για το βέλτιστο ενζυμικό φορτίο παρουσιάζονται στον πίνακα 6.3.

Πίνακας 6.3: Συγκέντρωση Γλυκόζης και Ολικών Αναγωγικών Σακχάρων στο βέλτιστο ενζυμικό φορτίο (12 mg/g DM) για το Δείγμα Β (0.2% H₂SO₄)

| Χρόνος (h) | Συγκέντρωση Γλυκόζης (mg/mL) | Συγκέντρωση Ολικών αναγωγικών σακχάρων (mg/mL) |
|------------|------------------------------|--|
| 0h | 0.7 ± 0.01 | 0.8 ± 0.01 |
| 2h | 22.1 ± 0.96 | 21.4 ± 0.76 |
| 4h | 24.2 ± 0.75 | 31.1 ± 0.09 |
| 6h | 28.9 ± 0.34 | 35.7 ± 1.42 |
| 8h | 33.1 ± 0.41 | 38.9 ± 1.04 |
| 24h | 50.1 ± 0.14 | 46.2 ± 0.90 |
| 48h | 51.1 ± 0.62 | 52.5 ± 0.99 |
| 72h | 53.2 ± 1.23 | 53.7 ± 1.04 |

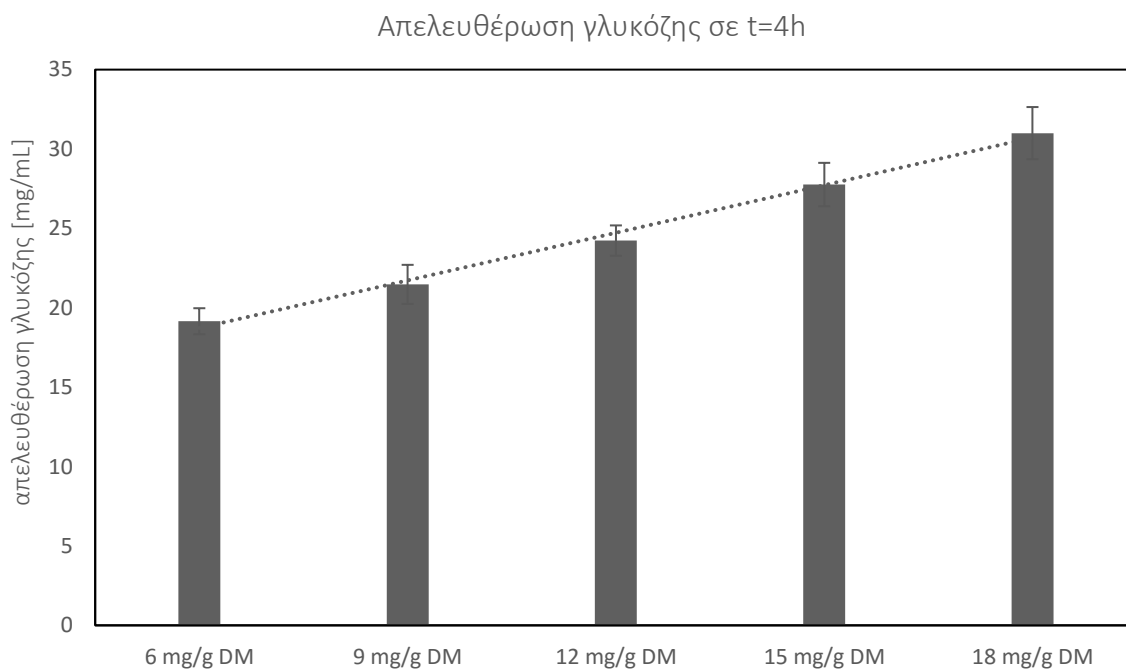


Διάγραμμα 6.5: Χρονική εξέλιξη της απελευθέρωσης ολικών αναγωγικών σακχάρων για το δείγμα B (0.2% H₂SO₄). Απεικονίζονται οι σειρές ενζυμικών φορτίων 6 mg/g DM (□), 9 mg/g DM (Δ), 12 mg/g DM (●), 15 mg/g DM (◇), 18 mg/g DM (x).



Διάγραμμα 6.6: Χρονική εξέλιξη της απελευθέρωσης γλυκόζης για το δείγμα B (0.2% H₂SO₄). Απεικονίζονται οι σειρές ενζυμικών φορτίων 6 mg/g DM (□), 9 mg/g DM (Δ), 12 mg/g DM (●), 15 mg/g DM (◇), 18 mg/g DM (x).

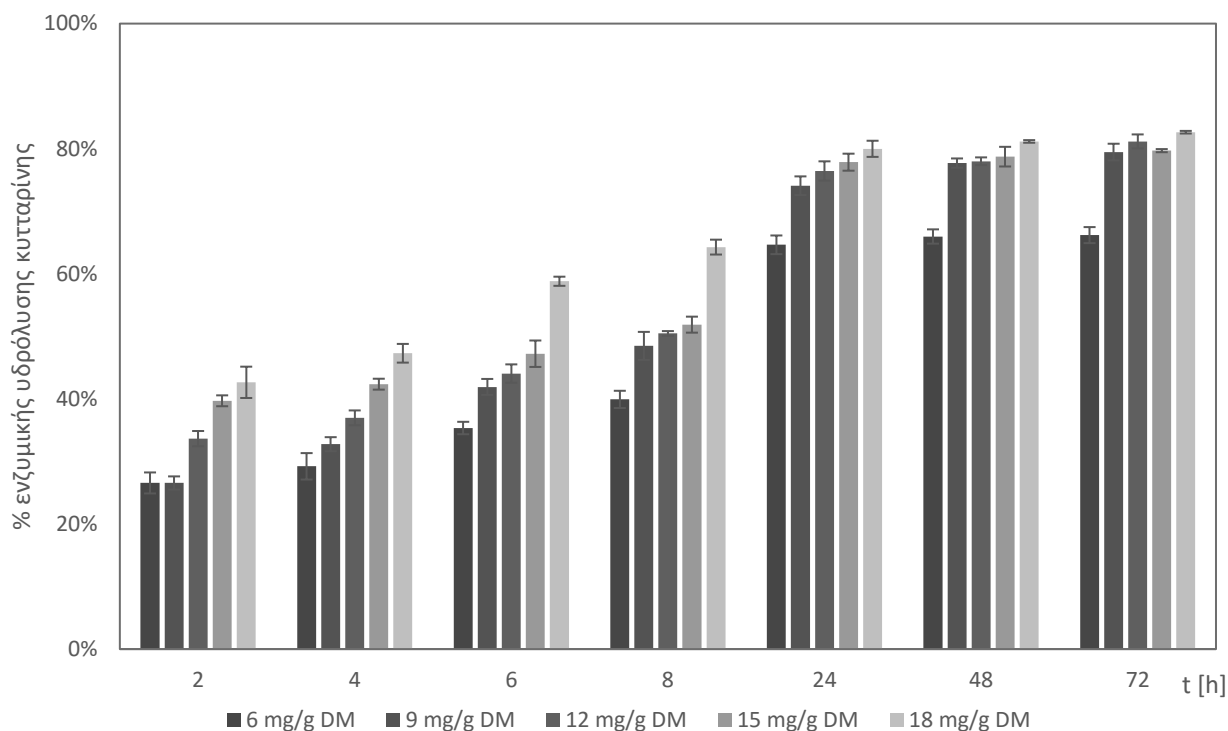
Η υδρόλυση εμφανίζει γραμμικότητα συναρτήσει των ενζυμικών φορτίων σε μικρούς χρόνους, ενώ σε μεγαλύτερους χρόνους προσεγγίζεται η οριακή συγκέντρωση γλυκόζης. Παρακάτω παρουσιάζεται η γραμμική σχέση συγκέντρωσης γλυκόζης στο υδρόλυμα με το ενζυμικό φορτίο για τον ενδεικτικό χρόνο των 4h.



Διάγραμμα 6.7: Απελευθέρωση γλυκόζης στις 4h συναρτήσει των ενζυμικών φορτίων για το Δείγμα Β (0.2% H₂SO₄)

Παράλληλα μελετάται η ποσοστιαία υδρόλυση της κυτταρίνης συναρτήσει του χρόνου και του ενζυμικού φορτίου. Η υδρόλυση της κυτταρίνης δίνει μια πιο πρακτική εικόνα της διεργασίας, καθώς γίνεται πιο σαφής η αποτελεσματικότητα της υδρόλυσης. Υπενθυμίζεται πως ο προσδιορισμός της ποσοστιαίας υδρόλυσης κυτταρίνης πραγματοποιήθηκε βάσει της θεωρητικής απόδοσης της κυτταρίνης σε εξόζες.

Η ποσοστιαία ενζυμική υδρόλυση του δείγματος Β ακολουθεί ποιοτικά ανάλογη συμπεριφορά με του Δείγματος Α, ωστόσο το τελικό ποσοστό υδρόλυσης είναι μεγαλύτερο στο Δείγμα Β. Οι διαφορές ανάμεσα στα διαφορετικά ενζυμικά φορτία είναι σχεδόν αμελητέες στους τελικούς χρόνους, με την πλειονότητα αυτών να προσεγγίζουν την οριακή τιμή συγκέντρωσης γλυκόζης.

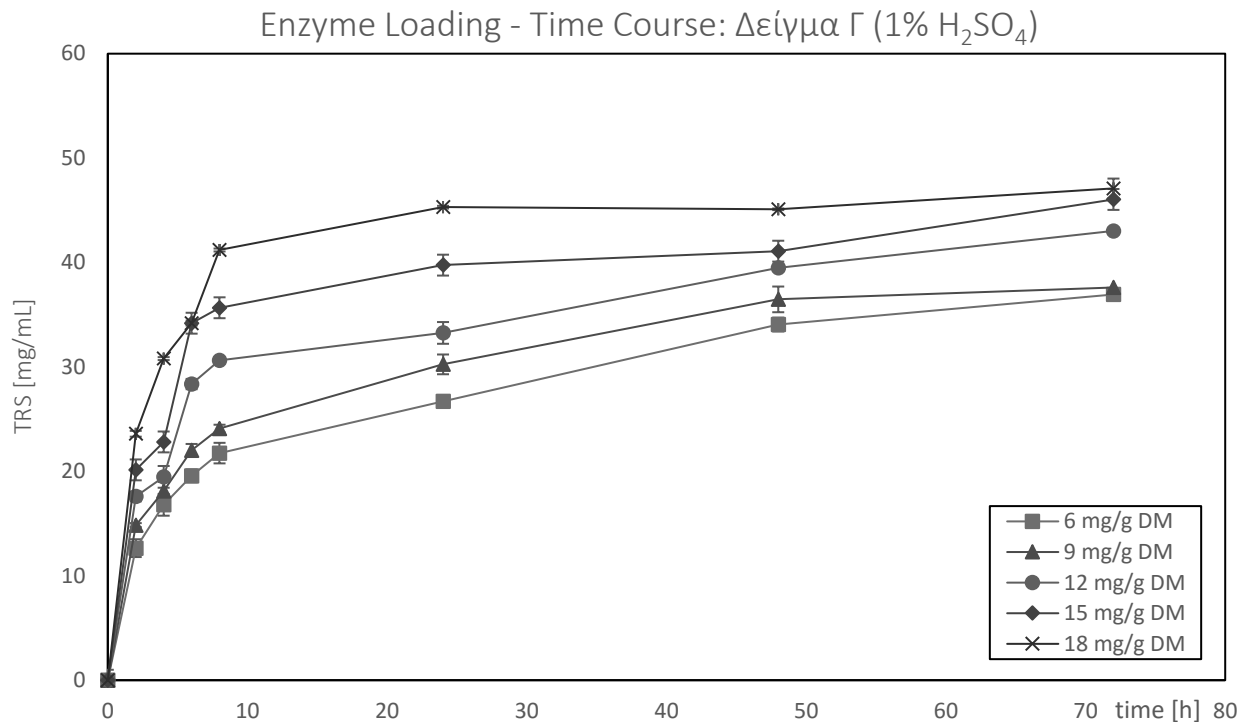


Διάγραμμα 6.8: Ποσοστιαία ενζυμική υδρόλυση κυτταρίνης για τα ενζυμικά φορτία συναρτήσει του χρόνου υδρόλυσης, για το Δείγμα Β (0.2% H₂SO₄)

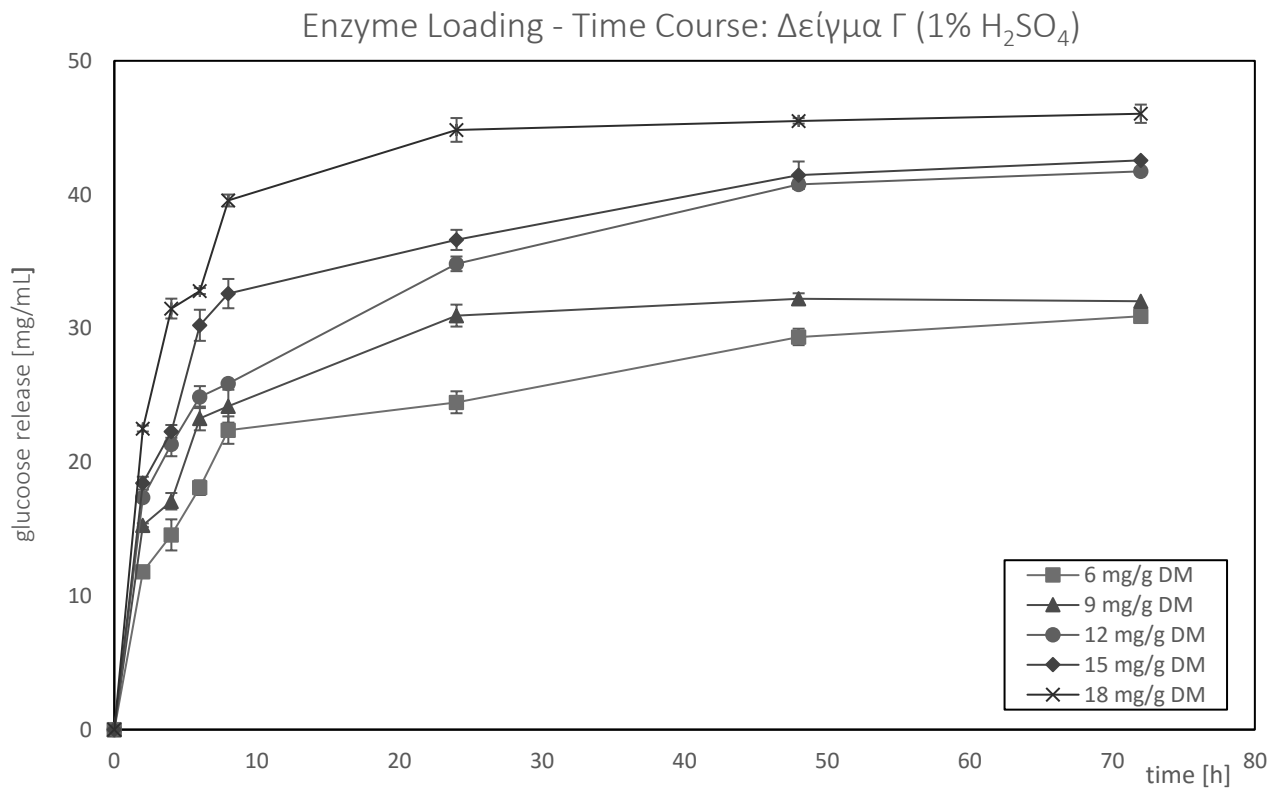
Κλείνοντας τη σειρά πειραμάτων ενζυμικής υδρόλυσης βιομάζας προκατεργασμένης με έκρηξη ατμού, μελετήθηκε το δείγμα Γ (1% H₂SO₄). Παρακάτω παρουσιάζονται τα διαγράμματα χρονικής εξέλιξης της απελευθέρωσης ολικών αναγωγικών σακχάρων-TRS (Διάγραμμα 6.9) και γλυκόζης (Διάγραμμα 6.10) για τα διαφορετικά ενζυμικά φορτία, για το Δείγμα Γ (1% H₂SO₄).

Αν και η ποιοτική συμπεριφορά είναι παρόμοια ανάμεσα στα Δείγματα Α-Γ, το Δείγμα Γ με τη μεγαλύτερη συγκέντρωση προστιθέμενου οξέος παρουσιάζει σταθερά μικρότερη απελευθέρωση γλυκόζης. Το φαινόμενο αυτό εξηγείται ανατρέχοντας στη σύσταση των τριών υλικών. Το ποσοστό της κυτταρίνης στη Δείγμα Γ είναι χαμηλότερο σε σύγκριση με τα υπόλοιπα προκατεργασμένα υλικά, κάτι που οφείλεται στη μερική διαλυτοποίηση της κυτταρίνης λόγω των όξινων συνθηκών. Είναι λοιπόν λογικό η απελευθέρωση γλυκόζης στη βάση της ίδιας αρχικής ποσότητας βιομάζας να είναι μικρότερη στο Δείγμα Γ.

Από τα διαγράμματα χρονικής εξάρτησης της συγκέντρωσης αναγωγικών σακχάρων και γλυκόζης για τα διάφορα ενζυμικά φορτία (Διαγράμματα 6.9,6.10), διαπιστώνεται πως η υδρόλυση δεν είναι ιδιαίτερα αποτελεσματική σε χαμηλές συγκεντρώσεις ενζύμων. Εν αντιθέσει με τα άλλα δυο δείγματα, δεν προσεγγίζεται η οριακή συγκέντρωση γλυκόζης στις σειρές 6 mg/g DM και 9 mg/g DM, ενώ η επίτευξη του πλατώ συγκεντρώσεων παρουσιάζει καθυστέρηση. Γενικώς το Δείγμα Γ θα μπορούσε να κριθεί λιγότερο αποδοτικό στην υδρόλυση σε σχέση με τα λοιπά δείγματα.



Διάγραμμα 6.9: Χρονική εξέλιξη της απελευθέρωσης ολικών αναγωγικών σακχάρων για το δείγμα Γ (1% H₂SO₄). Απεικονίζονται οι σειρές ενζυμικών φορτίων 6 mg/g DM (□), 9 mg/g DM (Δ), 12 mg/g DM (●), 15 mg/g DM (◇), 18 mg/g DM (x).



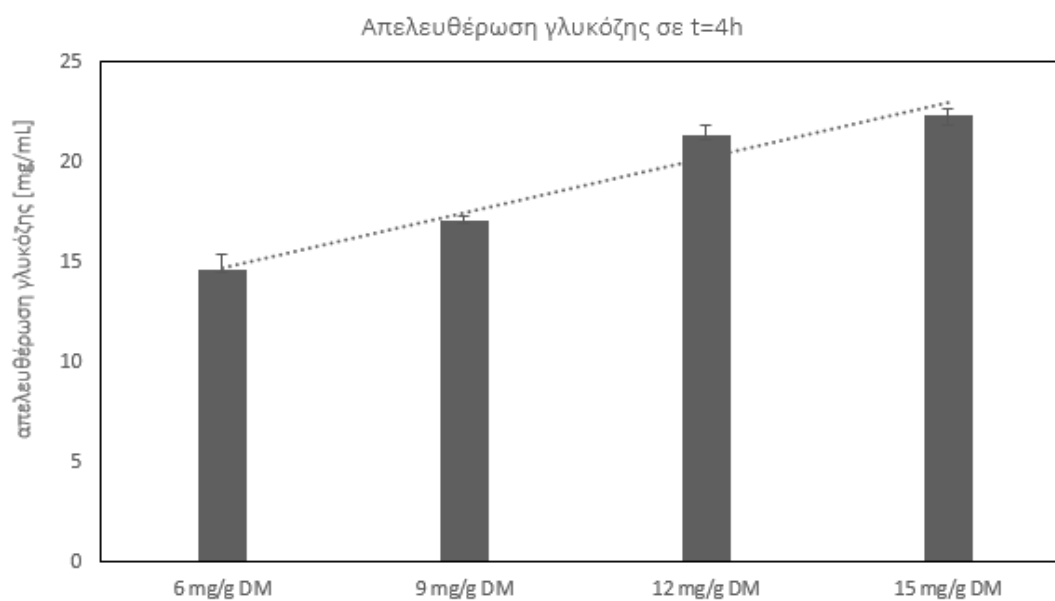
Διάγραμμα 6.10: Χρονική εξέλιξη της απελευθέρωσης γλυκόζης για το δείγμα Γ (1% H₂SO₄). Απεικονίζονται οι σειρές ενζυμικών φορτίων 6 mg/g DM (□), 9 mg/g DM (Δ), 12 mg/g DM (●), 15 mg/g DM (◇), 18 mg/g DM (x).

Το βέλτιστο ενζυμικό φορτίο για το Δείγμα Γ επιλέχθηκε ως 12 mg/g DM. Οι συγκεντρώσεις ολικών αναγωγικών σακχάρων και γλυκόζης παρουσιάζονται στον Πίνακα 6.4.

Πίνακας 6.4: Συγκέντρωση Γλυκόζης και Ολικών Αναγωγικών Σακχάρων στο βέλτιστο ενζυμικό φορτίο (12 mg/g DM) για το Δείγμα Γ (1% H₂SO₄)

| Χρόνος (h) | Συγκέντρωση Γλυκόζης (mg/mL) | Συγκέντρωση Ολικών αναγωγικών σακχάρων (mg/mL) |
|------------|------------------------------|--|
| 0h | 0.7 ± 0.01 | 0.8 ± 0.01 |
| 2h | 17.4 ± 0.21 | 17.6 ± 0.47 |
| 4h | 21.3 ± 0.89 | 19.5 ± 1.04 |
| 6h | 24.9 ± 0.82 | 28.4 ± 0.49 |
| 8h | 35.9 ± 0.21 | 30.6 ± 0.10 |
| 24h | 34.3 ± 0.55 | 33.3 ± 1.04 |
| 48h | 40.8 ± 0.34 | 39.5 ± 0.10 |
| 72h | 41.7 ± 0.62 | 43.0 ± 1.42 |

Η γραμμικότητα της απελευθέρωσης γλυκόζης στην αρχή του πειράματος (t=4h) είναι εμφανής και στο Δείγμα Γ. Η σχέση ωστόσο τείνει να είναι γραμμική ακόμα και ως τις 24h, καθώς η εμφάνιση του πλατώ συγκεντρώσεων υστερεί.

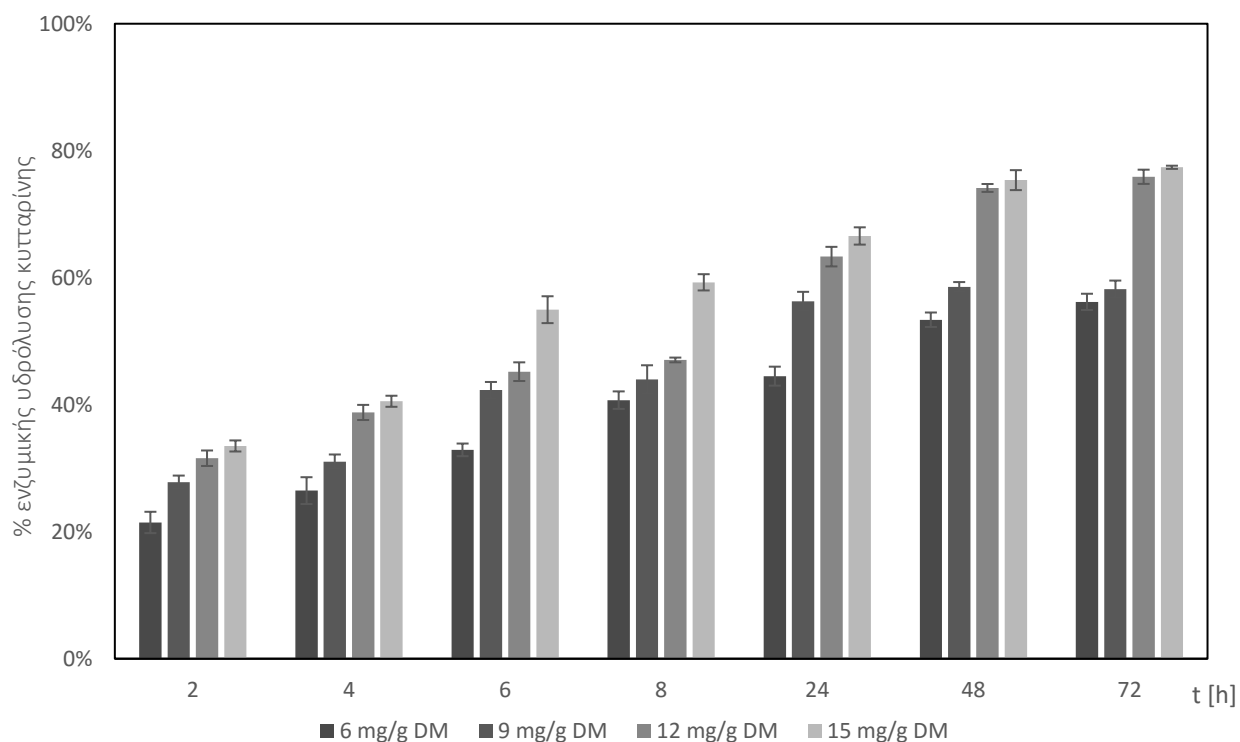


Διάγραμμα 6.11: Απελευθέρωση γλυκόζης στις 4h συναρτήσεως των ενζυμικών φορτίων για το Δείγμα Γ (1% H₂SO₄)

Όσον αφορά στην ποσοστιαία ενζυμική υδρόλυση της κυτταρίνης (Διάγραμμα 6.12), τα ποσοστά εμφανίζονται φαινομενικά σχετικά υψηλά (έως 77%). Ωστόσο δεν πρέπει να αμεληθεί το γεγονός ότι για την επίτευξη αυτού του αποτελέσματος θα απαιτηθεί μεγαλύτερο ποσό βιομάζας, καθώς αυτή περιέχει λιγότερη κυτταρίνη. Ενδεικτικά στον Πίνακα 6.5 παρουσιάζεται το ποσοστό υδρόλυσης της βιομάζας που επιτυγχάνεται στις 72h υδρόλυσης στο βέλτιστο ενζυμικό φορτίο για τα Δείγματα Α-Γ.

Πίνακας 6.5: Ποσοστιαία υδρόλυση βιομάζας στις 72h σε ενζυμικό φορτίο 12 mg/g DM για τα Δείγματα Α-Γ (προκατεργασία με έκρηξη ατμού) σε συγκέντρωση στερεών 10%

| Δείγμα | Ποσοστιαία υδρόλυση βιομάζας (%) |
|---|----------------------------------|
| Δείγμα Α (0% H ₂ SO ₄) | 44.2% |
| Δείγμα Β (0.2% H ₂ SO ₄) | 47.9% |
| Δείγμα Γ (1.0% H ₂ SO ₄) | 37.6% |



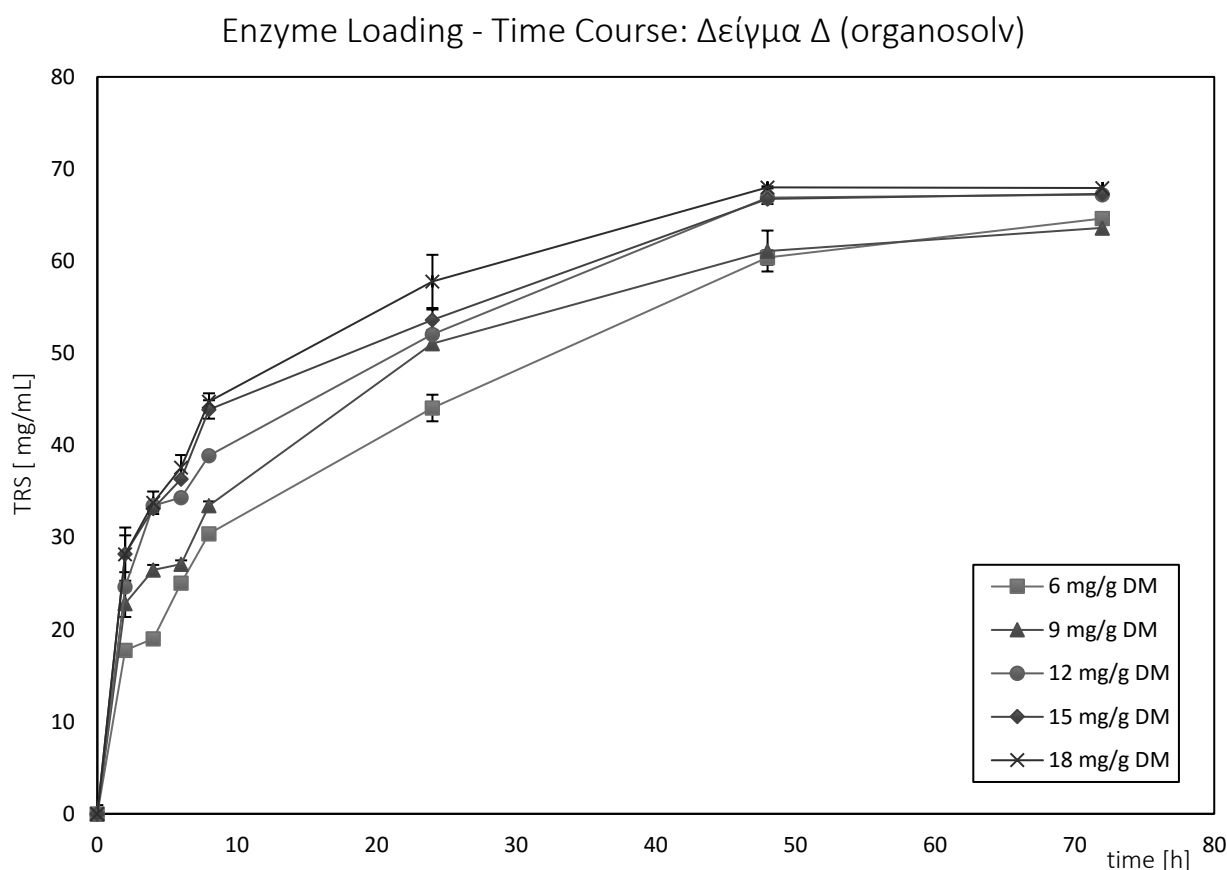
Διάγραμμα 6.12: Ποσοστιαία ενζυμική υδρόλυση κυτταρίνης για τα ενζυμικά φορτία συναρτήσει του χρόνου υδρόλυσης, για το Δείγμα Γ (1% H₂SO₄)

Από το Διάγραμμα 6.12 μπορεί να διαπιστωθεί εποπτικά η καθυστέρηση στην επίτευξη πλατώ και οι διαφορές στην απελευθέρωση γλυκόζης ανάμεσα στα διαφορετικά ενζυμικά φορτία ακόμα και σε μεγάλους χρόνους.

Τέλος, μελετήθηκε η ενζυμική υδρόλυση του Δείγματος Δ, το οποίο έχει προκατεργαστεί με τη μέθοδο organosolv. Η μελέτη του δείγματος αυτού γίνεται στη βάση σύγκρισης των

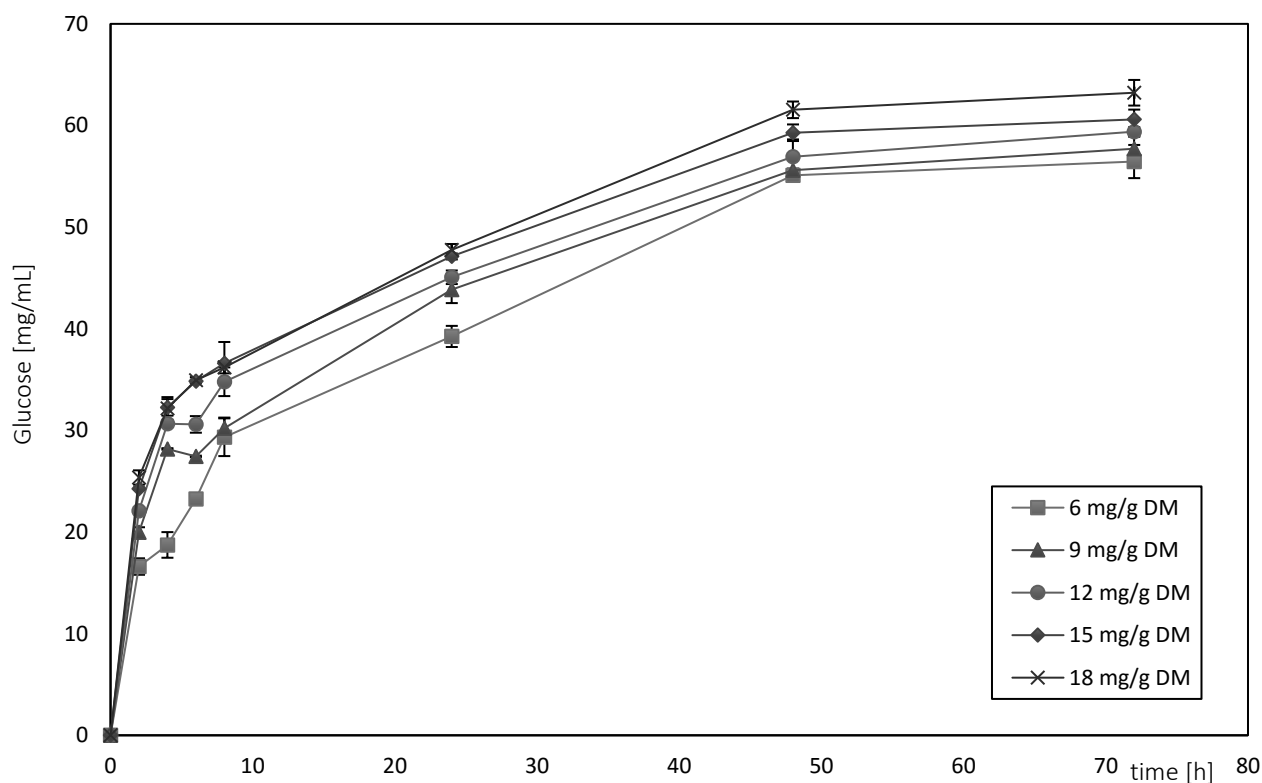
διαφορετικών μεθόδων προκατεργασίας και την εκτίμηση της αποτελεσματικότητας τους για τη συγκεκριμένη πρώτη ύλη (στέλεχος αραβοσίτου-corn stover). Υπενθυμίζεται ότι η μέθοδος organosolv στοχεύει στην εκχύλιση της λιγνίνης από τη βιομάζα σε αντίθεση με την έκρηξη ατμού που στοχεύει κυρίως στη διαλυτοποίηση της ημικυτταρίνης. Λόγω της απομάκρυνσης της λιγνίνης η βιομάζα γίνεται πιο πλούσια σε κυτταρίνη, ενώ οι περιοχές της κυτταρίνης γίνονται πιο προσβάσιμες στα υδρολυτικά ένζυμα. Δεν είναι εύκολο να θεωρηθεί εκ των προτέρων ποια μέθοδος προκατεργασίας θα είναι πιο αποτελεσματική, για το λόγο αυτό η συγκεκριμένη σειρά πειραμάτων παρουσιάζει ενδιαφέρον.

Οι συνθήκες του πειράματος υδρόλυσης ήταν ίδιες με των Δειγμάτων Α-Γ (έκρηξη ατμού). Παρακάτω παρουσιάζονται τα διαγράμματα χρονικής εξέλιξης της απελευθέρωσης ολικών αναγωγικών σακχάρων-TRS (Διάγραμμα 6.13) και γλυκόζης (Διάγραμμα 6.14) για τα διαφορετικά ενζυμικά φορτία, για το Δείγμα Δ (organosolv).



Διάγραμμα 6.13: Χρονική εξέλιξη της απελευθέρωσης ολικών αναγωγικών σακχάρων για το δείγμα Δ (organosolv). Απεικονίζονται οι σειρές ενζυμικών φορτίων 6 mg/g DM (□), 9 mg/g DM (Δ), 12 mg/g DM (●), 15 mg/g DM (◇), 18 mg/g DM (x).

Enzyme Loading - Time Course: Δείγμα Δ (organosolv)



Διάγραμμα 6.14: Χρονική εξέλιξη της απελευθέρωσης γλυκόζης για το δείγμα Δ (organosolv). Απεικονίζονται οι σειρές ενζυμικών φορτίων 6 mg/g DM (□), 9 mg/g DM (Δ), 12 mg/g DM (●), 15 mg/g DM (◇), 18 mg/g DM (x).

Αν και η επίτευξη του πλατώ συγκεντρώσεων στο Δείγμα Δ καθυστερεί σε σχέση με τα Δείγματα Α και Β (εμφανίζεται μετά τις 24h υδρόλυσης), το Δείγμα Δ παρουσιάζει τις μεγαλύτερες συγκεντρώσεις απελευθερούμενης γλυκόζης από όλα τα δείγματα. Τόσο η τελική όσο και οι περισσότερες ενδιάμεσες συγκεντρώσεις σακχάρων είναι υψηλότερες, ενώ ιδιαίτερο ενδιαφέρον παρουσιάζει το γεγονός ότι οι διαφορές συγκεντρώσεων ανάμεσα στα διαφορετικά ενζυμικά φορτία δεν είναι σημαντικές σε μεγάλους χρόνους. Αυτό είναι σημαντικό, καθώς είναι δυνατή η επίτευξη παρόμοιου αποτελέσματος υδρόλυσης με λιγότερη ποσότητα ενζύμου, σε περίπτωση που επιλεγεί η υδρόλυση να διαρκέσει άνω των 8h.

Λόγω της μικρής διαφοράς στην απελευθέρωση γλυκόζης ανάμεσα στα ενζυμικά φορτία, επιλέγεται ως βέλτιστο φορτίο η συγκέντρωση 9 mg/g DM. Η φαινομενική επιδεκτικότητα του Δείγματος Δ στην υδρόλυση επιτρέπει τη χρήση μικρότερου φορτίου από 12 mg/g DM που έχει επιλεγεί για τα λοιπά δείγματα. Οι απελευθερώσεις ολικών αναγωγικών σακχάρων και γλυκόζης στο βέλτιστο ενζυμικό φορτίο για το Δείγμα Δ παρουσιάζονται στον Πίνακα 6.5:

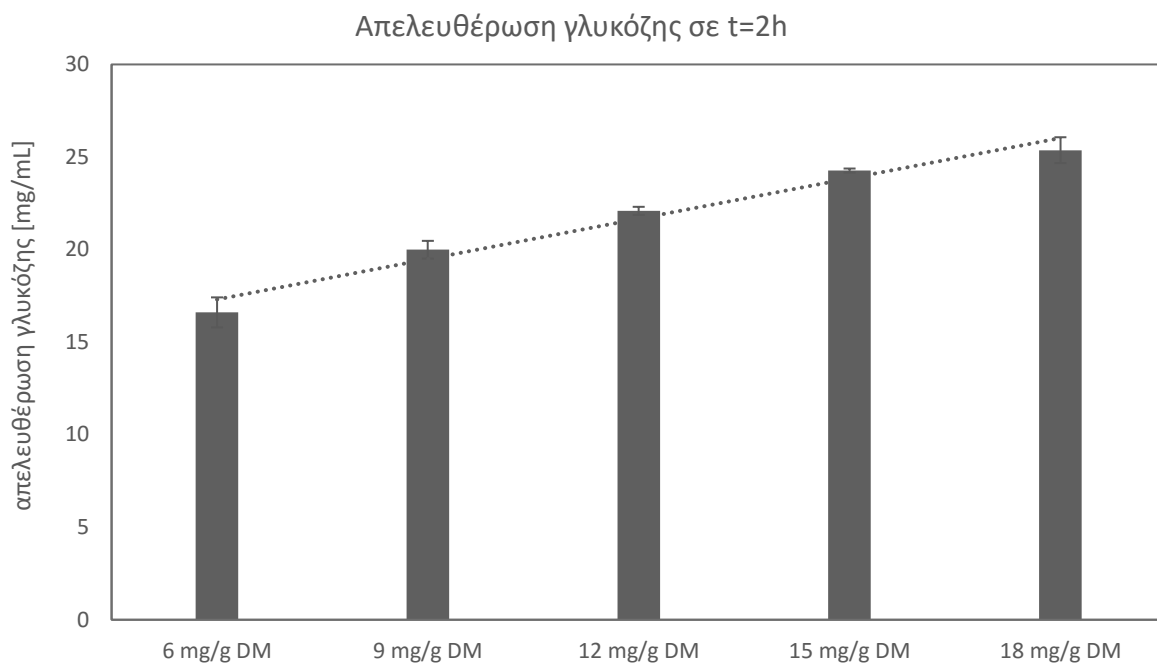
Πίνακας 6.5: Συγκέντρωση Γλυκόζης και Ολικών Αναγωγικών Σακχάρων στο βέλτιστο ενζυμικό φορτίο (9 mg/g DM) για το Δείγμα Δ (organosolv)

| Χρόνος (h) | Συγκέντρωση Γλυκόζης (mg/mL) | Συγκέντρωση Ολικών αναγωγικών σακχάρων (mg/mL) |
|------------|------------------------------|--|
| 0h | 0.7 ± 0.01 | 0.8 ± 0.01 |
| 2h | 20.0 ± 0.48 | 22.8 ± 0.50 |
| 4h | 28.2 ± 0.07 | 26.5 ± 1.44 |
| 6h | 27.4 ± 0.07 | 27.1 ± 0.56 |
| 8h | 30.2 ± 1.04 | 33.5 ± 0.42 |
| 24h | 43.9 ± 1.34 | 51.0 ± 0.44 |
| 48h | 55.6 ± 0.15 | 61.1 ± 0.67 |
| 72h | 57.7 ± 1.19 | 63.6 ± 2.22 |

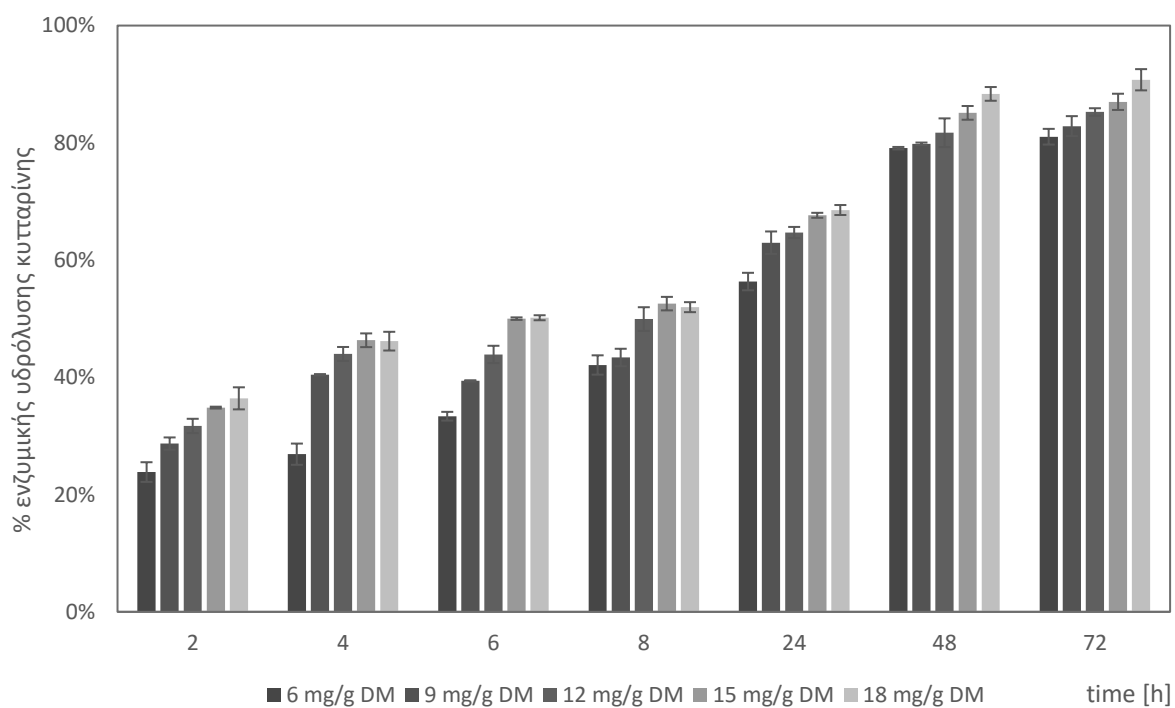
Παρατηρείται ότι η υδρόλυση έχει ταχύ ρυθμό κατά τις πρώτες ώρες του πειράματος και παρουσιάζει πλατώ προς το τέλος του εξεταζόμενου χρονικού διαστήματος. Μάλιστα, μέχρι τις 8h υδρόλυσης έχει επιτευχθεί περίπου το 50% της συνολικής απελευθέρωσης γλυκόζης.

Η υδρόλυση, ακόμα, παρουσιάζει γραμμικότητα σε σχέση με τα ενζυμικά φορτία σε αρχικούς χρόνους, πριν την έναρξη της παρεμπόδισης από το προϊόν. Στο παρακάτω διάγραμμα (Διάγραμμα 6.15) γίνεται εμφανής η γραμμική σχέση σε έναν αντιπροσωπευτικό χρόνο υδρόλυσης (2h).

Τέλος, στο Διάγραμμα 6.16 παρουσιάζεται η ποσοστιαία υδρόλυση κυτταρίνης για όλα τα ενζυμικά φορτία συναρτήσεως του χρόνου. Παρατηρείται ότι το ποσοστό υδρόλυσης κυτταρίνης προσεγγίζει πολύ υψηλές τιμές (ως και 90%), επομένως η συγκεκριμένη μέθοδος προκατεργασίας κρίνεται αποτελεσματική για την υδρόλυση της βιομάζας. Μάλιστα, πολύ υψηλές τιμές υδρόλυσης παρουσιάζονται από όλα τα ενζυμικά φορτία. Απομένει η μελέτη της παραγωγής αιθανόλης για να διαπιστωθεί και αν η συνολική απόδοση σε τελικό προϊόν είναι εξίσου ικανοποιητική για το Δείγμα Δ.



Διάγραμμα 6.15: Απελευθέρωση γλυκόζης στις 2h συναρτήσει των ενζυμικών φορτίων για το Δείγμα Δ (organosolv)

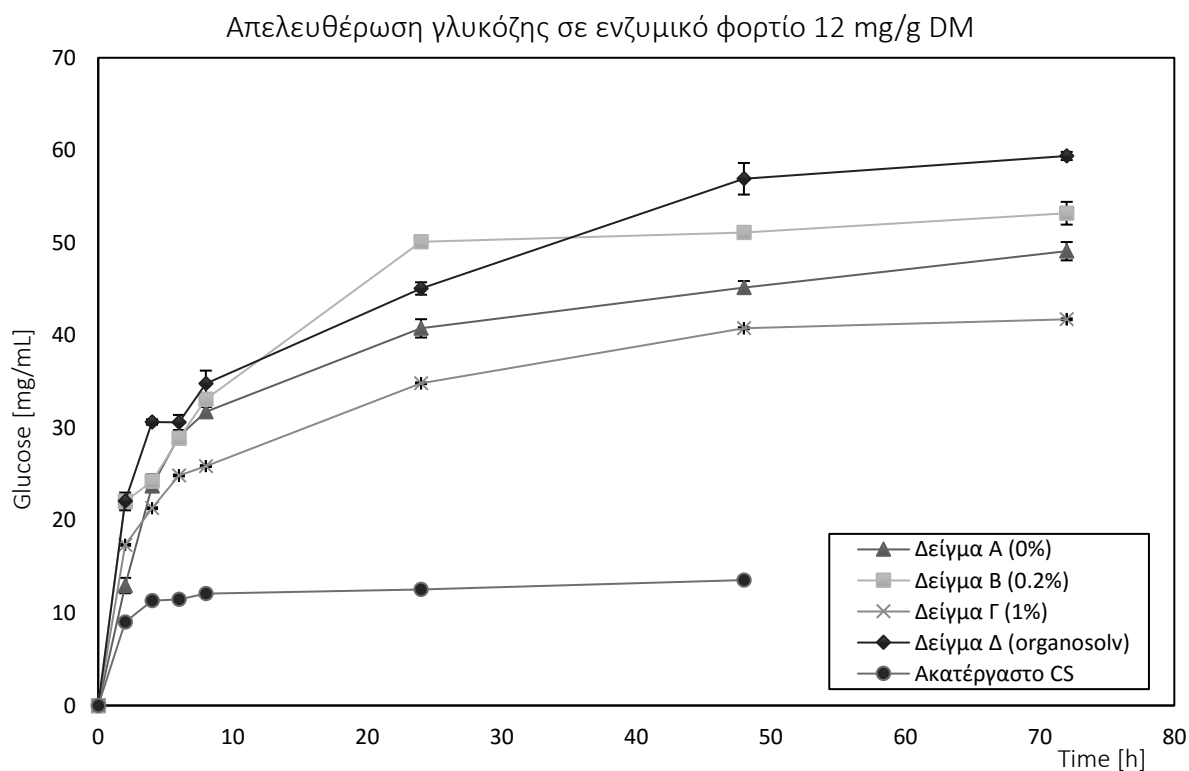


Διάγραμμα 6.16: Ποσοστιαία ενζυμική υδρόλυση κυτταρίνης για τα ενζυμικά φορτία συναρτήσει του χρόνου υδρόλυσης, για το Δείγμα Δ (organosolv)

Συνοπτικά, στο Διάγραμμα 6.17 και στον Πίνακα 6.6 παρουσιάζεται η χρονική εξέλιξη της συγκέντρωσης γλυκόζης για τα Δείγματα Α-Δ και για την ακατέργαστη πρώτη ύλη στο ενζυμικό φορτίο 12 mg/g DM. Γίνεται εμφανές ότι το στέλεχος αραβοσίτου δεν είναι δυνατόν να υδρολυθεί με αποτελεσματικότητα χωρίς να προηγηθεί η κατάλληλη προκατεργασία. Ακόμα, παρατηρείται πως πιο επιδεκτικά στην ενζυμική υδρόλυση είναι τα Δείγματα Β (0.2% H₂SO₄) και Δ (organosolv). Στην περίπτωση που η υψηλότερη απόδοση παρατηρηθεί και στο στάδιο δοκιμαστικής ζύμωσης, τα δείγματα αυτά θα επιλεγούν για υδρόλυση και ζύμωση σε υψηλές συγκεντρώσεις στερεών (high gravity) ώστε να επιτευχθούν μεγαλύτερες συγκεντρώσεις σακχάρων και άρα και αιθανόλης.

Πίνακας 6.6: Χρονική εξέλιξη της συγκέντρωσης γλυκόζης στο βέλτιστο ενζυμικό φορτίο (12 mg/g DM) για τα δείγματα Α-Δ και για την ακατέργαστη βιομάζα.

| Χρόνος (h) | Συγκέντρωση γλυκόζης (mg/mL) | | | | |
|------------|------------------------------|-------------|-------------|-------------|-------------|
| | CS | A | B | Γ | Δ |
| 0 | 0.7 ± 0.01 | 0.7 ± 0.01 | 0.7 ± 0.01 | 0.7 ± 0.01 | 0.7 ± 0.01 |
| 2 | 9.0 ± 0.03 | 13.0 ± 0.83 | 22.1 ± 0.96 | 17.4 ± 0.21 | 22.1 ± 0.22 |
| 4 | 11.3 ± 0.15 | 23.7 ± 0.50 | 24.2 ± 0.75 | 21.3 ± 0.89 | 30.6 ± 0.30 |
| 6 | 11.5 ± 0.15 | 29.1 ± 0.26 | 28.9 ± 0.34 | 24.9 ± 0.82 | 30.6 ± 0.82 |
| 8 | 12.1 ± 0.18 | 31.7 ± 0.51 | 33.1 ± 0.41 | 25.9 ± 0.21 | 34.8 ± 1.41 |
| 24 | 12.5 ± 0.10 | 40.8 ± 0.99 | 50.1 ± 0.14 | 34.8 ± 0.55 | 45.1 ± 0.67 |
| 48 | 13.6 ± 0.01 | 45.2 ± 0.70 | 51.1 ± 0.62 | 40.8 ± 0.34 | 56.9 ± 1.71 |
| 72 | - | 49.1 ± 0.99 | 53.2 ± 1.23 | 41.7 ± 0.62 | 59.4 ± 0.45 |



Διάγραμμα 6.17: Χρονική εξέλιξη της συγκέντρωσης γλυκόζης στο βέλτιστο ενζυμικό φορτίο (12 mg/g DM) για τα δείγματα Α-Δ και για την ακατέργαστη βιομάζα. Απεικονίζονται τα Δείγματα Α (Δ), Β (□), Γ (×), Δ (◇), και το ακατέργαστο corn stover (●).

Κεφάλαιο 7: Ζύμωση υδρολυμάτων

7.1 Ζύμωση υλικών προκατεργασμένων με έκρηξη ατμού

Πραγματοποιήθηκε δοκιμαστική ζύμωση για τα τέσσερα δείγματα, σε κωνικές φιάλες των 50 mL, στις βέλτιστες συνθήκες που είχαν προσδιοριστεί από τις προηγούμενες σειρές πειραμάτων. Η συγκέντρωση στερεών ήταν 10% και πιο συγκεκριμένα η ποσότητα βιομάζας ήταν 1.5 g και ο όγκος αραιωμένου κυτταρινολυτικού σκευάσματος 15mL. Για τα δείγματα προκατεργασίας με έκρηξη ατμού η προϋδρόλυση πραγματοποιήθηκε με ενζυμικό φορτίο 12mg ενζύμου/g DM, ενώ για το Δείγμα Δ (προκατεργασία organosolv) μελετήθηκαν τα ενζυμικά φορτία 9 mg ενζύμου/g DM και 12 mg ενζύμου/g DM. Η προϋδρόλυση διήρκεσε 12h και στο πέρας αυτής ελήφθη δείγμα για τη μέτρηση σακχάρων στο μίγμα της αντίδρασης. Η δειγματοληψία πραγματοποιήθηκε στις χρονικές στιγμές 8, 24, 48, 72, 96, 120h, όπου χρόνος μηδέν θεωρείται η στιγμή εισαγωγής του ζυμομύκητα στο μίγμα της αντίδρασης. Η αιθανόλη στο τελικό μίγμα μετρήθηκε μέσω υγρής χρωματογραφίας-HPLC.

Στον παρακάτω πίνακα (Πίνακας 7.1) παρουσιάζεται η χρονική εξέλιξη της συγκέντρωσης αιθανόλης για κάθε δείγμα.

Πίνακας 7.1: Χρονική εξέλιξη της συγκέντρωσης αιθανόλης (mg/mL) για τα Δείγματα Α-Γ κατά τη ζύμωση σε μικρή κλίμακα

| Χρόνος (h) | Συγκέντρωση αιθανόλης (mg/mL) | | |
|------------|---|---|---|
| | Δείγμα Α (0% H ₂ SO ₄) | Δείγμα Β (0.2% H ₂ SO ₄) | Δείγμα Γ (1.0% H ₂ SO ₄) |
| 0 | 0.0 | 0.0 | 0.0 |
| 8 | 6.4 | 5.4 | 3.6 |
| 24 | 19.4 | 18.7 | 12.3 |
| 48 | 19.3 | 21.2 | 15.1 |
| 72 | 20.2 | 19.7 | 16.5 |
| 96 | 18.3 | 21.7 | 17.3 |
| 120 | 21.2 | 22.7 | 18.4 |

Παρατηρείται ότι τα αποτελέσματα παραγωγής αιθανόλης συνάδουν με τα δεδομένα που αντλήθηκαν από την ενζυμική υδρόλυση. Έτσι, τα δείγματα Α και Β που επέδειξαν μεγαλύτερη επιδεκτικότητα στην υδρόλυση συνδέονται και με μεγαλύτερες αποδόσεις σε αιθανόλη.

Παράλληλα με τη συγκέντρωση αιθανόλης στο μίγμα αξίζει να μελετηθεί και η κατανάλωση γλυκόζης από τον *S. cerevisiae*, μέσω της πτώσης συγκέντρωσής της στο μίγμα της αντίδρασης. Τα αποτελέσματα της συγκέντρωσης γλυκόζης συναρτήσει του χρόνου για τα Δείγματα Α-Γ παρουσιάζονται στον πίνακα 7.2. Παρατηρείται ότι η προϋδρόλυση είναι πιο αποτελεσματική για τα δείγματα Α και Β, όπως είναι αναμενόμενο από τα πειράματα ενζυμικής υδρόλυσης που έχουν προηγηθεί. Λαμβάνοντας υπόψιν ότι η συντελεστής μετατροπής γλυκόζης σε αιθανόλη είναι 0.51, διαπιστώνεται ότι η τελική συγκέντρωση αιθανόλης για κάθε υλικό είναι λίγο

μεγαλύτερη από τη συγκέντρωση που θα προέκυπτε θεωρητικά αν η αρχική γλυκόζη του μίγματος μετατρεπόταν πλήρως σε αιθανόλη. Αυτό εξηγείται, καθώς τα κυτταρινολυτικά ένζυμα είναι παρόντα στο μίγμα καθ' όλη τη διάρκεια της ζύμωσης. Με την πάροδο του χρόνου, γλυκόζη καταναλώνεται από τον αιθανολοπαραγωγό μικροοργανισμό και η παρεμπόδιση των ενζύμων από τη γλυκόζη αναστέλλεται. Έτσι περισσότερη κυτταρίνη υδρολύεται προς γλυκόζη σε μια διεργασία ταυτόχρονης σακχαροποίησης και ζύμωσης (Simultaneous Saccharification and Fermentation- SSF).

Πίνακας 7.2: Χρονική εξέλιξη της συγκέντρωσης γλυκόζης (mg/mL) για τα Δείγματα Α-Γ κατά τη ζύμωση σε μικρή κλίμακα

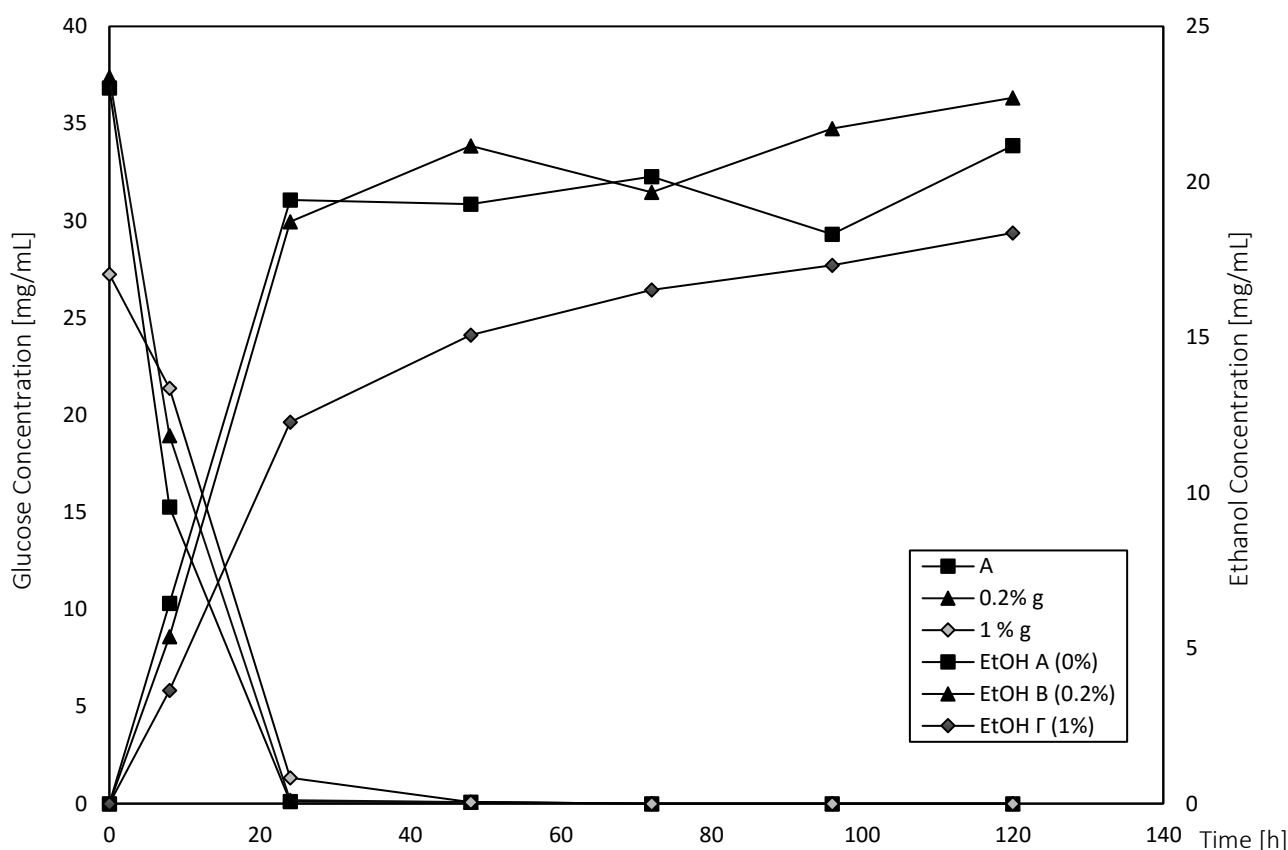
| Χρόνος (h) | Συγκέντρωση γλυκόζης (mg/mL) | | |
|------------|---|---|---|
| | Δείγμα Α (0% H ₂ SO ₄) | Δείγμα Β (0.2% H ₂ SO ₄) | Δείγμα Γ (1.0% H ₂ SO ₄) |
| 0 | 36.8 ± 1.67 | 37.4 ± 0.08 | 27.2 ± 0.87 |
| 8 | 15.2 ± 0.24 | 18.9 ± 0.21 | 21.3 ± 0.14 |
| 24 | 0.11 ± 0.03 | 0.18 ± 0.01 | 1.34 ± 0.08 |
| 48 | 0.08 ± 0.04 | 0.08 ± 0.09 | 0.08 ± 0.05 |
| 72 | 0.03 ± 0.01 | 0.02 ± 0.01 | 0.05 ± 0.01 |
| 96 | 0.02 ± 0.01 | 0.01 ± 0.01 | 0.03 ± 0.01 |
| 120 | 0.00 ± 0.01 | 0.00 ± 0.01 | 0.00 ± 0.01 |

Όσον αφορά τη χρονική εξέλιξη της συγκέντρωσης αιθανόλης, παρατηρείται για όλα τα δείγματα απότομη αύξηση της συγκέντρωσης αιθανόλης μέχρι τις 24h, ενώ στη συνέχεια τείνει να εμφανιστεί πλατώ. Σε μεγάλους χρόνους, η ζυμομύκτης καταναλώνει όση γλυκόζη παράγεται από τη διεργασία SSF, καθώς τα σάκχαρα της προϋδρόλυσης έχουν ήδη καταναλωθεί. Η ταχύτητα της υδρόλυσης μπορεί να θεωρηθεί εποπτικά μέσω της παραγωγικότητας αιθανόλης για κάθε χρονικό διάστημα (Πίνακας 7.3). Παρατηρείται ότι ο ρυθμός παραγωγής αιθανόλης είναι χαμηλός σε μεγάλους χρόνους (επίτευξη πλατώ).

Πίνακας 7.3: Παραγωγικότητα αιθανόλης (mg/mL/h) για τα Δείγματα Α-Γ κατά τη ζύμωση σε μικρή κλίμακα

| Χρόνος (h) | Παραγωγικότητα αιθανόλης (mg/mL/h) | | |
|------------|---|---|---|
| | Δείγμα Α (0% H ₂ SO ₄) | Δείγμα Β (0.2% H ₂ SO ₄) | Δείγμα Γ (1.0% H ₂ SO ₄) |
| 8 | 0.81 | 0.67 | 0.46 |
| 24 | 0.81 | 0.78 | 0.51 |
| 48 | 0.40 | 0.44 | 0.31 |
| 72 | 0.28 | 0.27 | 0.23 |
| 96 | 0.19 | 0.23 | 0.18 |
| 120 | 0.18 | 0.19 | 0.15 |

Γενικώς, παρατηρείται πως η τελική συγκέντρωση αιθανόλης σε όλα τα δείγματα είναι μικρότερη από το θεωρητικό όριο του 4% w/w που απαιτείται για να είναι ο διαχωρισμός της από το υδατικό μίγμα βιώσιμος. Οι τελικές συγκεντρώσεις για τα Δείγματα Α, Β, Γ είναι 2.1% w/w, 2.2% w/w και 1.8% w/w αντίστοιχα. Η παρατήρηση αυτή δεν είναι αναπάντεχη, καθώς η χαμηλή συγκέντρωση στερεών (10%) δεν αναμένεται να οδηγήσει σε αυξημένες συγκεντρώσεις αιθανόλης. Ανάμεσα στα δείγματα, καλύτερη συμπεριφορά φαίνεται να εμφανίζει το Δείγμα Β (0.2% H₂SO₄), κάτι που ενισχύει την πιθανότητα επιλογής του για υδρόλυση και ζύμωση σε μεγάλη κλίμακα. Τα παραπάνω παρουσιάζονται εποπτικά στο Διάγραμμα 7.1, όπου απεικονίζεται η χρονική εξέλιξη γλυκόζης και αιθανόλης κατά τη ζύμωση για όλα τα δείγματα.



Διάγραμμα 7.1: Χρονική εξέλιξη γλυκόζης και αιθανόλης κατά τη ζύμωση για τα προκατεργασμένα υλικά με έκρηξη ατμού. Απεικονίζονται τα δείγματα Α (□), Β (Δ) και Γ (◇). Η υδρόλυση πραγματοποιήθηκε σε ενζυμικό φορτίο 12 mg/g DM.

7.2 Ζύμωση υλικού προκατεργασμένου με τη μέθοδο organosolv

Το Δείγμα Δ υποβλήθηκε σε δοκιμαστική ζύμωση σε μικρή κλίμακα στις ίδιες συνθήκες με τα δείγματα που προκατεργάστηκαν με έκρηξη ατμού. Κατά την ενζυμική υδρόλυση μελετήθηκαν τα φορτία 9 mg/g DM και 12 mg/g DM.

Στον παρακάτω πίνακα (Πίνακας 7.4) εμφανίζονται οι συγκεντρώσεις γλυκόζης και αιθανόλης συναρτήσει του χρόνου και για τα δύο ενζυμικά φορτία.

Πίνακας 7.4: Χρονική εξέλιξη των συγκεντρώσεων γλυκόζης και αιθανόλης για τα διαφορετικά ενζυμικά φορτία, για το Δείγμα Δ (organosolv)

| Χρόνος (h) | Φορτίο 9 mg/g DM | | Φορτίο 12 mg/g DM | |
|------------|------------------|--------------|-------------------|--------------|
| | Glucose (mg/mL) | EtOH (mg/mL) | Glucose (mg/mL) | EtOH (mg/mL) |
| 0 | 33.6 ± 0.70 | 0.0 | 35.4 ± 0.20 | 0.0 |
| 8 | 17.7 ± 0.50 | 3.6 | 22.7 ± 0.30 | 4.5 |
| 24 | 1.5 ± 0.02 | 11.0 | 1.5 ± 0.01 | 12.8 |
| 48 | 0.2 ± 0.01 | 12.5 | 0.19 ± 0.01 | 13.4 |
| 72 | 0.0 | 12.9 | 0.0 | 14.5 |
| 96 | 0.0 | 13.2 | 0.0 | 15.4 |

Παρατηρείται πως τα διαφορετικά ενζυμικά φορτία δεν έχουν πολύ μεγάλη επίδραση στην τελική παραγωγή αιθανόλης, η οποία φθάνει σε συγκεντρώσεις 1.3% και 1.5% για τα φορτία 9 mg/g DM και 12 mg/g DM, αντίστοιχα. Όπως είναι αναμενόμενο, η απόδοση σε αιθανόλη είναι λίγο υψηλότερη για το μεγαλύτερο ενζυμικό φορτίο, λόγω της μεγαλύτερης αρχικής συγκέντρωσης σακχάρων και της παραγωγής γλυκόζης με διεργασία SSF κατά τη διάρκεια της ζύμωσης. Αυτό γίνεται εμφανές από το Διάγραμμα 7.2, όπου απεικονίζονται οι συγκεντρώσεις αιθανόλης και γλυκόζης για τα δύο φορτία συναρτήσει του χρόνου ζύμωσης.

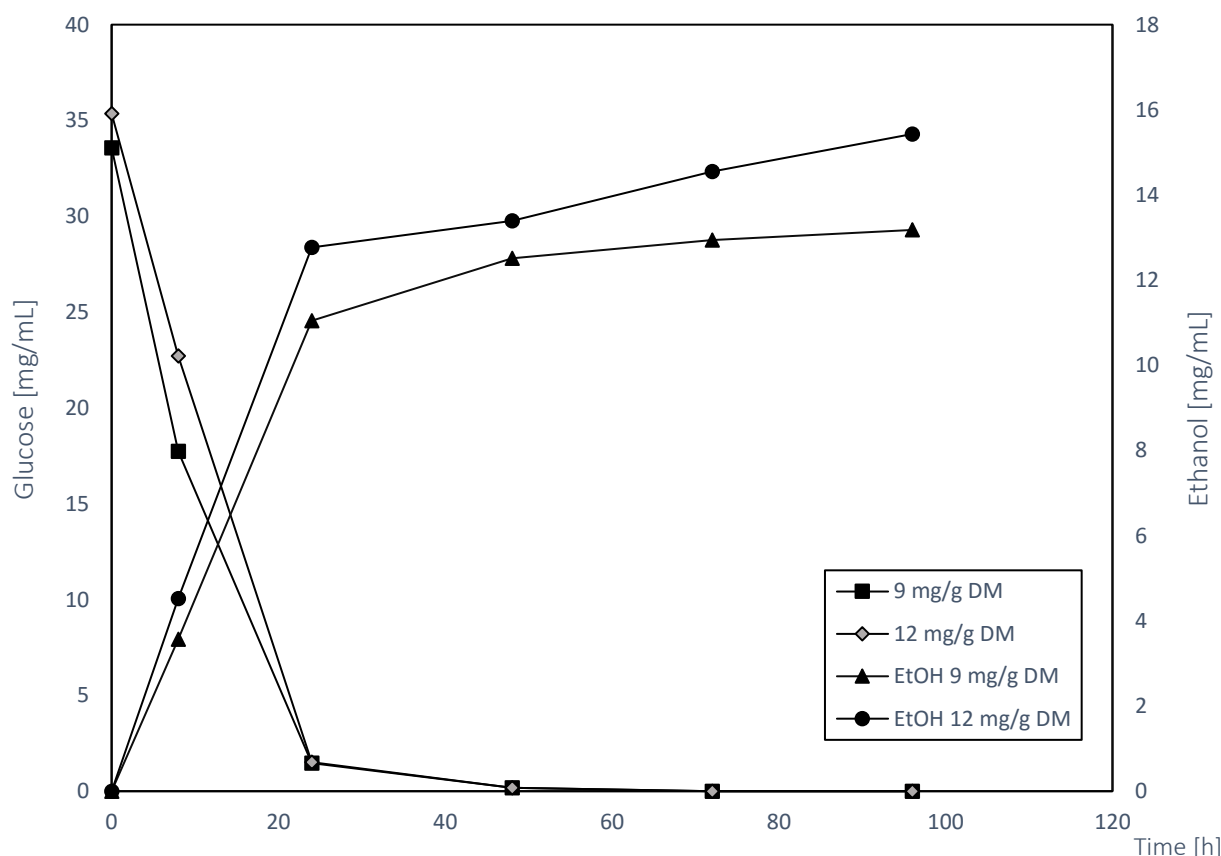
Η ποιοτική συμπεριφορά του δείγματος organosolv είναι παρόμοια με των δειγμάτων που κατεργάστηκαν με έκρηξη ατμού. Έτσι, ο ρυθμός παραγωγής αιθανόλης είναι υψηλός στην αρχή του πειράματος ενώ μειώνεται σε μεγάλους χρόνους και εμφανίζεται πλατώ συγκεντρώσεων. Η παραγωγικότητα αιθανόλης για τα δύο ενζυμικά φορτία παρουσιάζεται στον Πίνακα 7.5.

Πίνακας 7.5: Παραγωγικότητα αιθανόλης (mg/mL/h) για το Δείγμα Δ και τα ενζυμικά φορτία 9 mg/g DM και 12 mg/g DM κατά τη ζύμωση σε μικρή κλίμακα

| Χρόνος (h) | Παραγωγικότητα αιθανόλης (mg/mL/h) | |
|------------|------------------------------------|-------------------|
| | Φορτίο 9 mg/g DM | Φορτίο 12 mg/g DM |
| 8 | 0.45 | 0.57 |
| 24 | 0.46 | 0.53 |
| 48 | 0.26 | 0.28 |
| 72 | 0.18 | 0.20 |
| 96 | 0.14 | 0.16 |

Στις σειρές πειραμάτων ενζυμικής υδρόλυσης δείχθηκε ότι η απόδοση του Δείγματος Δ (organosoln) σε γλυκόζη κατά την υδρόλυση κυμαίνεται σε παρόμοια επίπεδα με του Δείγματος Β. Παρ' όλα αυτά, φαίνεται ότι η απόδοση σε αιθανόλη του Δείγματος Δ δεν είναι εξίσου ικανοποιητική με του Δείγματος Β. Για ενζυμικό φορτίο 12mg/ g DM και ίδιο ποσοστό αρχικών στερεών στα Δείγματα Β και Δ επιτυγχάνεται μέγιστη συγκέντρωση 22.7 mg/mL και 15.4 mg/mL, αντίστοιχα. Μάλιστα, η επίτευξη συγκέντρωσης σακχάρων κατά την προϋδρόλυση στα δύο δείγματα ήταν παρόμοια, με αντίστοιχες συγκεντρώσεις 37.4 mg/mL και 35.4 mg/mL. Επομένως, η υστέρηση του Δείγματος Δ αποδίδεται στη διεργασία της ζύμωσης και όχι της υδρόλυσης. Ενδέχεται στο δείγμα που έχει κατεργαστεί με τη μέθοδο organosoln να περιέχονται παρεμποδιστές της ζύμωσης, οι οποίοι δεν έχουν απομακρυνθεί πλήρως με τη διαδικασία της πλύσης και περιορίζουν την ανάπτυξη του αιθανολοπαραγωγού μικροοργανισμού. Είναι επίσης πιθανό οι συνθήκες αερισμού στο συγκεκριμένο πείραμα να μην ήταν ιδεώδεις, με αποτέλεσμα η παρουσία οξυγόνου να οδήγησε στην παραγωγή άλλων προϊόντων μεταβολισμού (π.χ. οξικό οξύ) αντί για την αιθανόλη που παράγεται αναερόβια.

Τα παραπάνω εμφανίζονται εποπτικά στο Διάγραμμα 7.2, (χρονική εξέλιξη συγκεντρώσεων αιθανόλης και γλυκόζης για τα δύο ενζυμικά φορτία).



Διάγραμμα 7.2: Χρονική εξέλιξη γλυκόζης και αιθανόλης κατά τη ζύμωση για το προκατεργασμένο υλικό με τη μέθοδο organosoln. Απεικονίζονται η κατανάλωση γλυκόζης στα ενζυμικά φορτία 9 mg/g DM (□) και 12 mg/g DM (◇) και η απελευθέρωση αιθανόλης στα ενζυμικά φορτία 9 mg/g DM (Δ) και 12 mg/g DM (●).

Κεφάλαιο 8: Υδρόλυση και ζύμωση σε υψηλές συγκεντρώσεις στερεών- high gravity

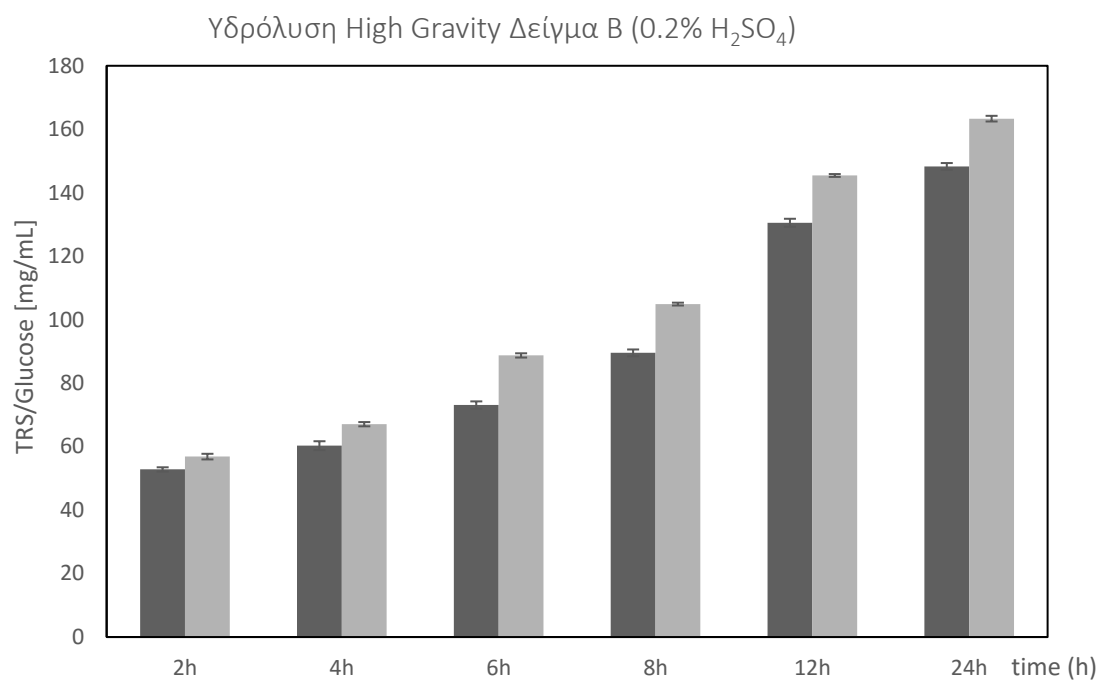
8.1 Σακχαροποίηση σε αντιδραστήρα free fall mixer

Προκειμένου ο διαχωρισμός της αιθανόλης από το τελικό μίγμα της ζύμωσης να είναι αποδοτικός, είναι απαραίτητο να ξεπεραστεί το όριο συγκέντρωσης αιθανόλης 4% w/w σε αυτό, κάτι που απαιτεί υψηλές συγκεντρώσεις στερεών στο στάδιο της ενζυμικής υδρόλυσης. Όπως έχει αναφερθεί, η υψηλή συγκέντρωση στερεών στα συμβατικά συστήματα οδηγεί σε προβλήματα ανάδευσης, δυσχεραίνει τα φαινόμενα μεταφοράς και άρα και την ενζυμική υδρόλυση. Για το λόγο αυτό χρησιμοποιήθηκε αναδευτήρας ελεύθερης πτώσης (free fall mixer) για τη μελέτη της υδρόλυσης σε μεγαλύτερες συγκεντρώσεις στερεών.

Επιλέχθηκαν να μελετηθούν σε υψηλές συγκεντρώσεις στερεών (high gravity) δύο υλικά από τα Δείγματα Α-Δ, τα οποία είχαν επιδείξει την καλύτερη συμπεριφορά στα πειράματα υδρόλυσης και ζύμωσης σε μικρή κλίμακα. Έτσι, από τα προκατεργασμένα υλικά με έκρηξη ατμού επιλέχθηκε το Δείγμα Β και, για λόγους σύγκρισης των δύο μεθόδων προκατεργασίας αποφασίστηκε να μελετηθεί και το δείγμα Δ (organosolv). Η προϋδρόλυση στον αναδευτήρα ελεύθερης πτώσης πραγματοποιήθηκε συνολικά για 24h, στους 50°C. Ελήφθησαν δείγματα για τη μέτρηση της συγκέντρωσης σακχάρων και για τη μελέτη του ιξώδους στις χρονικές στιγμές 2, 4, 6, 8, 12, 24h. Ακόμα, ελήφθησαν από τον αντιδραστήρα υδρολύματα προς ζύμωση στις 12h προϋδρόλυσης και στις 24h προϋδρόλυσης. Στην περίπτωση του Δείγματος Β, σε δύο εκ των κωνικών φιαλών της ζύμωσης προστέθηκε ένζυμο (+6 mg/g DM) για να μελετηθεί η επίδραση της προσθήκης ενζύμου στην απόδοση της διεργασίας.

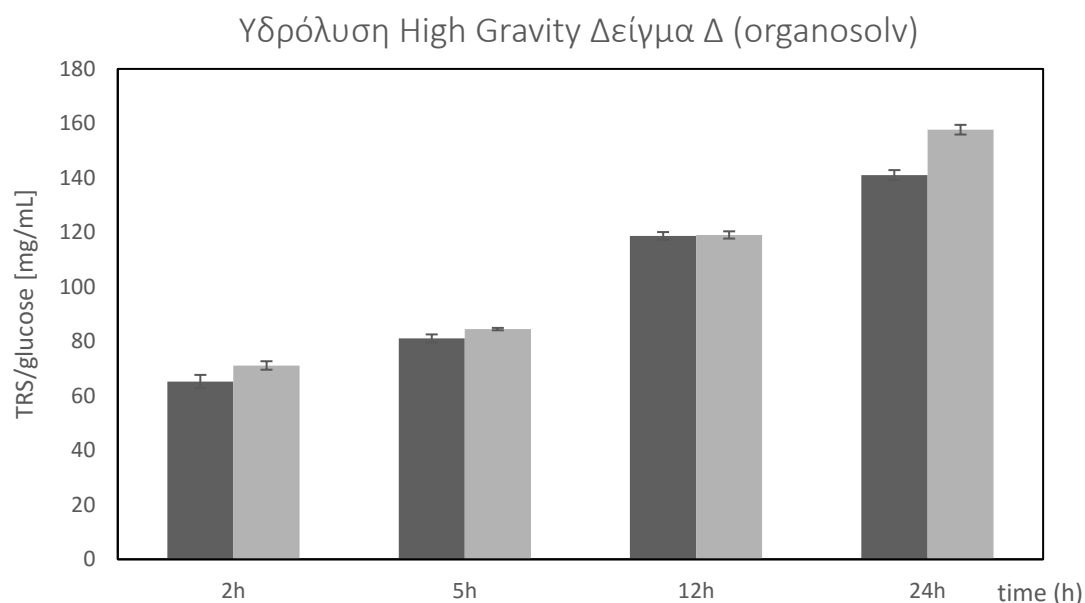
Στο παρακάτω διάγραμμα (Διάγραμμα 8.1) παρουσιάζεται η χρονική εξέλιξη της συγκέντρωσης ολικών αναγωγικών σακχάρων και γλυκόζης κατά την προϋδρόλυση στον αναδευτήρα ελεύθερης πτώσης για το Δείγμα Β.

Παρατηρείται ότι η αύξηση της συγκέντρωσης των σακχάρων στο υδρόλυμα είναι συνεχής και σχεδόν γραμμική με την πάροδο του χρόνου. Αξίζει να αναφερθεί ότι οι συγκεντρώσεις γλυκόζης που λαμβάνονται σε συνθήκες high gravity είναι κατά πολύ υψηλότερες από τις συγκεντρώσεις που επιτεύχθηκαν με συγκέντρωση στερεών 10%. Ενδεικτικά, κατά την υδρόλυση σε μικρή κλίμακα σε ενζυμικό φορτίο 12 mg/g DM στις 24h υδρόλυσης η συγκέντρωση γλυκόζης ήταν 51 mg/mL. Στο πείραμα high gravity η συγκέντρωση αυτή παρατηρήθηκε μόλις στις 2h υδρόλυσης ενώ η τελική συγκέντρωση γλυκόζης (163 mg/mL) ήταν κατά περίπου 300% υψηλότερη. Η πολύ υψηλότερη συγκέντρωση σακχάρων είναι συμφέρουσα και προοιωνίζει μεγάλες συγκεντρώσεις αιθανόλης μετά τη ζύμωση.



Διάγραμμα 8.1: Συγκέντρωση ολικών αναγωγικών σακχάρων- TSR (γκρι) και γλυκόζης (μαύρο) συναρτήσει του χρόνου κατά την υδρόλυση σε υψηλές συγκεντρώσεις στερεών του Δείγματος Β (0.2% H₂SO₄)

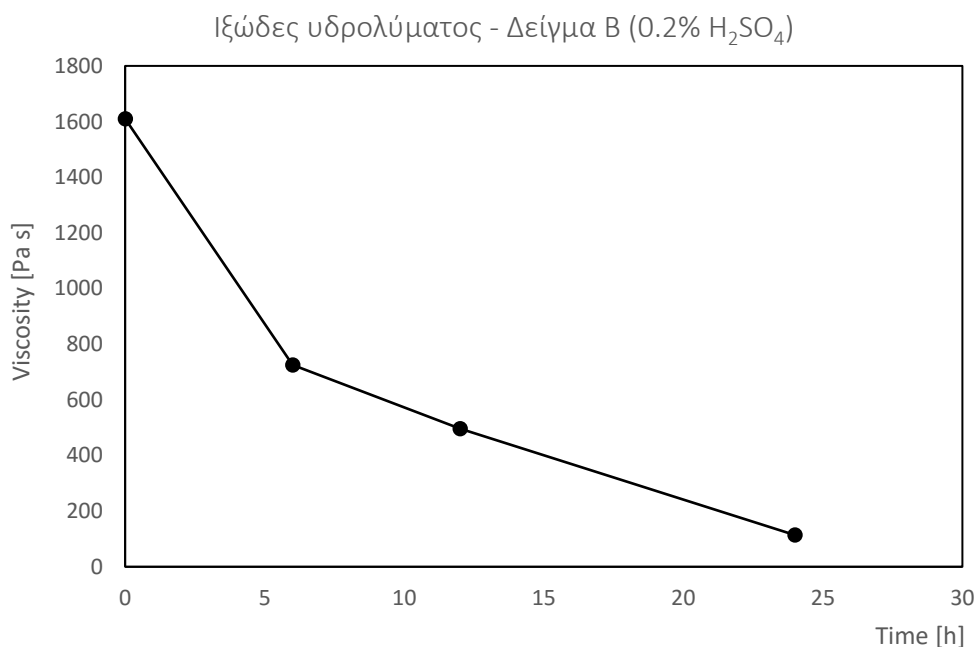
Ανάλογη συμπεριφορά στις υψηλές συγκεντρώσεις στερεών παρουσιάζει και το Δείγμα Δ (organosolv), στο οποίο επιτεύχθηκαν πολύ υψηλές τελικές συγκεντρώσεις σακχάρων. Αναλυτικότερα, στο Διάγραμμα 8.2 παρουσιάζεται η χρονική εξέλιξη της συγκέντρωσης ολικών αναγωγικών σακχάρων και γλυκόζης κατά την προϋδρόλυση στον αναδευτήρα ελεύθερης πτώσης για το Δείγμα Δ.



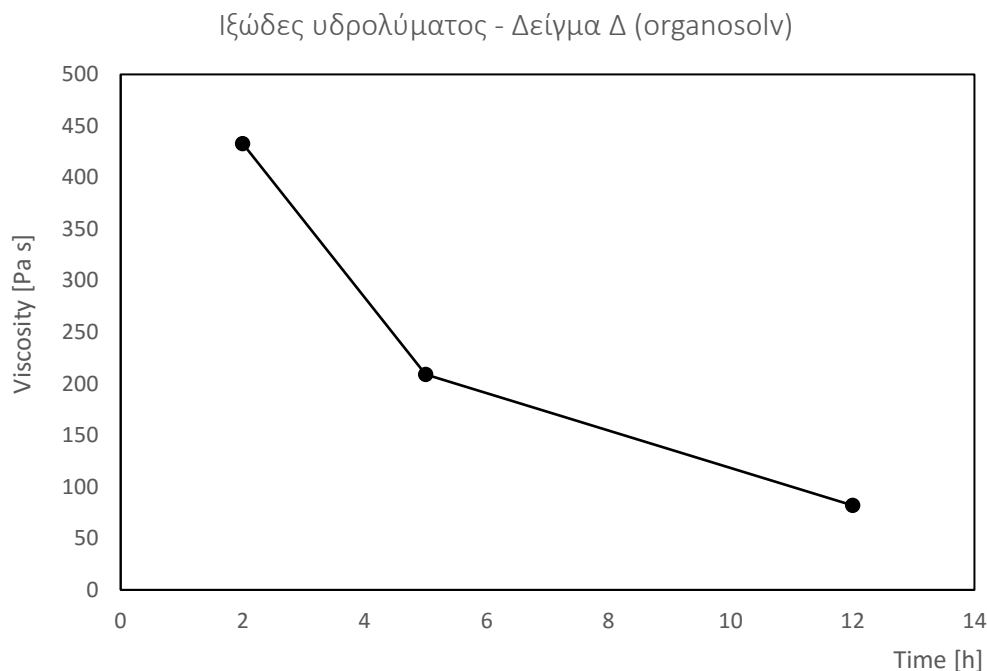
Διάγραμμα 8.2: Συγκέντρωση ολικών αναγωγικών σακχάρων- TSR (γκρι) και γλυκόζης (μαύρο) συναρτήσει του χρόνου κατά την υδρόλυση σε υψηλές συγκεντρώσεις στερεών του Δείγματος Δ (organosolv)

Παρατηρείται ότι η απελευθέρωση σακχάρων στην περίπτωση του Δείγματος Δ (organosolv) είναι μικρότερη της αντίστοιχης του Δείγματος Β (0.2% H₂SO₄). Αυτό αφενός εξηγείται λόγω της διαφοράς στο ενζυμικό φορτίο που χρησιμοποιήθηκε. Υπενθυμίζεται ότι η υδρόλυση σε υψηλές συγκεντρώσεις στερεών του Δείγματος Β πραγματοποιήθηκε με φορτίο 12 mg/g DM, ενώ η υδρόλυση του Δείγματος Δ έλαβε χώρα με φορτίο 9 mg/g DM. Παράλληλα, αν και η ποσοστιαία συγκέντρωση στερεών ήταν η ίδια και για τα δύο δείγματα, η ποσότητα του υλικού που υδρολύθηκε από το Δείγμα Β (120 g DM) ήταν σχεδόν διπλάσια του Δείγματος Δ (63 g DM). Η παρουσία λιγότερου υλικού στον αναδευτήρα ελεύθερης πτώσης δυσχεραίνει μερικώς την ανάδευση, με αποτέλεσμα η υδρόλυση να μην είναι πάντα πλήρως αποτελεσματική. Τέλος, ενδέχεται με περαιτέρω υδρόλυση του Δείγματος Δ να προέκυπτε μεγαλύτερη συγκέντρωση σακχάρων. Όπως δείχθηκε στην ενζυμική υδρόλυση μικρής κλίμακας το Δείγμα Δ παρουσιάζει πλατώ συγκεντρώσεων μετά τις 24h, ενώ τα δείγματα που κατεργάστηκαν με έκρηξη ατμού παρουσιάζουν ήδη πλατώ από τις 24h. Δεν πρέπει να αμεληθεί και η πιθανότητα ύπαρξης παρεμποδιστών της ζύμωσης στο Δείγμα Δ, όπως υποδεικνύεται και από το πείραμα δοκιμαστικής του ζύμωσης.

Παράλληλα, μελετήθηκε το ιξώδες του μίγματος στα χρονικά διαστήματα της υδρόλυσης με χρήση του ιξωδόμετρου Anton Paar Physica MCR rheometer. Το ιξώδες παρουσιάζει πτώση καθώς εξελίσσεται η υδρόλυση, με αυξανόμενους ρυθμούς διάτμησης όπως τα μη νευτωνικά ρευστά. Η χρονική εξέλιξη του ιξώδους του μίγματος για το Δείγμα Β και για το Δείγμα Δ παρουσιάζεται στα Διαγράμματα 8.3 και 8.4, αντίστοιχα.



Διάγραμμα 8.3: Εξέλιξη δυναμικού ιξώδους κατά την υδρόλυση High Gravity του Δείγματος Β (0.2% H₂SO₄)



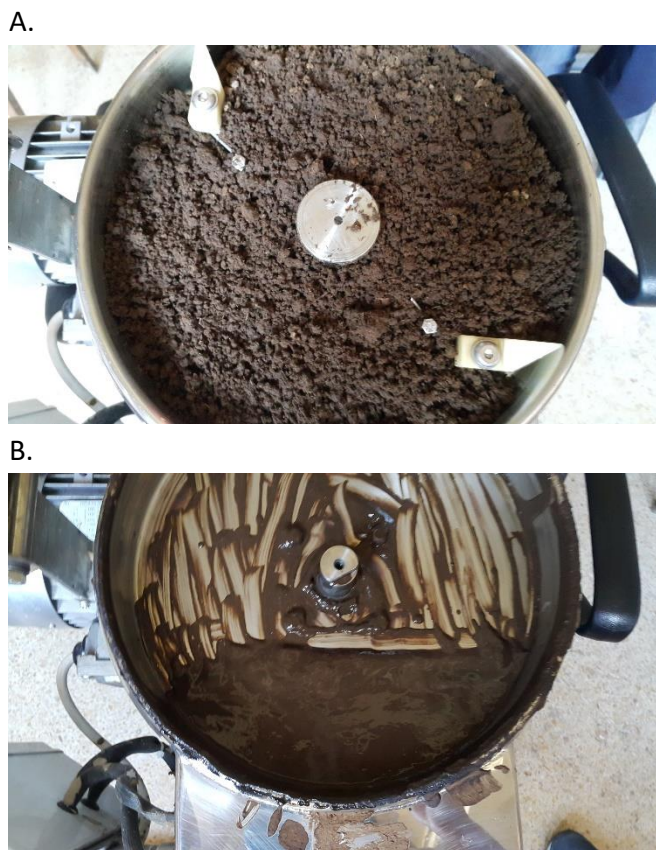
Διάγραμμα 8.4: Εξέλιξη δυναμικού ιξώδους κατά την υδρόλυση High Gravity του Δείγματος Δ (organosolv)

Για το Δείγμα Β (0.2% H_2SO_4) παρουσιάζεται μεγάλη πτώση ιξώδους στις πρώτες 6h υδρόλυσης, η οποία συνεχίζεται μέχρι την ολοκλήρωση του πειράματος στις 24h. Από την αρχική τιμή των 1610 Pa·s το φαινόμενο ιξώδες προσεγγίζει υποδεκαπλάσια τιμή (114 Pa·s). Μάλιστα, το ιξώδες φθάνει στο 50% της αρχικής τιμής στις πρώτες 6h, ενώ η ρευστοποίηση συνεχίζει γραμμικά ως το πέρας της προϋδρόλυσης.

Παρόμοια τάση παρουσιάζεται και στο δείγμα Δ (organosolv), όπου το ιξώδες υποδιπλασιάζεται από τις πρώτες κίολας ώρες της υδρόλυσης. Το ιξώδες είναι ιδιαίτερος χαμηλό στις 12h, χαμηλότερο και από την αντίστοιχη τιμή των 24h του Δείγματος Β. Η ρευστοποίηση είναι τόσο εκτεταμένη στις 24h υδρόλυσης του Δείγματος Δ που δεν είναι εφικτή η μέτρηση του ιξώδους με την παρούσα μέθοδο.

Τα αποτελέσματα μέτρησης ιξώδους συνάδουν με τις μετρήσεις απελευθερούμενης γλυκόζης και αναγωγικών σακχάρων στο υδρόλυμα. Με την πάροδο του χρόνου, η βιομάζα υδρολύεται προς γλυκόζη, με αποτέλεσμα να μειώνεται το ιξώδες και να παρατηρείται ακόμα και μακροσκοπικά η ρευστοποίηση. Ας σημειωθεί ότι το ιξώδες του υδρολύματος επηρεάζεται εν μέρει από τη γλυκόζη, επομένως η μείωση της συγκέντρωσης των σακχάρων κατά τη ζύμωση αναμένεται να οδηγήσει σε ακόμα μεγαλύτερη ρευστοποίηση.

Η μείωση του ιξώδους οφείλεται στην αποδόμηση της βιομάζας και την απώλεια της ικανότητάς της να συγκρατεί υγρασία. Η ρευστοποίηση του μίγματος είναι ιδιαίτερα εμφανής όπως φαίνεται στο Σχήμα 8.1, όπου παρουσιάζεται το μίγμα στην αρχή της υδρόλυσης (Α) και με το πέρας αρκετών ωρών υδρόλυσης (Β).



Σχήμα 8.1: Ρευστοποίηση μίγματος κατά την ενζυμική υδρόλυση σε συνθήκες υψηλής αρχικής συγκέντρωσης στερεών (high gravity). Α: Αρχική μορφή μίγματος, Β: μορφή μίγματος μετά την πάροδο 12h υδρόλυσης.

8.2 Προσδιορισμός παραγόμενης αιθανόλης

8.2.1 Προσδιορισμός παραγόμενης αιθανόλης για το Δείγμα Β (0.2% H_2SO_4)

Από τον αντιδραστήρα ελεύθερης πτώσης ελήφθη υδρολυμένο υλικό προς ζύμωση σε κωνικές φιάλες των 100mL σε ώρες προϋδρόλυσης 12h και 24h. Αρχικά, όσον αφορά στο Δείγμα Β, για κάθε μια από τις δύο ώρες προϋδρόλυσης μελετήθηκε και η προσθήκη ενζύμου πριν την έναρξη της ζύμωσης, συγκέντρωσης 6 mg/g DM. Κατά τον τρόπο αυτό προέκυψαν τέσσερις σειρές μετρήσεων: 12(-) που αντιστοιχεί στις 12h προϋδρόλυσης χωρίς προσθήκη ενζύμου, 12(+) που αντιστοιχεί στις 12h προϋδρόλυσης με προσθήκη ενζύμου συγκέντρωσης 6 mg/g DM, 24(-) που αντιστοιχεί στις 24h προϋδρόλυσης χωρίς προσθήκη ενζύμου και 24(+) που αντιστοιχεί στις 24h προϋδρόλυσης με προσθήκη ενζύμου συγκέντρωσης 6 mg/g DM.

Η ζύμωση έλαβε χώρα στους 35°C και ελήφθησαν δείγματα για τη μέτρηση αιθανόλης στις χρονικές στιγμές 12, 24, 48, 72, 96 και 120h. Η συγκέντρωση της αιθανόλης προσδιορίστηκε με υγρή χρωματογραφία- HPLC. Στον Πίνακα 8.1 παρουσιάζεται η συγκέντρωση αιθανόλης συναρτήσει του χρόνου ζύμωσης για τις τέσσερις σειρές πειραμάτων και στον Πίνακα 8.2 η αντίστοιχη συγκέντρωση γλυκόζης .

Κεφάλαιο 8: Υδρόλυση και ζύμωση σε υψηλές συγκεντρώσεις στερεών- high gravity 102

Πίνακας 8.1: Συγκέντρωση αιθανόλης συναρτήσει του χρόνου ζύμωσης για τις σειρές 12(-), 12(+), 24(-), 24(+), στο πλαίσιο του πειράματος high gravity Δείγματος Β (0.2% H₂SO₄)

| Χρόνος (h) | Συγκέντρωση αιθανόλης (mg/mL) | | | |
|------------|-------------------------------|-------------|-------------|-------------|
| | 12 (-) | 12 (+) | 24 (-) | 24 (+) |
| 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| 12 | 40.8 | 24.8 | 19.8 | 8.2 |
| 24 | 54.2 ± 2.82 | 51.2 ± 0.79 | 42.9 ± 7.03 | 25.1 ± 0.72 |
| 48 | 69.9 ± 10.53 | 66.9 ± 2.74 | 71.6 ± 0.55 | 52.3 ± 0.06 |
| 72 | 64.8 ± 3.32 | 62.5 ± 7.34 | 73.6 ± 0.38 | 63.3 ± 1.44 |
| 96 | 69.5 ± 6.46 | 59.7 ± 7.81 | 73.3 ± 0.99 | 66.7 ± 6.87 |
| 120 | 64.9 ± 2.96 | 66.5 ± 1.06 | 75.5 ± 4.93 | 71.5 ± 1.63 |

Πίνακας 8.2: Συγκέντρωση γλυκόζης συναρτήσει του χρόνου ζύμωσης για τις σειρές 12(-), 12(+), 24(-), 24(+), στο πλαίσιο του πειράματος high gravity Δείγματος Β (0.2% H₂SO₄)

| Χρόνος (h) | Συγκέντρωση γλυκόζης (mg/mL) | | | |
|------------|------------------------------|--------------|--------------|--------------|
| | 12 (-) | 12 (+) | 24 (-) | 24 (+) |
| 0 | 130.5 ± 1.26 | 130.5 ± 1.26 | 148.3 ± 1.06 | 148.3 ± 1.06 |
| 12 | 22.7 ± 0.05 | 57.4 ± 0.39 | 115.6 ± 3.41 | 146.9 ± 0.97 |
| 24 | 3.3 ± 0.06 | 7.2 ± 0.10 | 44.8 ± 0.24 | 95.8 ± 1.46 |
| 48 | 1.5 ± 0.03 | 1.9 ± 0.02 | 2.1 ± 0.02 | 33.5 ± 0.63 |
| 72 | 0 | 0 | 0 | 4.6 ± 0.10 |
| 96 | 0 | 0 | 0 | 3.2 ± 0.02 |
| 120 | 0 | 0 | 0 | 0 |

Γενικώς παρατηρείται μεγάλη τελική συγκέντρωση αιθανόλης, με τη μέγιστη τιμή να ξεπερνά κατά πολύ το επιθυμητό όριο του 4% w/w και να φτάνει ως το 7.5% w/w (75.5 mg/mL). Για το λόγο αυτό, η διαδικασία της υδρόλυσης και ζύμωσης σε υψηλές αρχικές συγκεντρώσεις στερεών κρίνεται επιτυχής.

Αναλυτικότερα, φαίνεται πως η παραγωγή αιθανόλης χαρακτηρίζεται από ταχύ ρυθμό τις πρώτες 24h και πέραν των 48h τείνει να προσεγγίσει πλατώ. Η γλυκόζη που προέκυψε από την προϋδρόλυση έχει ήδη καταναλωθεί στις 48h ζύμωσης, και ο μεταβολισμός του ζυμομύκητα βασίζεται από το σημείο αυτό και έπειτα στη γλυκόζη που παράγεται από τις κυτταρινάσες μέσω της διεργασίας SSF.

Η παρεμπόδιση από τη γλυκόζη γίνεται εμφανής αν συγκριθεί η συμπεριφορά του συστήματος όπου η προϋδρόλυση διήρκεσε 12h με αυτή του συστήματος όπου η προϋδρόλυση διήρκεσε 24h. Όπως έχει δειχθεί, η αρχική συγκέντρωση γλυκόζης είναι μεγαλύτερη στην προϋδρόλυση των 24h σε σχέση με την προϋδρόλυση των 12h, κάτι που οδηγεί σε ισχυρότερη παρεμπόδιση. Έτσι, στις σειρές 12(-) και 12(+) ο ρυθμός παραγωγής αιθανόλης στις πρώτες 12h ώρες ζύμωσης είναι πολύ μεγαλύτερος από τον αντίστοιχο ρυθμό των 24(-) και 24(+). Με το πέρας των 24h ζύμωσης, οπότε και η γλυκόζη έχει καταναλωθεί σε υψηλό ποσοστό, το σύστημα απελευθερώνεται και επιτυγχάνονται μεγαλύτερες συγκεντρώσεις αιθανόλης στις σειρές 24(-), 24(+).

Συγκρίνοντας τις συγκεντρώσεις 12(-), 12(+) και 24(-), 24(+) μπορούν να εξαχθούν συμπεράσματα σχετικά με την αποτελεσματικότητα της προσθήκης ενζύμου στη συνολική απόδοση. Η προσθήκη του ενζύμου, που συνεπάγεται αύξηση του κόστους, θα δικαιολογούνταν σε περίπτωση που η παραγωγή αιθανόλης βελτιωνόταν σημαντικά με την επιπλέον ποσότητα ενζύμου. Ωστόσο, στο συγκεκριμένο πείραμα φαίνεται πως η προσθήκη ενζύμου επιφέρει αντίθετα αποτελέσματα. Σε κάθε περίπτωση, η συγκέντρωση αιθανόλης στα μίγματα όπου προστέθηκε επιπλέον ένζυμο είναι χαμηλότερη από τα αντίστοιχα μίγματα χωρίς προσθήκη ενζύμου. Το φαινόμενο αυτό μπορεί να δικαιολογηθεί επίσης λόγω της παρεμπόδισης από τη γλυκόζη. Το σύστημα παραμένει υπό ισχυρότερη παρεμπόδιση κατά τη χρονική εξέλιξη της ζύμωσης, με ανασταλτικό αποτέλεσμα στην παραγωγικότητα αιθανόλης. Τα παραπάνω παρουσιάζονται εποπτικά στα Διαγράμματα 8.5-8.8, όπου απεικονίζεται η χρονική εξέλιξη της συγκέντρωσης αιθανόλης συγκριτικά για τα δείγματα 12 (-), 12(+) και 24(-), 24 (+), αντίστοιχα.

Τα αποτελέσματα της ζύμωσης στο πλαίσιο της υδρόλυσης high gravity παρουσιάζονται στα Διαγράμματα 8.5-8.9. Στα Διαγράμματα 8.5 και 8.6 απεικονίζεται η συγκέντρωση αιθανόλης συναρτήσει του χρόνου, συγκριτικά ανάμεσα στις σειρές 12(-), 12(+) και 24(-), 24(+). Στα Διαγράμματα 8.7 και 8.8 παρουσιάζεται η χρονική εξέλιξη της συγκέντρωσης γλυκόζης και αιθανόλης για όλες τις σειρές πειραμάτων. Τέλος, στο Διάγραμμα 8.9 παρουσιάζεται η απελευθέρωση αιθανόλης για τις σειρές 12(-) και 24(-), ώστε να γίνει εμφανής η επίδραση της διάρκειας προϋδρόλυσης στην παραγωγή αιθανόλης. Η μέγιστη συγκέντρωση αιθανόλης των σειρών 12(-), 12(+) και 24(-), 24(+) και η απόδοση παρουσιάζονται στον Πίνακα 8.3. Η απόδοση αιθανόλης υπολογίζεται από τη σχέση:

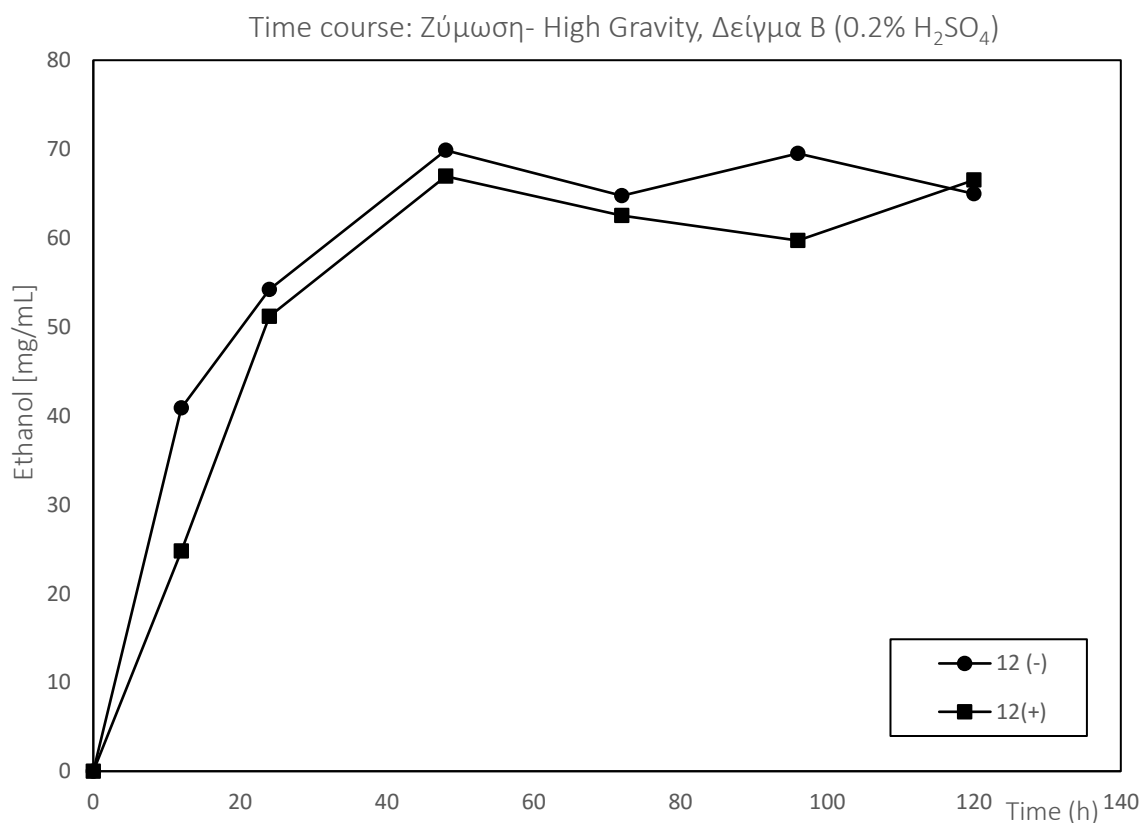
$$Ethanol Yield (\%) = \frac{[EtOH]}{f \cdot biomass \cdot 1.111 \cdot 0.51} \cdot 100\%$$

Όπου [EtOH]: η συγκέντρωση αιθανόλης (g/L), f : το κλάσμα κυτταρίνης στη βιομάζα (g/g), $biomass$: η αρχική μάζα βιομάζας (g)

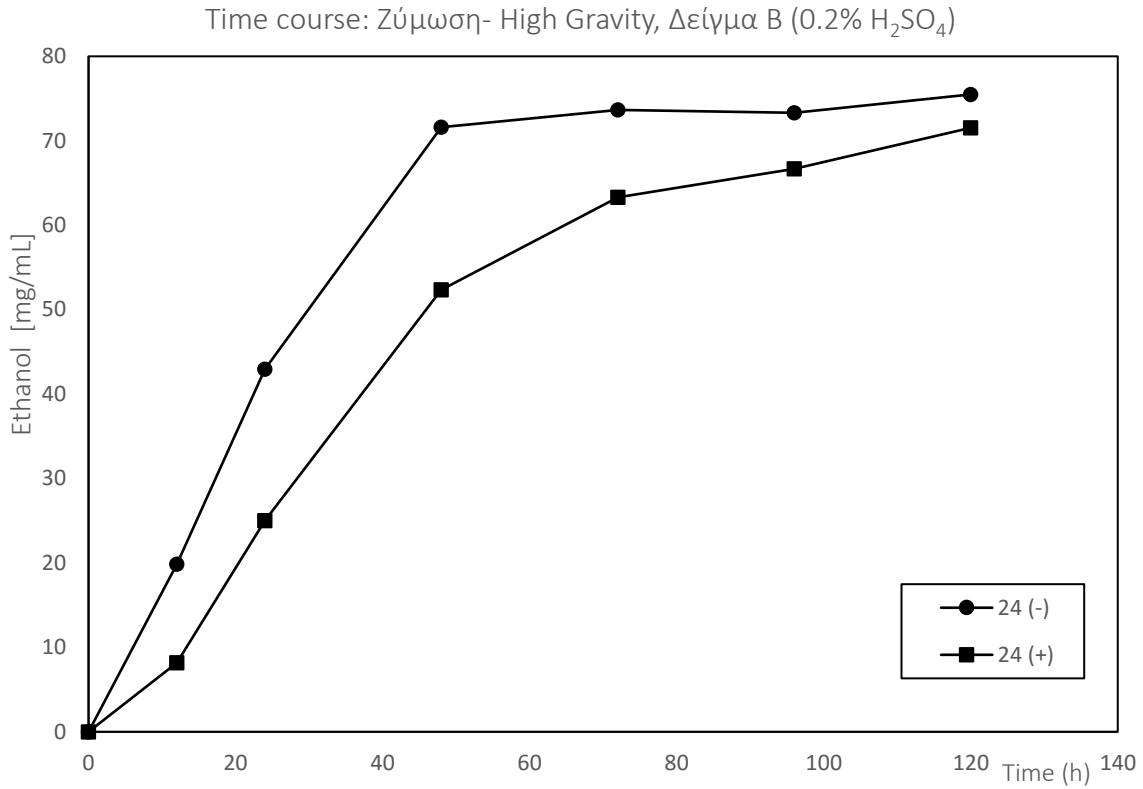
Πίνακας 8.3: Μέγιστη συγκέντρωση αιθανόλης και απόδοση αιθανόλης για τις διαφορετικές σειρές πειραμάτων high gravity, Δείγμα B (0.2% H₂SO₄)

| Χρόνος προϋδρόλυσης [h] | Προσθήκη ενζύμου | Μέγιστη συγκέντρωση αιθανόλης (mg/mL) | Απόδοση αιθανόλης (βάσει της μέγιστης θεωρητικής) |
|-------------------------|------------------|---------------------------------------|---|
| 12 | - | 64.9 ± 2.96 | 61% |
| 12 | + | 66.9 ± 1.06 | 63% |
| 24 | - | 75.5 ± 4.93 | 72% |
| 24 | + | 71.5 ± 1.63 | 68% |

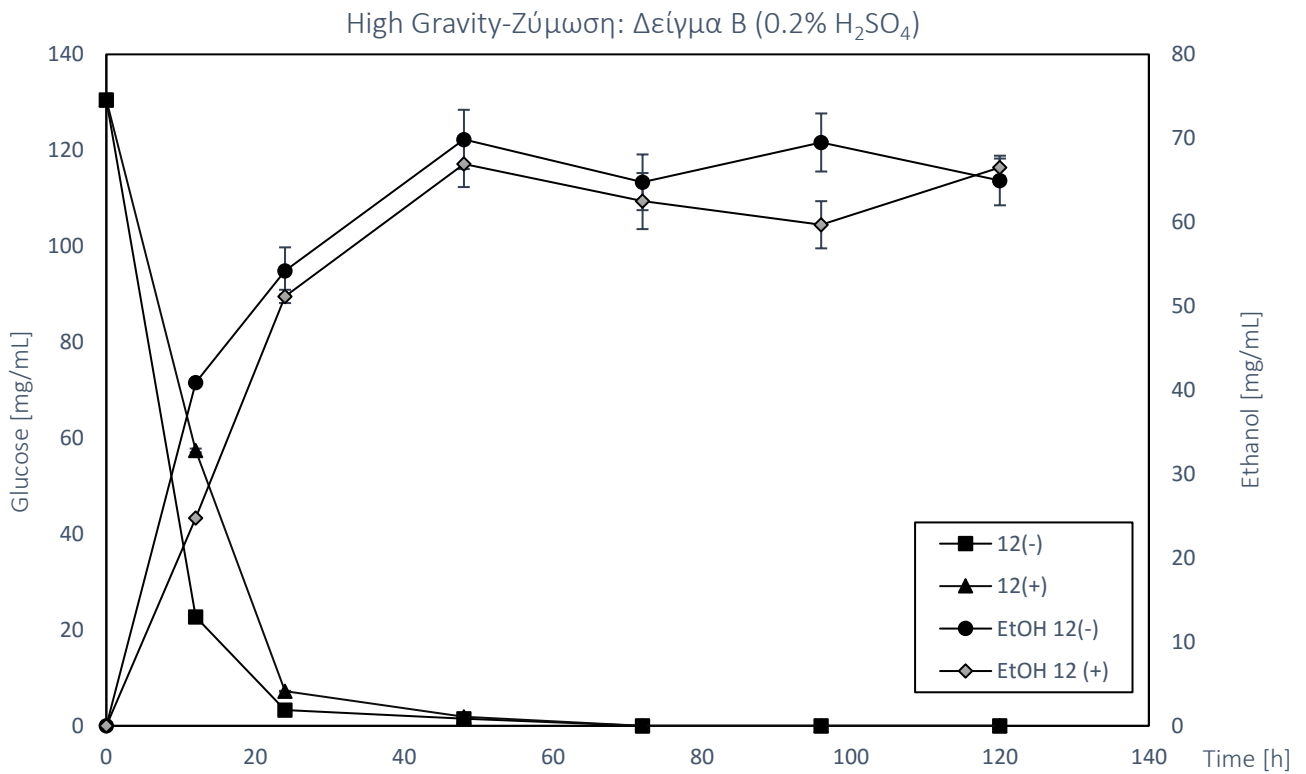
Βάσει όλων των παραπάνω, ως βέλτιστες συνθήκες για την παραγωγή μέγιστης συγκέντρωσης αιθανόλης επιλέγονται: προϋδρόλυση για 24h και ζύμωση του υδρολύματος χωρίς επιπλέον προσθήκη ενζύμου.



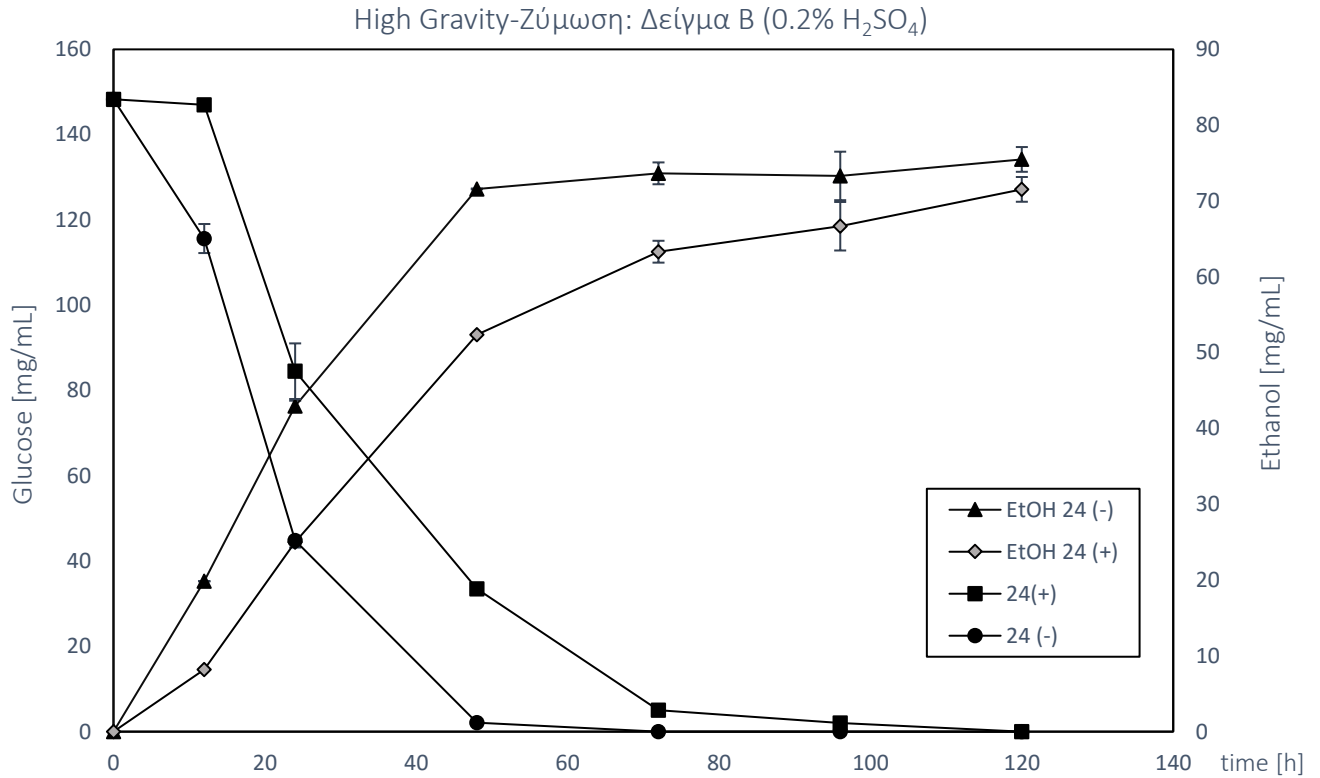
Διάγραμμα 8.5: Χρονική εξέλιξη της συγκέντρωσης αιθανόλης για τις σειρές πειραμάτων 12 (-) [●] και 12(+) [□], στο Δείγμα B (0.2 % H₂SO₄).



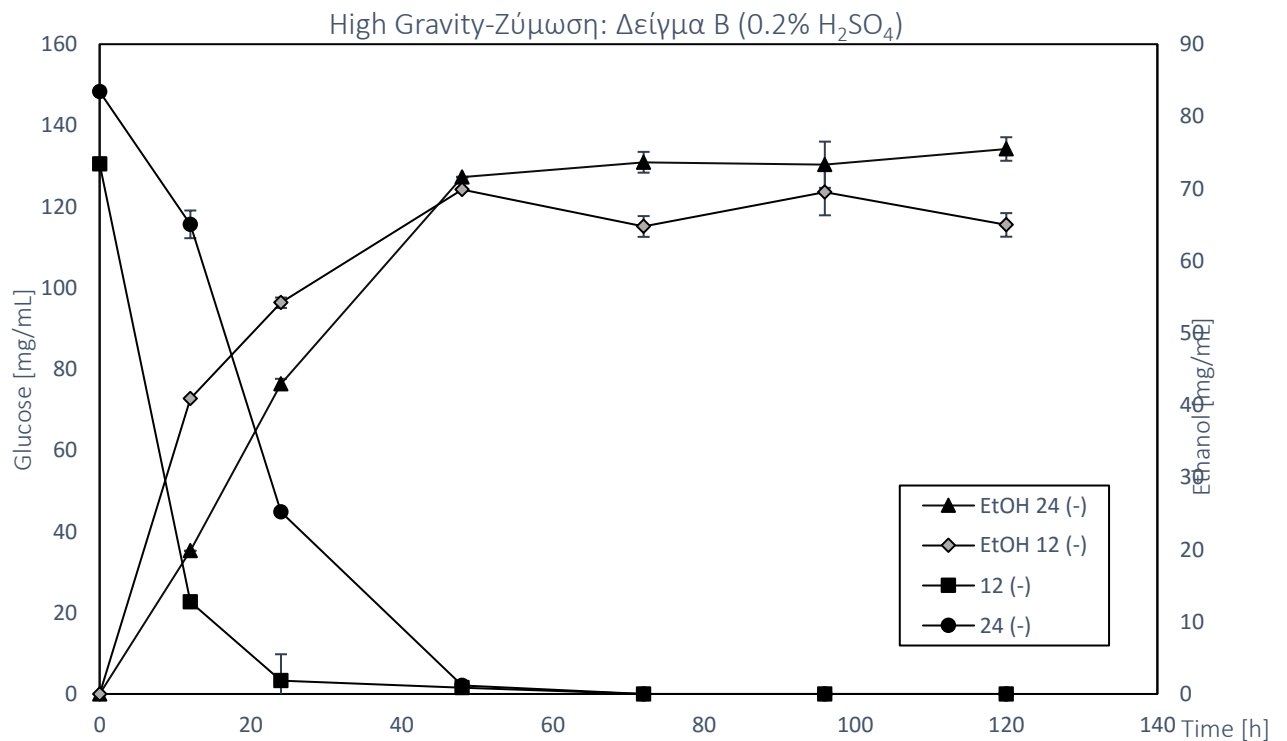
Διάγραμμα 8.6: Χρονική εξέλιξη της συγκέντρωσης αιθανόλης για τις σειρές πειραμάτων 24 (-) [●] και 24 (+) [□], στο Δείγμα B (0.2 % H₂SO₄).



Διάγραμμα 8.7: Χρονική εξέλιξη της συγκέντρωσης γλυκόζης και αιθανόλης κατά τη ζύμωση-high gravity για προϋδρόλυση 12h, για το Δείγμα B (0.2% H₂SO₄)



Διάγραμμα 8.8: Χρονική εξέλιξη της συγκέντρωσης γλυκόζης και αιθανόλης κατά τη ζύμωση-high gravity για προϋδρόλυση 24h, για το Δείγμα B (0.2% H₂SO₄)



Διάγραμμα 8.9: Σύγκριση χρονικής εξέλιξης της συγκέντρωσης γλυκόζης και αιθανόλης κατά τη ζύμωση-high gravity για προϋδρόλυση 12h και 24h, για το Δείγμα B (0.2% H₂SO₄)

8.2.2 Προσδιορισμός παραγόμενης αιθανόλης για το Δείγμα Δ (organosolv)

Ο προσδιορισμός της παραγόμενης αιθανόλης στο Δείγμα Δ (organosolv), στα πλαίσια της υδρόλυσης high gravity πραγματοποιήθηκε με την ίδια μέθοδο του Δείγματος Β (0.2% H₂SO₄). Μελετήθηκε η παραγωγή αιθανόλης από υδρόλυμα που προέκυψε στις 12h προϋδρόλυσης και από υδρόλυμα που προέκυψε στις 24h προϋδρόλυσης. Παρακάτω παρουσιάζεται διαγραμματικά η χρονική εξέλιξη της συγκέντρωσης γλυκόζης και αιθανόλης για τις ζυμώσεις των 12h και 24h προϋδρόλυσης (Διάγραμμα 8.10).

Η ποιοτική εικόνα της χρονικής εξέλιξης των συγκεντρώσεων γλυκόζης και αιθανόλης είναι παρόμοια με το δείγμα που προκατεργάστηκε με έκρηξη ατμού. Η γλυκόζη που προέκυψε από την προϋδρόλυση καταναλώνεται πλήρως τις πρώτες 24h και στη συνέχεια ο μεταβολισμός του ζυμομύκητα τροφοδοτείται με γλυκόζη που παράγεται από τα κυτταρινολυτικά ένζυμα του μίγματος, σε μια διεργασία ταυτόχρονης σακχαροποίησης και ζύμωσης. Έτσι, επιτυγχάνεται πλατώ στη συγκέντρωση της αιθανόλης από τις 48h ζύμωσης και περαιτέρω.

Παρατηρείται πως, αν και η συγκέντρωση αιθανόλης αυξάνεται με μικρότερο ρυθμό στην αρχή του πειράματος στο δείγμα προϋδρόλυσης 24h, επιτυγχάνεται τελικώς σε αυτό μεγαλύτερη συγκέντρωση αιθανόλης. Η αρχική καθυστέρηση στην αύξηση της αιθανόλης οφείλεται στην παρεμπόδιση του συστήματος από τις υψηλές συγκεντρώσεις γλυκόζης. Η μέγιστη συγκέντρωση αιθανόλης που παράγεται είναι 6.0% (60.2 mg/mL) και 6.5% (64.8 mg/mL) για τις προϋδρολύσεις 12h και 24h, αντίστοιχα, τιμές που κρίνονται ικανοποιητικές για τη διεργασία. Η επίτευξη μικρότερης τελικής συγκέντρωσης αιθανόλης στο Δείγμα Δ από ότι στο Δείγμα Β, συνδέεται εν μέρει με τη μικρότερη παραγωγή σακχάρων κατά την προϋδρόλυση και την πιθανή ύπαρξη παρεμποδιστών.

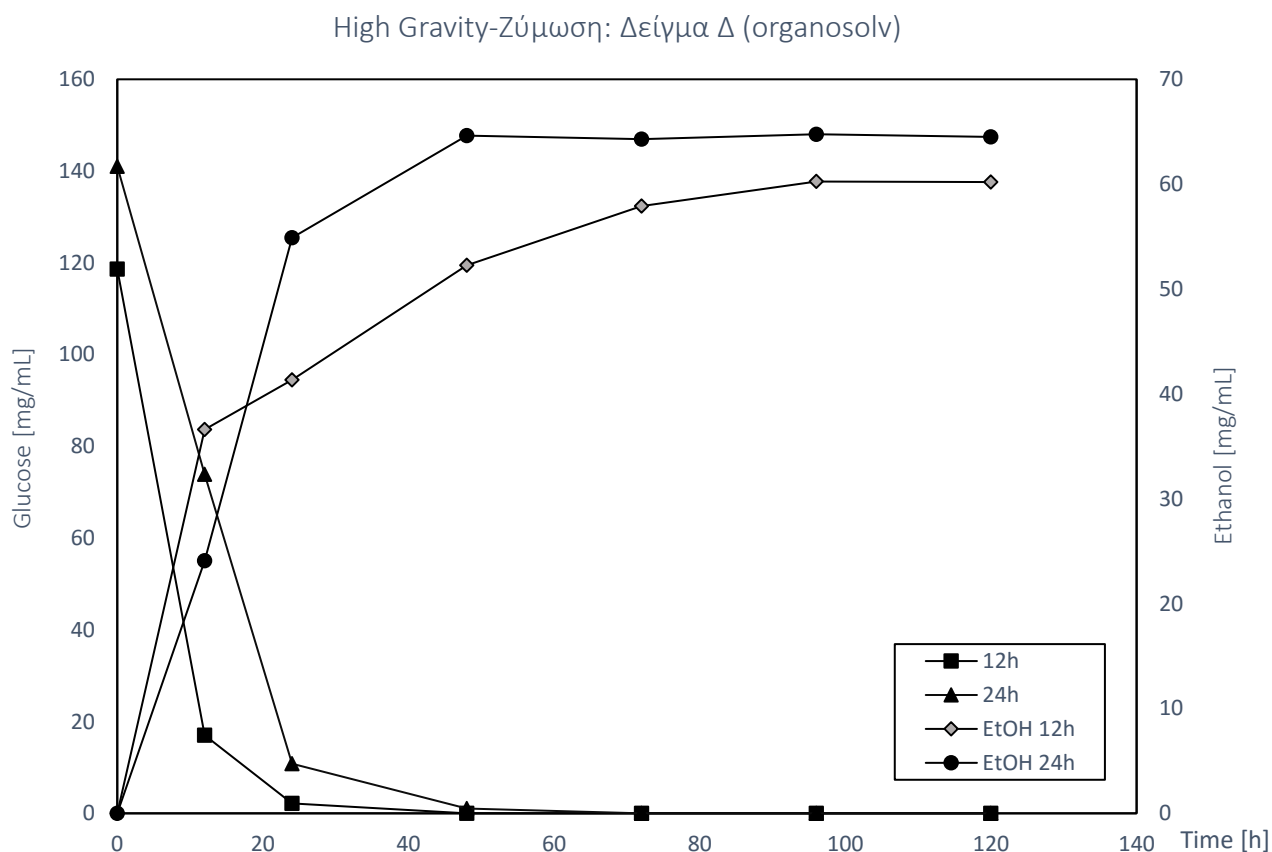
Πίνακας 8.4: Συγκέντρωση αιθανόλης και γλυκόζης συναρτήσει του χρόνου ζύμωσης για τις σειρές 12h, 24h στο πλαίσιο του πειράματος high gravity Δείγματος Δ (organosolv)

| Χρόνος (h) | 12h προϋδρόλυσης | | 24h προϋδρόλυσης | |
|------------|------------------|--------------|------------------|--------------|
| | Glucose (mg/mL) | EtOH (mg/mL) | Glucose (mg/mL) | EtOH (mg/mL) |
| 0 | 118.6 ± 1.47 | 0 | 141.0 ± 1.47 | 0 |
| 12 | 17.0 ± 0.09 | 36.6 | 73.9 ± 2.07 | 24.1 |
| 24 | 2.2 ± 0.15 | 41.3 ± 1.10 | 10.8 ± 0.12 | 54.9 ± 0.52 |
| 48 | 0.0 ± 0.03 | 52.3 ± 0.01 | 1.0 ± 0.07 | 64.6 ± 0.88 |
| 72 | 0.0 | 57.9 ± 0.88 | 0 | 64.3 ± 0.23 |
| 96 | 0.0 | 60.3 ± 0.00 | 0 | 64.8 ± 0.36 |
| 120 | 0.0 | 60.2 ± 0.04 | 0 | 64.5 ± 1.28 |

Κεφάλαιο 8: Υδρόλυση και ζύμωση σε υψηλές συγκεντρώσεις στερεών- high gravity 108

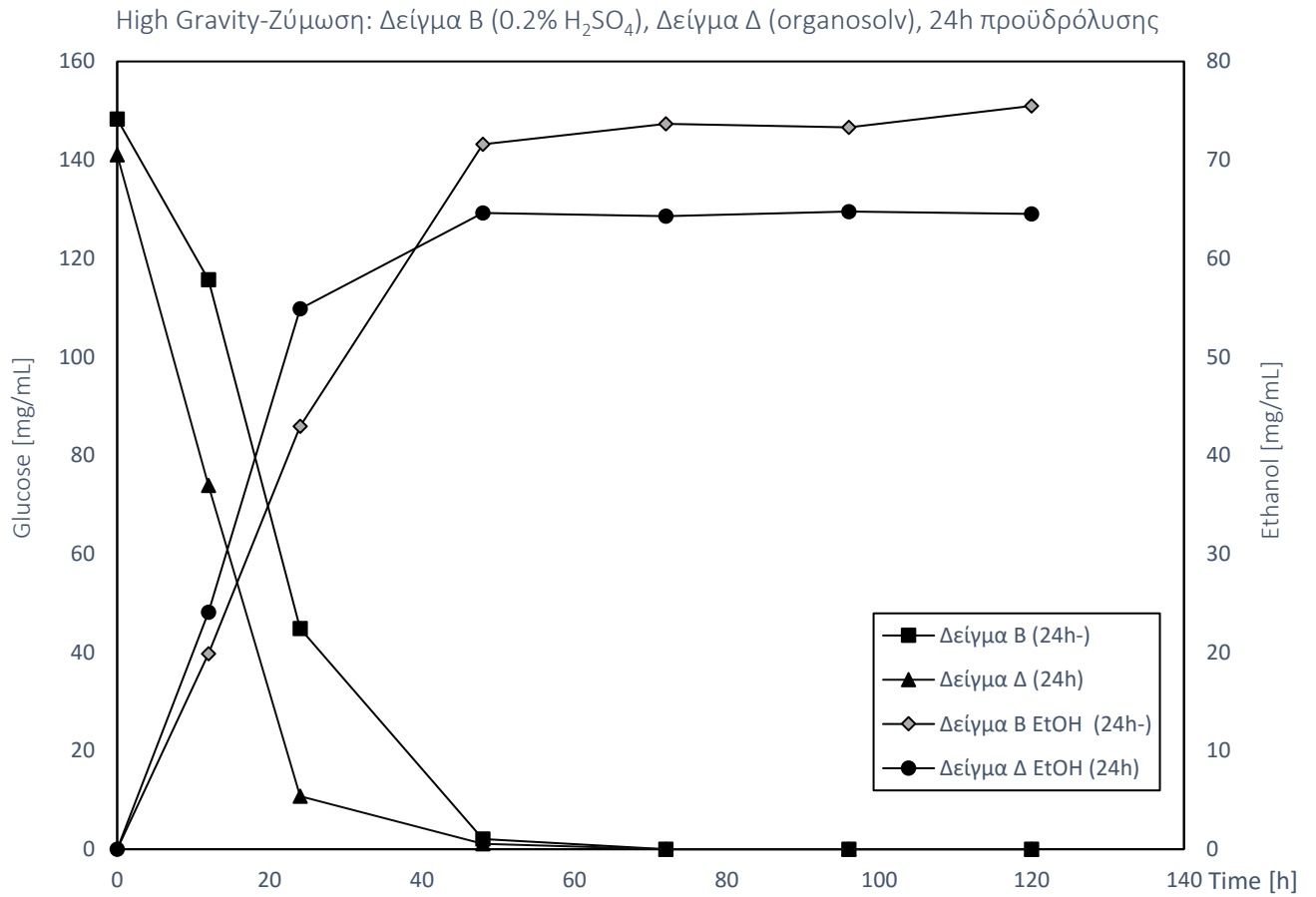
Πίνακας 8.5: Μέγιστη συγκέντρωση αιθανόλης και απόδοση αιθανόλης για τις διαφορετικές σειρές πειραμάτων high gravity, Δείγμα Δ (organosolv)

| Χρόνος προϋδρόλυσης [h] | Μέγιστη συγκέντρωση αιθανόλης (mg/mL) | Απόδοση αιθανόλης (βάσει της μέγιστης θεωρητικής) |
|-------------------------|---------------------------------------|---|
| 12 | 60.2 ± 0.04 | 53% |
| 24 | 64.5 ± 1.28 | 57% |



Διάγραμμα 8.10: Χρονική εξέλιξη της συγκέντρωσης γλυκόζης και αιθανόλης κατά τη ζύμωση-high gravity για προϋδρόλυση 12h και 24h, για το Δείγμα Δ (organosolv)

Τελικώς, για λόγους σύγκρισης παρουσιάζεται η χρονική εξέλιξη της συγκέντρωσης γλυκόζης και αιθανόλης για τα δύο δείγματα Β και Δ στις εκάστοτε βέλτιστες συνθήκες (Διάγραμμα 8.11).

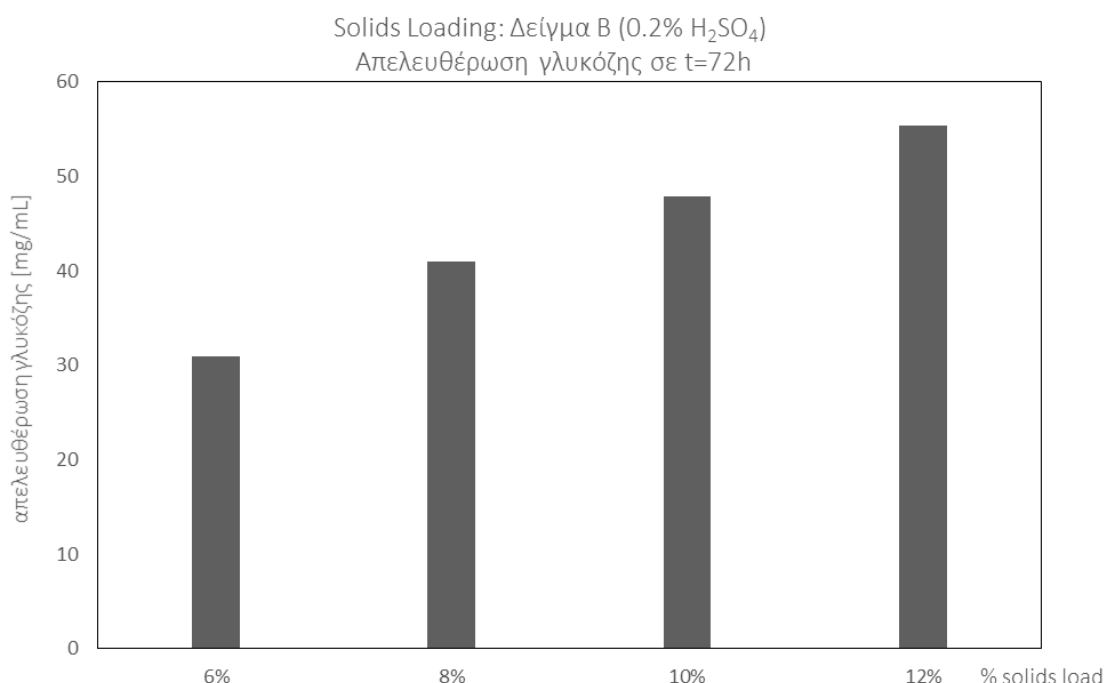


Διάγραμμα 8.11: Συγκέντρωση γλυκόζης και αιθανόλης συναρτήσει του χρόνου για τα Δείγματα Β (0.2% H₂SO₄) και Δ (organosolv)

8.3 Επίδραση της συγκέντρωσης στερεών στην απόδοση της διεργασίας

Προκειμένου να γίνει εμφανής η επίδραση της συγκέντρωσης στερεών στην απόδοση της διεργασίας, πραγματοποιήθηκε ενζυμική υδρόλυση σε διαφορετικά ποσοστά αρχικών στερεών βιομάζας για το Δείγμα Β (0.2% H₂SO₄). Η υδρόλυση έλαβε χώρα σε κωνικές φιάλες των 50mL στο βέλτιστο ενζυμικό φορτίο (12 mg/g DM) και τα ποσοστά στερεών που μελετήθηκαν ήταν 6%, 8%, 10% και 12%.

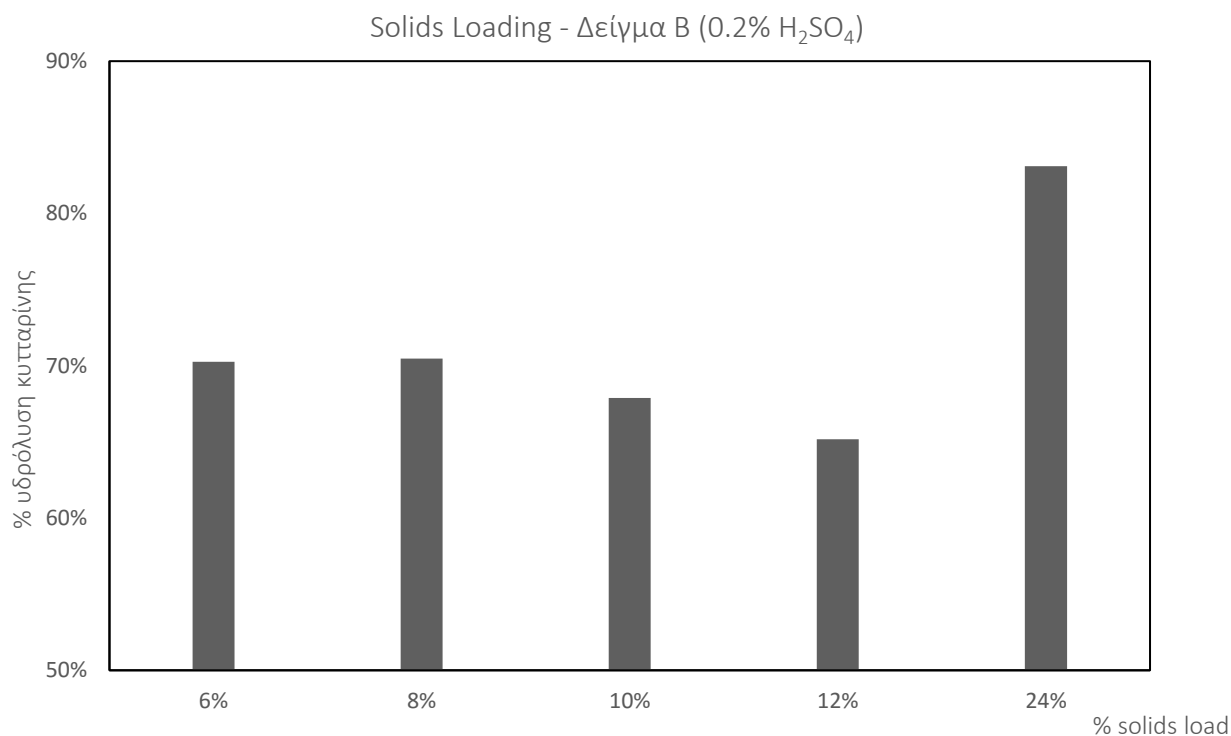
Στο παρακάτω Διάγραμμα 8.12 παρουσιάζεται η μέγιστη απελευθέρωση γλυκόζης, στις 72h υδρόλυσης για όλα τα ποσοστά στερεών που μελετήθηκαν. Παρατηρείται ότι η συγκέντρωση γλυκόζης αυξάνεται σχεδόν γραμμικά με την αύξηση του αρχικού ποσοστού στερεών. Η αύξηση της απελευθέρωσης γλυκόζης σε απόλυτη τιμή είναι λογική, καθώς με την ενίσχυση του μίγματος σε στερεά περισσότερο υπόστρωμα είναι διαθέσιμο προς υδρόλυση από τα κυτταρινολυτικά ένζυμα.



Διάγραμμα 8.12: Απελευθέρωση γλυκόζης κατά την ενζυμική υδρόλυση στο βέλτιστο ενζυμικό φορτίο (12 mg/g DM) για συγκεντρώσεις στερεών: 6%, 8%, 10% και 12% (solids loading).

Περισσότερο ενδιαφέρον από τη συγκέντρωση γλυκόζης στο υδρόλυμα παρουσιάζει η ποσοστιαία υδρόλυση της κυτταρίνης, η οποία συνδέεται με την απόδοση της διεργασίας. Στο Διάγραμμα 8.13 απεικονίζεται η ποσοστιαία υδρόλυση της κυτταρίνης για τις τέσσερις συγκεντρώσεις στερεών που μελετήθηκαν σε μικρή κλίμακα (κωνικές φιάλες), καθώς και για τη συγκέντρωση στερεών 24% που μελετήθηκε στον αναδευτήρα ελεύθερης πτώσης (free fall mixer). Παρατηρείται ότι στο συμβατικό σύστημα ανάδευσης (κωνική φιάλη) η απόδοση μειώνεται με την αύξηση του ποσοστού της βιομάζας, λόγω προβλημάτων ανάδευσης και φαινομένων μεταφοράς. Η πρόσβαση των υδρολυτικών ενζύμων στη βιομάζα δυσχεραίνεται λόγω της ανεπαρκούς ανάμιξης και έτσι η υδρόλυση είναι μερική. Αντιθέτως, στον αντιδραστήρα ελεύθερης πτώσης οι

περιορισμοί της ανάμιξης αναστέλλονται και η απόδοση αυξάνεται. Παρατηρείται ότι η ποσοστιαία υδρόλυση της κυτταρίνης για τη συγκέντρωση στερεών 24% είναι αρκετά υψηλότερη ακόμα και από τη συγκέντρωση στερεών 6% (η οποία επιτρέπει σχετικά καλή ανάμιξη στα συμβατικά συστήματα). Τονίζεται έτσι για ακόμη μια φορά η σημασία του συστήματος ανάδευσης για την αποτελεσματικότητα της διεργασίας.

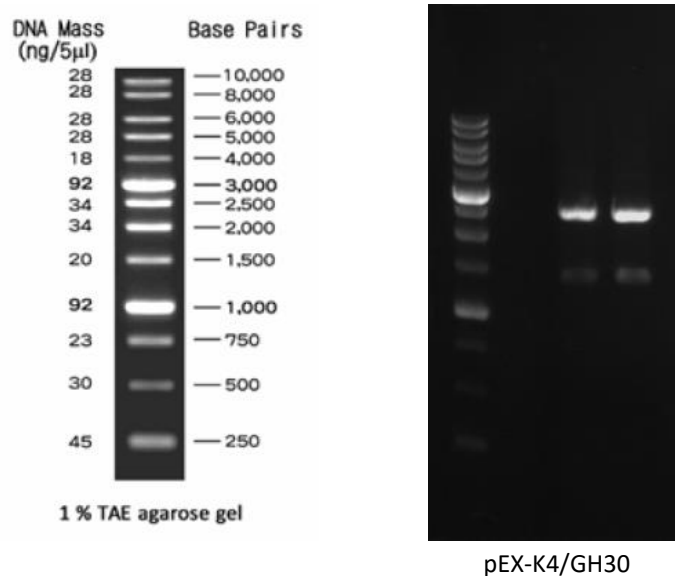


Διάγραμμα 8.13: Ποσοστιαία υδρόλυση κυτταρίνης για συγκεντρώσεις στερεών 6%, 8%, 10%, 12% (ανάμιξη σε συμβατικά συστήματα) και 24% (ανάμιξη σε αντιδραστήρα free fall mixer).

Κεφάλαιο 9: Παραγωγή καινοτόμου βιοκαταλύτη της κατά CAZy οικογένειας GH30

Ο μετασηματισμός βακτηρίων *E. coli* TOP10 με το πλασμίδιο pEX-K4 (που περιέχει το γονίδιο GH30) ήταν επιτυχής, καθώς εμφανίστηκε ικανοποιητικός αριθμός αποικιών στη στερεή καλλιέργεια. Τα κύτταρα που αναπτύχθηκαν στο τρυβλίο με θρεπτικό υλικό LB+kanamycin είχαν δεχθεί το πλασμίδιο και για αυτό εμφάνιζαν αντίσταση στο αντιβιοτικό kanamycin. Επιλέχθηκαν αποικίες για τον εμβολιασμό υγρών καλλιεργειών, τα κύτταρα συλλέχθηκαν και λύθηκαν και το πλασμίδιο απομονώθηκε και καθαρίστηκε.

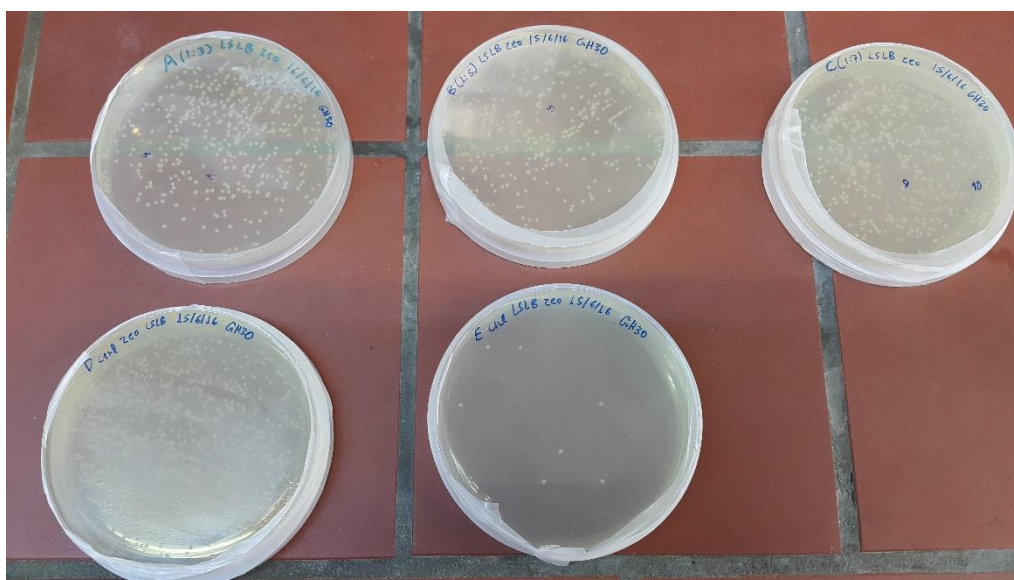
Στη συνέχεια, το πλασμίδιο pEX-K4/GH30 και το πλασμίδιο pPICZαC (φορέας κλωνοποίησης) υπέστησαν αντίδραση περιορισμού με τα ένζυμα *Cla*I και *Xba*I. Η επιτυχία της πέψης ελέγχθηκε με ηλεκτροφόρηση αγαρόζης στα προϊόντα της αντίδρασης. Όπως παρουσιάζεται στο Σχήμα 9.1 η πέψη ήταν επιτυχής, καθώς εμφανίζονται ζώνες στα μήκη DNA: ~1400bp και ~2500bp για το pEX-K4/GH30 που αντιστοιχούν στο γονίδιο GH30 και το πλασμίδιο pEX-K4, και ~3600bp που αντιστοιχεί στο πλασμίδιο pPICZαC.



Σχήμα 9.1: Ηλεκτροφόρηση αγαρόζης για τον έλεγχο της αντίδρασης πέψης με περιοριστικά ένζυμα

Μετά τον καθαρισμό γονιδίου και πλασμιδίου pPICZαC με Gel Extraction και PCR Clean-Up αντίστοιχα, ακολούθησε αντίδραση λιγάσης ανάμεσα στα δύο θραύσματα. Η αντίδραση πραγματοποιήθηκε σε τρεις αναλογίες πλασμιδίου/γονιδίου: A (1:3), B (1:5), C (1:7), προκειμένου να εξασφαλιστεί η εμφάνιση ικανοποιητικού αριθμού αποικιών σε τουλάχιστον ένα τρυβλίο. Παρασκευάστηκαν επίσης, δύο μίγματα ελέγχου (control), τα

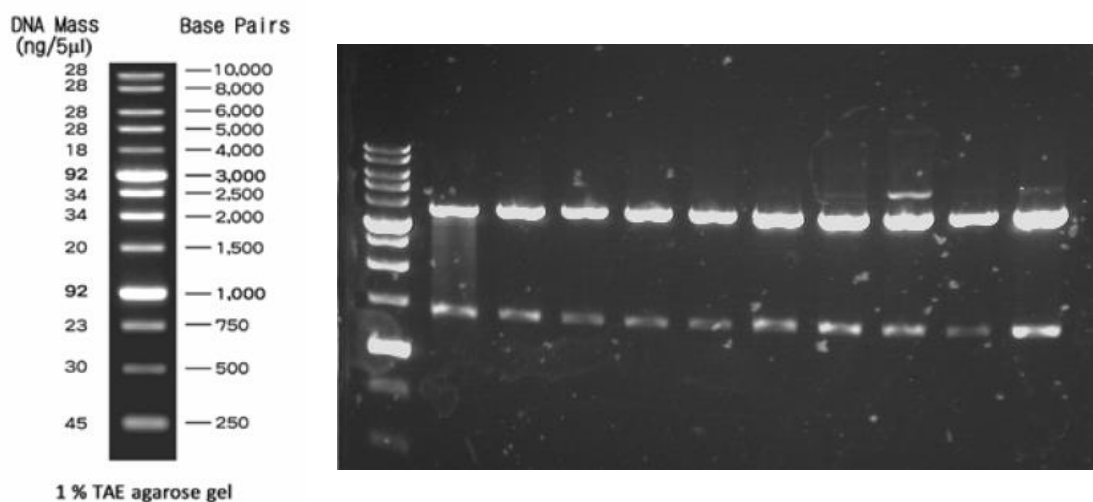
οποία δεν περιείχαν γονίδιο (D) και γονίδιο και λιγάση (E). Μετασηματίστηκαν κύτταρα *E.coli* TOP10 με τα προϊόντα των A-E με τη μέθοδο του θερμικού σοκ και μεταφέρθηκαν σε στερεό θρεπτικό μέσο LB+Zeocin. Πραγματοποιήθηκαν δύο επαναλήψεις για κάθε δείγμα. Μόνο τα κύτταρα που είχαν προσλάβει πλασμίδιο pPICZαC (ανασυνδυασμένο ή μη) είχαν τη δυνατότητα ανάπτυξης στα τρυβλία που περιείχαν αντιβιοτικό Zeocin. Στο Σχήμα 9.2 παρουσιάζεται η ανάπτυξη αποικιών στα τρυβλία A-E. Η παρουσία μικρού αριθμού αποικιών στο τρυβλίο-control E υποδεικνύει εκτεταμένη αντίδραση περιορισμού του πλασμιδίου pPICZαC στο προηγούμενο βήμα της πειραματικής διαδικασίας. Πολύ μικρός αριθμός πλασμιδίων παρέμειναν κυκλικά κατά την αντίδραση πέψης, ώστε να εισέλθουν στα κύτταρα της σειράς E (που δεν περιείχε λιγάση) και να τους προσδώσουν αντίσταση στο αντιβιοτικό.



Σχήμα 9.2: Σχηματισμός αποικιών σε θρεπτικό μέσο LB+Zeocin μετά την αντίδραση λιγάσης για τις σειρές A-C και D-E (control)

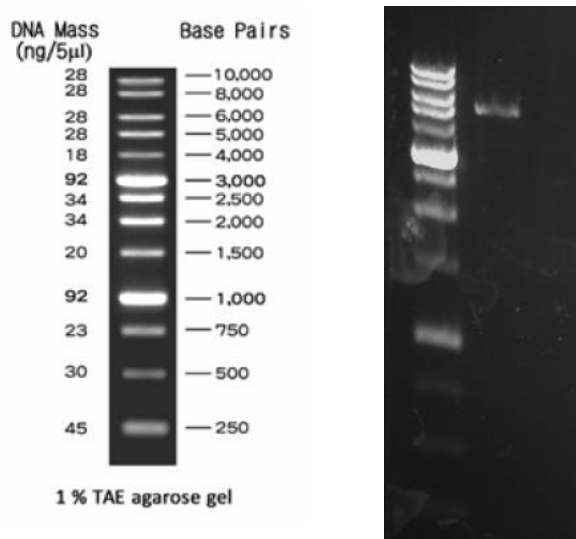
Επιλέχθηκαν με τυχαίο τρόπο 10 αποικίες από τα τρυβλία A-C και εμβολιάστηκαν με αυτές υγρές καλλιέργειες. Τα κύτταρα συλλέχθηκαν, λύθηκαν και τα πλασμίδια απομονώθηκαν και καθαρίστηκαν. Κάθε μια από τις αποικίες που επιλέχθηκαν μπορεί να περιέχει ανασυνδυασμένο ή μη ανασυνδυασμένο πλασμίδιο. Για να διαπιστωθεί ποιες από τις αποικίες που επιλέχθηκαν διέθεταν το ανασυνδυασμένο πλασμίδιο, πραγματοποιήθηκε ανάλυση (restriction analysis) με τη χρήση των ίδιων περιοριστικών ενζύμων που χρησιμοποιήθηκαν κατά την πέψη πλασμιδίου και γονιδίου (*Xba*I, *Cla*I). Από την ηλεκτροφόρηση αгарόζης που ακολούθησε (Σχήμα 9.3) παρατηρήθηκε ότι όλες οι αποικίες που επιλέχθηκαν περιείχαν το ανασυνδυασμένο πλασμίδιο, καθώς εμφανίζονται ζώνες στα μήκη: ~1400bp και ~3600bp (γονίδιο GH30 και πλασμίδιο pPICZαC).

Επιλέχθηκε η αποικία υπ' αριθμόν 1 για εμβολιασμό υγρών καλλιιεργειών με στόχο τον πολλαπλασιασμό του ανασυνδυασμένου πλασμιδίου. Το πλασμίδιο στη συνέχεια απομονώθηκε και καθαρίστηκε από τις υγρές καλλιιεργειες του *E.coli* TOP10.



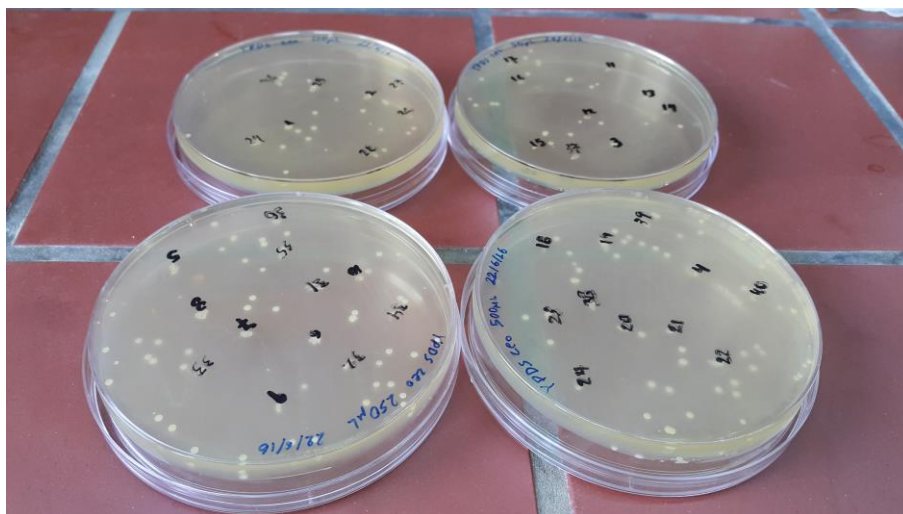
Σχήμα 9.3: Ηλεκτροφόρηση αραρόζης για τον έλεγχο της πρόσληψης ανασυνδυασμένου πλασμιδίου από τα κύτταρα μετά την αντίδραση λιγάσης

Προκειμένου το πλασμίδιο να εισαχθεί με μεγαλύτερη ευκολία στον ξενιστή- *P. pastoris* ακολουθήθηκε αντίδραση γραμμικοποίησης (linearisation). Η γραμμικοποίηση πραγματοποιήθηκε με το ένζυμο *SacI*, το οποίο επιλέχθηκε διότι διαπιστώθηκε ότι δε δρα περιοριστικά σε ακολουθία εντός του γονιδίου GH30, ούτε τέμνει σε περιοχή που επηρεάζει τις λειτουργικές περιοχές του πλασμιδίου. Ο έλεγχος της επιτυχίας της γραμμικοποίησης πραγματοποιήθηκε με ηλεκτροφόρηση ηχητής αραρόζης και για τον καθαρισμό του γραμμικοποιημένου πλασμιδίου χρησιμοποιήθηκε η μέθοδος PCR cleanup. Στο Σχήμα 9.4 παρουσιάζεται το αποτέλεσμα της ηλεκτροφόρησης για το προϊόν της γραμμικοποίησης. Η αντίδραση θεωρείται επιτυχής καθώς εμφανίζεται καθαρή ζώνη στα ~5000bp, που αντιστοιχεί στο γραμμικοποιημένο πλασμίδιο.



Σχήμα 9.4: Ηλεκτροφόρηση αραρόζης για τον έλεγχο αντίδρασης γραμμικοποίησης

Το γραμμικοποιημένο πλασμίδιο καθαρίστηκε και εισήχθη σε κύτταρα *P. pastoris* με τη μέθοδο της ηλεκτροδιάτρησης. Τα κύτταρα μεταφέρθηκαν σε στερεό θρεπτικό μέσο LB+ Zeocin, όπου αναπτύχθηκαν μόνο αυτά που έλαβαν το ανασυνδυασμένο πλασμίδιο.



Σχήμα 9.5: Ανάπτυξη αποικιών *P. pastoris* σε στερεό θρεπτικό μέσο LB+ Zeocin

Προκειμένου να επιλεχθούν οι αποικίες εκείνες που είναι ικανές για την παραγωγή του ενζύμου, πραγματοποιήθηκε έλεγχος σε κατάλληλο τρυβλίο (Plate Assay). Το τρυβλίο ελέγχου περιείχε θρεπτικά συστατικά για την ανάπτυξη της *P. pastoris*, μεθανόλη για την επαγωγή της έκφρασης του ενζύμου και ξυλάνη για την παρατήρηση της ενεργότητας του ενζύμου. Παρατηρείται θετικό αποτέλεσμα στο τρυβλίο ελέγχου σε περίπτωση που η έκφραση του ενζύμου έχει πραγματοποιηθεί επιτυχώς και το ένζυμο παρουσιάζει όντως ξυλανολυτική δράση.

Δεν παρατηρήθηκε ενζυμική δράση στα υποστρώματα που ελέγχθηκαν κατά τη διαδικασία Plate Assay. Η ενεργότητα του ενζύμου ενδεχομένως να ήταν χαμηλή, ώστε να μη μπορούσε να ανιχνευθεί με τη μέθοδο αυτή, ενώ ενδέχεται και το ένζυμο να μην παρουσιάζει ενεργότητα στα υποστρώματα που μελετήθηκαν. Σε επόμενο στάδιο θα πραγματοποιούνταν ανάπτυξη των κυττάρων σε υγρή καλλιέργεια, ώστε να απομονωθεί μεγαλύτερη ποσότητα ενζύμου και να λάβουν χώρα έλεγχοι μεγαλύτερης ακρίβειας.

IV. Συμπεράσματα και συζήτηση

Κεφάλαιο 10: Συμπεράσματα και συζήτηση

10.1 Συνοπτικά αποτελέσματα και συμπεράσματα- βιβλιογραφική επισκόπηση

Στην παρούσα διπλωματική εργασία, μελετήθηκε στο πρώτο μέρος η παραγωγή βιοαιθανόλης από στέλεχος αραβοσίτου (corn stover) με διαφορετικές προκατεργασίες και σε συνθήκες υψηλής συγκέντρωσης στερεών (high gravity). Μελετήθηκαν τα Δείγματα Α (έκρηξη ατμού άνευ προσθήκης οξέος), Β (έκρηξη ατμού με προσθήκη 0.2% H₂SO₄), Γ (έκρηξη ατμού με προσθήκη 1.0% H₂SO₄) και Δ (organosolv). Τα υλικά υπέστησαν ανάλυση σύστασης, ανάλυση κρυσταλλικότητας, δοκιμαστική ενζυμική υδρόλυση σε μικρή κλίμακα και ζύμωση σε μικρή κλίμακα, ώστε να διαπιστωθούν οι βέλτιστες συνθήκες κάθε σταδίου της διεργασίας και να επιλεγούν τα Δείγματα με την καλύτερη συμπεριφορά. Τα υλικά που επιλέχθηκαν αυτές τις σειρές πειραμάτων (Β και Δ) οδηγήθηκαν προς υδρόλυση και ζύμωση σε υψηλές συγκεντρώσεις στερεών (high gravity).

Η ανάλυση σύστασης των υλικών υπέδειξε απομάκρυνση ημικυτταρίνης στα δείγματα που κατεργάστηκαν με έκρηξη ατμού, με τη μεγαλύτερη απομάκρυνση να παρουσιάζεται στο Δείγμα Γ, λόγω της υψηλής συγκέντρωσης προστιθέμενου οξέος. Ωστόσο, στο Δείγμα Γ παρατηρήθηκε υποβάθμιση, λόγω υδρόλυσης της κυτταρίνης κατά την προκατεργασία. Από την ανάλυση σύστασης έγινε εμφανές ότι στο Δείγμα Δ, το οποίο είχε προκατεργαστεί με τη μέθοδο organosolv, απομακρύνθηκε μεγάλο ποσοστό λιγνίνης.

Σύμφωνα με την ανάλυση κρυσταλλικότητας των υλικών, η προκατεργασία αύξησε τη συνολική κρυσταλλικότητα της βιομάζας σε κάθε δείγμα. Μέσω της απομάκρυνσης ημικυτταρίνης και λιγνίνης, που αποτελούν άμορφα συστατικά, ο δείκτης κρυσταλλικότητας των δειγμάτων αυξάνει. Τα αποτελέσματα της ανάλυσης κρυσταλλικότητας συνάδουν με τα αποτελέσματα της ανάλυσης σύστασης, με τα δείγματα που παρουσίασαν μεγαλύτερη απομάκρυνση ημικυτταρίνης ή/και λιγνίνης να έχουν υψηλότερους δείκτες κρυσταλλικότητας.

Κατά την ενζυμική υδρόλυση μικρής κλίμακας, ελέγχθηκε η επίδραση της διαφορετικής συγκέντρωσης ενζύμου στην υδρόλυση της βιομάζας συναρτήσει του χρόνου (enzyme loading). Η συγκέντρωση στερεών ήταν χαμηλή (10% w/v) και η υδρόλυση έλαβε χώρα σε κωνικές φιάλες. Παρατηρήθηκε η ίδια ποιοτική συμπεριφορά σε όλα τα δείγματα, καθώς η απελευθέρωση γλυκόζης είναι ταχεία στην αρχή της υδρόλυσης, αλλά επιβραδύνεται σε μεγάλους χρόνους λόγω της εμφάνισης παρεμπόδισης από το προϊόν. Επιλέχθηκε η συγκέντρωση 12 mg/ g DM ως βέλτιστο ενζυμικό φορτίο, η οποία συμβιβάζει την αποτελεσματικότητα της υδρόλυσης και το κόστος του προστιθέμενου ενζύμου. Γενικώς, παρατηρήθηκε υψηλότερη απελευθέρωση γλυκόζης στο Δείγμα Β (το οποίο είχε κατεργαστεί ήπια με την προσθήκη οξέος) και στο Δείγμα Δ. Συμπεραίνεται πως η προσθήκη οξέος κατά την προκατεργασία με έκρηξη ατμού ενισχύει την ενζυμική υδρόλυση, στην περίπτωση που δεν είναι τόσο ισχυρή ώστε να προκαλέσει υποβάθμιση του υλικού. Οι μέγιστες συγκεντρώσεις γλυκόζης στο πέρας ενζυμικής υδρόλυσης 72h ήταν: Α (49.1 ± 0.99 mg/mL), Β (53.2 ± 1.23 mg/mL), Γ (41.7 ± 0.62 mg/mL), Δ (59.4 ± 0.45

mg/mL), με τις μέγιστες αποδόσεις να κυμαίνονται στο διάστημα 74%-90%, που ανήκει στα πλαίσια των τιμών που αναφέρονται στη βιβλιογραφία. Οι (Ohgren et al. 2007) ανέφεραν απόδοση της ενζυμικής υδρόλυσης 89%, σε δείγμα που είχε κατεργαστεί με έκρηξη ατμού στους 200°C για 10min.

Κατά τη ζύμωση μικρής κλίμακας τα Δείγματα Α-Δ ζυμώθηκαν με τον μικροοργανισμό *Saccharomyces cerevisiae* στις βέλτιστες συνθήκες ενζυμικού φορτίου και χρόνου προϋδρόλυσης που είχαν διαπιστωθεί από τις προηγούμενες σειρές πειραμάτων. Η παραγωγή αιθανόλης ακολούθησε ποιοτικά την ίδια πορεία για όλα τα δείγματα, με μέγιστη παραγωγικότητα στην αρχή της ζύμωσης και επίτευξη πλατώ με το πέρασμα του χρόνου. Τα δείγματα που είχαν προκατεργαστεί με έκρηξη ατμού επέδειξαν την ίδια συμπεριφορά με την ενζυμική υδρόλυση, με το Δείγμα Β να εμφανίζει τη μεγαλύτερη απόδοση σε αιθανόλη. Στο Δείγμα Δ, αν και είχαν επιτευχθεί υψηλότερες συγκεντρώσεις σακχάρων κατά το πείραμα υδρόλυσης, εμφανίστηκε μικρότερη τελική συγκέντρωση αιθανόλης. Αυτό αποδίδεται είτε στην παρουσία κάποιου παρεμποδιστή της ζύμωσης στο υδρόλυμα είτε στη μετατόπιση του μεταβολισμού του ζυμομύκητα προς άλλα προϊόντα, λόγω διαταραχής στις συνθήκες αερισμού. Οι μέγιστες συγκεντρώσεις αιθανόλης που επιτεύχθηκαν για τα δείγματα Α-Δ είναι: Α (21.2 mg/mL), Β (22.7 mg/mL), Γ (18.4 mg/mL) και Δ (15.4 mg/mL).

Από τα προηγούμενα πειράματα μικρής κλίμακας, επιλέχθηκε να μελετηθούν τα Δείγματα Β και Δ σε συνθήκες high gravity. Η υδρόλυση πραγματοποιήθηκε σε αντιδραστήρα ελεύθερης πτώσης και η συγκέντρωση στερεών ήταν 24% w/w. Μελετήθηκε αρχικά η απελευθέρωση γλυκόζης κατά την προϋδρόλυση, με τις τιμές συγκέντρωσης για τις 12h και τις 24h να είναι: Β(12h: 130.5 mg/mL, 24h: 148.3 mg/mL), Δ (12h: 118.6 mg/mL, 24h: 141.1 mg/mL). Στη συνέχεια, το υδρόλυμα οδηγήθηκε προς ζύμωση, ενώ για το Δείγμα Β μελετήθηκε η επίδραση της προσθήκης επιπλέον κυτταρινολυτικού ενζύμου στο υδρόλυμα στην απόδοση αιθανόλης. Οι μέγιστες συγκεντρώσεις αιθανόλης για το Δείγμα Β ήταν: 12h προϋδρόλυσης άνευ επιπλέον ενζύμου: 64.9 ± 2.96 mg/mL, 12h προϋδρόλυσης με επιπλέον ένζυμο (6 mg/g DM): 66.5 ± 1.06 mg/mL, 24h προϋδρόλυσης άνευ επιπλέον ενζύμου: 75.5 ± 4.93 mg/mL, 24h προϋδρόλυσης με επιπλέον ένζυμο (6 mg/g DM): 71.5 ± 1.63 mg/mL. Το Δείγμα Δ στο ενζυμικό φορτίο 9 mg/g DM παρουσίασε μικρότερη συγκέντρωση αιθανόλης, 64.5 ± 1.28 mg/mL. Η επίτευξη μικρότερης τελικής συγκέντρωσης αιθανόλης στο Δείγμα Δ από ότι στο Δείγμα Β, συνδέεται εν μέρει με τη μικρότερη παραγωγή σακχάρων κατά την προϋδρόλυση και την πιθανή ύπαρξη παρεμποδιστών της ζύμωσης στο υδρόλυμα.

Οι συγκεντρώσεις αιθανόλης που επιτεύχθηκαν και στα δύο υλικά είναι ικανοποιητικές, συγκρινόμενες με τη βιβλιογραφία. Στον Πίνακα 10.1 εμφανίζονται ενδεικτικά οι αποδόσεις σε αιθανόλη λιγνινοκυτταρινούχων υλικών κατεργασμένων σε συνθήκες high gravity. Παρατηρείται ότι η συγκέντρωση αιθανόλης που μετρήθηκε στην παρούσα εργασία είναι από τις μεγαλύτερες στη βιβλιογραφία για το στέλεχος αραβοσίτου. Συγκρίνοντας τα αποτελέσματα με άλλες εφαρμογές ζύμωσης στελέχους αραβοσίτου προκατεργασμένου με έκρηξη ατμού (Lu et al. 2010, Liu et al. 2014) συμπεραίνεται ότι το αποτέλεσμα της παρούσας εργασίας υπερτερεί.

Τέλος, πραγματοποιήθηκε υδρόλυση σε διαφορετικές συγκεντρώσεις αρχικών στερεών ώστε να διαπιστωθεί η επίδραση τους στην ενζυμική υδρόλυση. Διαπιστώθηκε ότι η απόδοση της υδρόλυσης στα συμβατικά συστήματα μειώνεται σχεδόν γραμμικά με την αύξηση της συγκέντρωσης στερεών, ενώ αυξάνεται ραγδαία στις υψηλές συγκεντρώσεις στερεών του συστήματος αναδευτήρα ελεύθερης πτώσης. Αναδεικνύεται έτσι η σημασία του συστήματος ανάδευσης για την επιτυχία της διεργασίας.

Πίνακας 10.1: Βιβλιογραφική επισκόπηση της απόδοσης σε αιθανόλη διαφορετικών προκατεργασμένων λιγνινοκυτταρινούχων υλικών

| Υλικό | Προκατεργασία | Συγκέντρωση στερεών (%) | Συγκέντρωση αιθανόλης (g/L) | Απόδοση % | Αναφορά |
|-----------------------|--|-------------------------|-----------------------------|-----------|-------------------------------------|
| Corn Stover | Steam explosion (0.2% H ₂ SO ₄) | 24% | 75.5 ± 4.93 | 72% | Παρούσα εργασία |
| Corn Stover | Organosolv | 24% | 64.5 ± 1.28 | 57% | Παρούσα εργασία |
| Corn Stover | Steam explosion | 30% | 49.5 | 68.2% | (Lu et al. 2010) |
| Corn Stover | Steam explosion | 20% | 59.8 | 77.2% | (Liu et al. 2014) |
| Corn Stover | Υδροθερμική | 24% | 41.5 | 50.9% | (Katsimpouras, et al. 2016) |
| Rice Straw | Όξινη (Maleic acid) | 20% | - | 62.8% | (Jung et al. 2015) |
| Έλατο | Steam Explosion | 25% | 47.8 | 72% | (Hoyer et al. 2013) |
| Σπάδικας αραβοσίτου | Αραιού οξέος | 20% | 75.0 | 89.4% | (Lei et al. 2009) |
| Άχυρο σίτου | Steam explosion | 25% | 58.6 | 56.9% | (Alvira et al. 2013) |
| Sweet Sorghum Bagasse | Υδροθερμική | 18% | 47.9 | 70.4% | (Matsakas and Christakopoulos 2013) |
| Καλάμι | Φωσφορικό οξύ-ακετόνη | 36% | 69.3 | 74.7% | (Li et al. 2009) |
| Στέλεχος ελαιοκράμβης | Αραιού οξέος | 20% | 39.9 | 57.9% | (Lopez-Linares et al. 2014) |

Στο δεύτερο μέρος της παρούσας διπλωματικής εργασίας πολλαπλασιάστηκε και εκφράστηκε γονίδιο GH30 με πιθανή ξυλανολυτική δράση (putative xylanase). Στόχος της παραγωγής του καινοτόμου γονιδίου είναι η διερεύνηση της συνεργητικής δράσης που

πιθανώς να έχει στην υδρόλυση της βιομάζας, ώστε να αυξηθεί ακόμα περισσότερο η απόδοση της συνολικής διεργασίας.

Το γονίδιο της οικογένειας GH30 συντέθηκε τεχνητά και πολλαπλασιάστηκε σε βακτηριαξενιστές *E. coli* TOP10 μετά από μετασηματισμό με θερμικό σοκ. Στη συνέχεια, το γονίδιο απομονώθηκε από τα βακτήρια, καθαρίστηκε και κόπηκε με τα περιοριστικά ένζυμα Cla I και Xba I (αντίδραση περιορισμού-πέψη). Το πλασμίδιο pPICZαC χρησιμοποιήθηκε ως φορέας κλωνοποίησης και κόπηκε με τα ίδια περιοριστικά ένζυμα.

Ακολούθησε αντίδραση λιγάσης ανάμεσα στο πλασμίδιο pPICZαC και το γονίδιο και εκ νέου μετασηματισμός βακτηρίων *E. coli* TOP10. Η αντίδραση λιγάσης στέφθηκε με επιτυχία, καθώς τα τρυβλία control περιείχαν πολύ μικρό αριθμό αποικιών. Στη συνέχεια επιλέχθηκαν τυχαία 10 αποικίες από τα τρυβλία της αντίδρασης λιγάσης και διαπιστώθηκε με δοκιμή restriction analysis πως όλες είχαν παραλάβει το ανασυνδυασμένο πλασμίδιο. Εμβολιάστηκαν υγρές αποικίες, από τις οποίες απομονώθηκε και καθαρίστηκε το ανασυνδυασμένο πλασμίδιο. Ακολούθησε μετασηματισμός κυττάρων *P. pastoris* με τη μέθοδο της ηλεκτροδιάτρησης και καλλιέργεια αυτών. Η ενεργότητα του ενζύμου προσδιορίστηκε με έλεγχο Plate Assay.

10.2 Μελλοντικές προκλήσεις

Στις μελλοντικές προκλήσεις της συγκεκριμένης μελέτης περιλαμβάνεται η εξέλιξη μεθόδων και τεχνικών για την περαιτέρω αύξηση της συνολικής απόδοσης αιθανόλης. Αρχικά, θα μπορούσε να μελετηθεί ως εναλλακτική μέθοδος προκατεργασίας ένας συνδυασμός των μεθόδων έκρηξης ατμού και organosolv. Καθώς αποδείχθηκε ότι η έκρηξη ατμού συντελεί στην αποτελεσματική απομάκρυνση της ημικυτταρίνης από τη βιομάζα και η μέθοδος organosolv στην εκχύλιση της λιγνίνης, αναμένεται ο συνδυασμός των δύο μεθόδων να οδηγεί σε υλικό ιδιαίτερα πλούσιο σε κυτταρίνη. Σε αυτή την περίπτωση η ενζυμική υδρόλυση θα ήταν ιδιαίτερος αποδοτική, φθάνοντας σε μεγάλες αποδόσεις γλυκόζης. Με τον τρόπο αυτό, οι συνεπαγόμενες υψηλές συγκεντρώσεις αιθανόλης θα μείωναν το κόστος διαχωρισμού. Η μείωση του κόστους διαχωρισμού και η αύξηση της απόδοσης θα δικαιολογούσε πιθανώς το επιπλέον κόστος της προκατεργασίας.

Ένας παράγοντας που επηρεάζει σημαντικά τη συνολική απόδοση, και που δε μελετήθηκε εκτεταμένα στην παρούσα εργασία, είναι η ύπαρξη παρεμποδιστών. Όπως έχει δειχθεί στη βιβλιογραφία, (Liu et al. 2014) η υψηλή συγκέντρωση παρεμποδιστών μπορεί να δυσχεράνει έντονα τη διεργασία της ζύμωσης και, στη χειρότερη περίπτωση, να οδηγήσει σε υδρόλυμα που δεν είναι δυνατόν να ζυμωθεί. Στην παρούσα εργασία, η προεπεξεργασία της πρώτης ύλης ακολουθήθηκε από πλύση, ώστε η πλειονότητα των παρεμποδιστών να απομακρυνθούν στο υγρό κλάσμα της προκατεργασίας. Ένας ακόμα τρόπος για την απομάκρυνση των παρεμποδιστών σε κάθε στάδιο της διεργασίας είναι η αποτοξικοποίηση. Η αποτοξικοποίηση μπορεί να πραγματοποιηθεί ακόμα και μετά την ενζυμική υδρόλυση, με στόχο την ενίσχυση της ζύμωσης. Υποσχόμενες μέθοδοι αποτοξικοποίησης είναι οι βιολογικές, με τη χρήση ενζύμων όπως της λακκάσης να επικρατούν. Η απομάκρυνση των φαινολικών ενώσεων με τη χρήση λακκάσης έχει δώσει θετικά δείγματα στη βιβλιογραφία για βελτίωση της διεργασίας ζύμωσης σε στελέχη που

έχουν προκαταρταστεί με έκρηξη ατμού (Jurado et al. 2009). Θα ήταν ενδιαφέρον να μελετηθεί η επίδραση της αποτοξικοποίησης με λακκάση στο συγκεκριμένο πείραμα, για την πιθανή επίτευξη ακόμα υψηλότερων συγκεντρώσεων αιθανόλης.

Μια ακόμα αλλαγή στη διεργασία που θα μπορούσε να μελετηθεί είναι η πραγματοποίηση της ζύμωσης στον αναδευτήρα free fall mixer κατά τη διαδικασία high gravity. Σε περίπτωση που η ζύμωση γίνεται ταυτόχρονα με τη σακχαροποίηση, η γλυκόζη καταναλώνεται και το κυτταρινολυτικό σύστημα απελευθερώνεται από την παρεμπόδιση του προϊόντος. Έτσι, ενδέχεται η συνολική απόδοση σε σάκχαρα και αιθανόλη να είναι υψηλότερη. Θα παρουσίαζε ενδιαφέρον να διερευνηθεί κατά πόσον η αλλαγή αυτή θα οδηγούσε τελικά σε καλύτερα αποτελέσματα. Ας σημειωθεί ότι η ταυτόχρονη σακχαροποίηση και ζύμωση είναι δύσκολο να πραγματοποιηθεί στην ίδια συσκευή που χρησιμοποιήθηκε στην παρούσα εργασία για την υδρόλυση, καθώς υπάρχουν πιθανότητες απωλειών και μολύνσεων του μίγματος.

Τέλος, όσον αφορά στο δεύτερο μέρος της εργασίας, της παραγωγής δηλαδή ενζύμου με ξυλανολυτική δράση, εκκρεμεί ο χαρακτηρισμός του ενζύμου και η μελέτη της συνεργιστικής δράσης. Από τις αποικίες που θα αναπτύξουν ενεργότητα θα πρέπει να εμβολιαστούν υγρές καλλιέργειες, ώστε να παραχθεί το ένζυμο σε μεγάλες ποσότητες και να καθαριστεί. Θα ακολουθήσει έλεγχος της ενεργότητας σε εύρος pH και θερμοκρασιών, καθώς και έλεγχος των υποστρωμάτων στα οποία επιδρά. Τέλος, θα πρέπει να μελετηθεί η συνεργιστική δράση του νέου ενζύμου στην υδρόλυση της βιομάζας, ώστε να εκτιμηθεί η πιθανή αύξηση της συνολικής απόδοσης σε προϊόν. Σύμφωνα με τη βιβλιογραφία (Hu et al. 2015) ο συνεργιστισμός ανάμεσα σε κυτταρινάσες και ξυλανάσες διευκολύνει κατά πολύ την υδρόλυση σε υψηλές συγκεντρώσεις στερεών.

V. Βιβλιογραφία

- Ahgren, Karin, Renata Bura, Jack Saddler, and Guido Zacchi. 2007. "Effect of Hemicellulose and Lignin Removal on Enzymatic Hydrolysis of Steam Pretreated Corn Stover." *Bioresource Technology* 98(13):2503–10.
- Adney, B. and J. Baker Nrel. 2008. "Measurement of Cellulase Activities Laboratory Analytical Procedure (LAP) Issue Date : 08 / 12 / 1996 Measurement of Cellulase Activities Laboratory Analytical Procedure (LAP)." (January).
- Alberts B, Johnson A, Lewis J, et al. 2002. "The Plant Cell Wall." in *Molecular Biology of the Cell*. New York: New York: Garland Science. Retrieved (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK26928/>).
- Alvira, P., E. Tomàs-Pejó, M. Ballesteros, and M. J. Negro. 2010. "Pretreatment Technologies for an Efficient Bioethanol Production Process Based on Enzymatic Hydrolysis: A Review." *Bioresource Technology* 101(13):4851–61.
- Brazilian President Christens Iogen Technology at Official Opening of Costa Pinto Cellulosic Ethanol Facility.*
- "Iogen Corp." Retrieved May 15, 2016b (<http://www.iogen.ca/>).
- Arantes, Valdeir and Jack N. Saddler. 2010. "Access to Cellulose Limits the Efficiency of Enzymatic Hydrolysis: The Role of Amorphogenesis." *Biotechnology for biofuels* 3:4.
- Balat, Mustafa, Havva Balat, and Cahide. 2008. "Progress in Bioethanol Processing." *Progress in Energy and Combustion Science* 34(5):551–73.
- Berka, R. M. et al. 2011. "Comparative Genomic Analysis of the Thermophilic Biomass-Degrading Fungi *Myceliophthora thermophila* and *Thielavia terrestris*." *Nature Biotechnology* 29(10):922–27.
- Bradford, Marion M. 1976. "A Rapid and Sensitive Method for the Quantitation of Microgram Quantities of Protein Utilizing the Principle of Protein-Dye Binding." *Analytical Biochemistry* 72(1-2):248–54.
- Brodeur, Gary et al. 2011. "Chemical and Physicochemical Pretreatment of Lignocellulosic Biomass : A Review." 2011.
- Cadenas, Alfredo and Sara Cabezudo. 1998. "Biofuels as Sustainable Technologies: Perspectives for Less Developed Countries." *Technological Forecasting and Social Change* 58(1-2):83–103. Retrieved
- Collins, Tony, Charles Gerday, and Georges Feller. 2005. "Xylanases, Xylanase Families and Extremophilic Xylanases." *FEMS Microbiology Reviews* 29(1):3–23.
- Dogaris, Ioannis, Diomi Mamma, and Dimitris Kekos. 2013. "Biotechnological Production of Ethanol from Renewable Resources by *Neurospora crassa*: An Alternative to Conventional Yeast Fermentations?" *Applied Microbiology and Biotechnology* 97(4):1457–73.
- Froger, Alexandrine and James E. Hall. 2007. "Transformation of Plasmid DNA into *E. coli* Using the Heat Shock Method." *Journal of visualized experiments : JoVE* (6):253.

- Galbe, M. and Guido Zacchi. 2002. "A Review of the Production of Ethanol from Softwood." *Applied Microbiology and Biotechnology* 59(6):618–28.
- Georgieva, Tania I., Xiaoru Hou, Troels Hilstrøm, and Birgitte K. Ahring. 2008. "Enzymatic Hydrolysis and Ethanol Fermentation of High Dry Matter Wet-Exploded Wheat Straw at Low Enzyme Loading." *Applied Biochemistry and Biotechnology* 148(1):35–44. Retrieved (<http://dx.doi.org/10.1007/s12010-007-8085-z>).
- Ghose, T. K. 1987. "Measurement of Cellulase Activities." *Pure and Applied Chemistry* 59(2):257–68. Retrieved (<http://www.iupac.org/publications/pac/1987/pdf/5902x0257.pdf> \ <http://www.degruyter.com/view/j/pac.1987.59.issue-2/pac198759020257/pac198759020257.xml>).
- Gray, Kevin A., Lishan Zhao, and Mark Emptage. 2012. "Bioethanol."
- Haghighi Mood, Sohrab et al. 2013. "Lignocellulosic Biomass to Bioethanol, a Comprehensive Review with a Focus on Pretreatment." *Renewable and Sustainable Energy Reviews* 27:77–93.
- Hahn-Hägerdal, Bärbel, Kaisa Karhumaa, César Fonseca, Isabel Spencer-Martins, and Marie F. Gorwa-Grauslund. 2007. "Towards Industrial Pentose-Fermenting Yeast Strains." *Applied Microbiology and Biotechnology* 74(5):937–53.
- Hayes, Daniel J. 2009. "An Examination of Biorefining Processes, Catalysts and Challenges." *Catalysis Today* 145(1-2):138–51.
- Hoyer, Kerstin, Mats Galbe, and Guido Zacchi. 2013. "The Effect of Prehydrolysis and Improved Mixing on High-Solids Batch Simultaneous Saccharification and Fermentation of Spruce to Ethanol." *Process Biochemistry* 48(2):289–93.
- Hu, Jinguang et al. 2015. "The Addition of Accessory Enzymes Enhances the Hydrolytic Performance of Cellulase Enzymes at High Solid Loadings." *Bioresource Technology* 186:149–53.
- Iea. 2007. "IEA Technology Essentials-Biofuel Production." *International Energy Agency* 1–4. Retrieved
- Invitrogen. n.d. "Manual: Pichia Expression Vectors for Selection on Zeocin™ and Purification of Recombinant Proteins."
- St. John, Franz J., John D. Rice, and James F. Preston. 2006. "Characterization of XynC from *Bacillus Subtilis* Subsp. *Subtilis* Strain 168 and Analysis of Its Role in Depolymerization of Glucuronoxylan." *Journal of Bacteriology* 188(24):8617–26.
- Jung, Young Hoon et al. 2015. "Combination of High Solids Loading Pretreatment and Ethanol Fermentation of Whole Slurry of Pretreated Rice Straw to Obtain High Ethanol Titrers and Yields." *Bioresource Technology* 198:861–66.
- Jurado, Miguel, Alicia Prieto, Ángeles Martínez-alcalá, Ángel T. Martínez, and María Jesús Martínez. 2009. "Bioresource Technology Laccase Detoxification of Steam-Exploded Wheat Straw for Second Generation Bioethanol." *Bioresource Technology* 100(24):6378–84.

- Kang, Qian, Lise Appels, Tianwei Tan, and Raf Dewil. 2014. "Bioethanol from Lignocellulosic Biomass : Current Findings Determine Research Priorities." 2014(Ci).
- Karp, Gerald. 2010. *Cell and Molecular Biology Concepts and Experiments*. John Wiley & Sons.
- Katsimpouras, Constantinos, Paul Christakopoulos, and Evangelos Topakas. 2016. "Acetic Acid-Catalyzed Hydrothermal Pretreatment of Corn Stover for the Production of Bioethanol at High-Solids Content." *Bioprocess and Biosystems Engineering*. Retrieved
- Keen, N. T., C. Boyd, and B. Henrissat. 1996. "Cloning and Characterization of a Xylanase Gene from Corn Strains of *Erwinia Chrysanthemi*." *Molecular plant-microbe interactions : MPMI* 9(7):651–57.
- Koppram, Rakesh, Elia Tomás-Pejó, Charilaos Xiros, and Lisbeth Olsson. 2014. "Lignocellulosic Ethanol Production at High-Gravity: Challenges and Perspectives." *Trends in Biotechnology* 32(1):46–53.
- Kristensen, Jan B., Johan Brjesson, Maria H. Bruun, Folke Tjerneld, and Henning Jørgensen. 2007. "Use of Surface Active Additives in Enzymatic Hydrolysis of Wheat Straw Lignocellulose." *Enzyme and Microbial Technology* 40(4):888–95.
- Kumar, Parveen et al. 2009. "Methods for Pretreatment of Lignocellulosic Biomass for Efficient Hydrolysis and Biofuel Production Methods for Pretreatment of Lignocellulosic Biomass for Efficient Hydrolysis and Biofuel Production."
- Liu, Zhi-Hua, Lei Qin, Jia-Qing Zhu, Bing-Zhi Li, and Ying-Jin Yuan. 2014. "Simultaneous Saccharification and Fermentation of Steam-Exploded Corn Stover at High Glucan Loading and High Temperature." *Biotechnology for biofuels* 7(1):167. Retrieved (
- Lu, Yifeng et al. 2010. "Influence of High Solid Concentration on Enzymatic Hydrolysis and Fermentation of Steam-Exploded Corn Stover Biomass." *Applied Biochemistry and Biotechnology* 160(2):360–69.
- Luo, Huiying et al. 2010. "Molecular Cloning and Characterization of the Novel Acidic Xylanase XYLD from *Bispora* Sp. MEY-1 That Is Homologous to Family 30 Glycosyl Hydrolases." *Applied Microbiology and Biotechnology* 86(6):1829–39.
- Lynd, Lee R., Paul J. Weimer, Willem H. van Zyl, and Isak S. Pretorius. 2002. "Microbial Cellulose Utilization: Fundamentals and Biotechnology." *Microbiology and molecular biology reviews : MMBR* 66(3):506–77, table of contents.
- MacLean, Heather L. and Lester B. Lave. 2003. "Evaluating Automobile Fuel/propulsions System Technologies." *Progress in Energy and Combustion Science* 29(1):1–69.
- Mazeau, Karim, Charlotte Moine, Pierre Krausz, and Vincent Gloaguen. 2005. "Conformational Analysis of Xylan Chains." *Carbohydrate Research* 340(18):2752–60.

- Miller, Gail Lorenz. 1959. "Use of Dinitrosalicylic Acid Reagent for Determination of Reducing Sugar." *Analytical Chemistry* 31(3):426–28.
- Mosier, Nathan et al. 2005. "Features of Promising Technologies for Pretreatment of Lignocellulosic Biomass." *Bioresource Technology* 96(6):673–86.
- Motta, Fl, Ccp Andrade, and Mha Santana. 2013. "A Review of Xylanase Production by the Fermentation of Xylan: Classification, Characterization and Applications." *Intech Chapter 10*:251–75.
- Panesar, Parmjit S., Satwinder S. Marwaha, and John F. Kennedy. 2006. "Zymomonas Mobilis: An Alternative Ethanol Producer." *Journal of Chemical Technology and Biotechnology* 81(4):623–35.
- Saha, Badal C. 2003. "Hemicellulose Bioconversion." *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology* 30(5):279–91.
- Sarkar, Nibedita, Sumanta Kumar Ghosh, Satarupa Bannerjee, and Kaustav Aikat. 2012. "Bioethanol Production from Agricultural Wastes: An Overview." *Renewable Energy* 37(1):19–27.
- Segal, L.C. Creely Jt. J, Martin S. E. J. 1959. "An Empirical Method for Estimating the Degree of Crystallinity of Native Cellulose Using the X-Ray Diffractometer." *Textile Research Journal*.
- Sims, Ralph E. H., Warren Mabee, Jack N. Saddler, and Michael Taylor. 2010. "An Overview of Second Generation Biofuel Technologies." *Bioresource Technology* 101(6):1570–80.
- Singh, Bijender. 2014. "Myceliophthora Thermophila Syn. Sporotrichum Thermophile: A Thermophilic Mould of Biotechnological Potential." *Critical reviews in biotechnology* 8551(March):1–11.
- Sluiter, A. et al. 2012. "Determination of Structural Carbohydrates and Lignin in Biomass Determination of Structural Carbohydrates and Lignin in Biomass." 2011(April 2008).
- St John, Franz J., Javier M. Gonzalez, and Edwin Pozharski. 2010. "Consolidation of Glycosyl Hydrolase Family 30: A Dual Domain 4/7 Hydrolase Family Consisting of Two Structurally Distinct Groups." *FEBS Letters* 584(21):4435–41.
- Stelte, Wolfgang. n.d. "Steam Explosion for Biomass Pre-Treatment."
- Subramaniyan, S. and P. Prema. 2002. "Biotechnology of Microbial Xylanases : Enzymology , Molecular Biology , and Application." 22(906380202):33–46.
- Sun, Ning, Hector Rodriguez, Mustafizur Rahman, and Robin D. Rogers. 2011. "Where Are Ionic Liquid Strategies Most Suited in the Pursuit of Chemicals and Energy from Lignocellulosic Biomass?" *Chem. Commun.* 47(5):1405–21.
- Sun, Ye and Jiayang Cheng. 2002. "Hydrolysis of Lignocellulosic Materials for Ethanol Production: A Review." *Bioresource Technology* 83(1):1–11.
- Suzuki, T., K. Ibata, M. Hatsu, K. Takamizawa, and K. Kawai. 1997. "Cloning and Expression of a 58-kDa Xylanase VI Gene (Xynd) of Aeromonas-Caviae Me-1 in Escherichia-Coli Which Is Not Categorized as a Family-F or Family-G Xylanase."

- Journal of Fermentation and Bioengineering* 84(1):86–89.
- Talebna, Farid, Dimitar Karakashev, and Irimi Angelidaki. 2010. "Production of Bioethanol from Wheat Straw: An Overview on Pretreatment, Hydrolysis and Fermentation." *Bioresource Technology* 101(13):4744–53.
- Wild, P. J. De et al. 2015. "Organosolv Fractionation of Lignocellulosic Biomass for an Integrated Biorefinery." (February):1–4.
- Zacchi, G. 2006. "Bio-Ethanol – the Fuel of Tomorrow from the Residues of Today." 24(12).
- Zhao, Xin-qing, Li-han Zi, Feng-wu Bai, Hai-long Lin, and Xiao-ming Hao. 2012. "Bioethanol from Lignocellulosic Biomass." (December 2011):25–51.
- Μουκούλη, Μαρία. 2012. "Χρήση Μοριακών Εργαλείων Για Τη Μελέτη Της Καταλυτικής Εξειδίκευσης Των Εστερασών Του Φερουλικού Οξέος."
- Χριστακόπουλος, Παύλος and Ευάγγελος Τόπακας. 2013. *Βιοτεχνολογία Παραγωγής Βιοκαυσίμων*. Αθήνα: Εσωτερικές Εκδόσεις ΕΜΠ.

