ΕΘΝΙΚΟ ΜΕΤΣΟΒΙΟ ΠΟΛΥΤΕΧΝΕΙΟ

ΣΧΟΛΗ ΧΗΜΙΚΩΝ ΜΗΧΑΝΙΚΩΝ

Τομέας IV:

Τομέας Σύνθεσης και Ανάπτυξης Βιομηχανικών Διαδικασιών

ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΟ ΒΙΟΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑΣ

Διπλωματική Εργασία:

ΠΑΡΑΓΩΓΗ ΑΙΘΑΝΟΛΗΣ ΑΠΟ ΤΗ ΖΥΜΗ *TRICHOSPORON FERMENTANS*

ΖΟΥΛΙΑΤΗΣ ΑΛΕΞΑΝΔΡΟΣ

Επιβλέπων: ΤΟΠΑΚΑΣ ΕΥΑΓΓΕΛΟΣ

Αθήνα

Σεπτεμβριος 2016

Maybe you'll marry, maybe you won't

Maybe you'll have children, maybe you won't

Whatever you do, don't congratulate yourself too much

Or berate yourself either

Your choices are half chance, so are everybody else's

Quindon Tarver – *Everybody's Free*

ΠΡΟΛΟΓΟΣ

Η παρούσα διπλωματική εργασία πραγματοποιήθηκε στο εργαστήριο Βιοτεχνολογίας της Σχολής Χημικών Μηχανικών του ΕΜΠ. Με την ολοκλήρωσή της θα ήθελα να ευχαριστήσω όσους συνέβαλαν στην διεκπεραίωσή της. Αρχικά, θα ήθελα να απευθύνω τις ευχαριστίες μου στον επιβλέποντα καθηγητή της εργασίας μου κ. Τόπακα Ευάγγελο για τη βοήθεια και τις συμβουλές που μου προσέφερε, καθώς και στον κ. Χριστακόπουλο Παύλο, επιβλέποντα στα αρχικά στάδια της εργασίας μου για τις υποδείξεις και την καθοδόγησή του.

Ιδιαίτερα θα ήθελα να ευχαριστήσω το Δρ. Θωμά Πάσχο για την άριστη συνεργασία και βοήθεια που μου προσέφερε καθόλη τη διάρκεια εκπόνησης της εργασίας αυτής, από το πρώτο πείραμα έως την τελευταία τελεία. Χωρίς τις συμβουλές και την κατανόηση που επέδειξε η ολοκλήρωση αυτής της διπλωματικής εργασίας δε θα ήταν εφικτή, ήταν τιμή μου που συνεργάστηκα μαζί του. Ακόμα θα ήθελα να ευχαριστήσω τον Δρ. Μάτσακα Λεωνίδα για την αρχική σύλληψη της ιδέας του θέματος αυτής της διπλωματικής εργασίας και για την συνεπακόλουθη συνεργασία. Θερμές ευχαριστίες θα ήθελα να απευθύνω και σε όλο το υπόλοιπο προσωπικό του Εργαστηρίου Βιοτεχνολογίας. Η συμπεριφορά τους συνέβαλε στη δημουργία ενός φιλόξενου και ιδιαίτερα ευχάριστου και μαθησιακού περιβάλλοντος, πράγμα ιδιαίτερα σημαντικό καθώς το Εργαστήριο Βιοτεχνολογίας ήταν η καθημερινότητα μου για έναν περίπου χρόνο.

Τέλος, ολοκληρώνοντας αυτή τη διπλωματική εργασία και κλείνοντας ένα ιδιαίτερα μεγάλο και σημαντικό κεφάλαιο της ζωής μου θα ήθελα να ευχαριστήσω τους γονείς μου Αναστασία και Χρήστο για τη απεριόστη συμπαράσταση και την υποστήριξη που επέδειξαν όλα αυτά τα χρόνια, καθώς και τους φίλους που απέκτησα σε αυτό το διάστημα, με τους οποίους πορευτήκαμε μαζί σε αυτό το ταξίδι της γνώσης και ήταν πάντα παρόντες σε όλες τις δυσκολίες.

ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ

ΠΡΟΛΟΓΟΣ 2
ΠΕΡΙΛΗΨΗ 6
ABSTRACT 8
1 ΕΙΣΑΓΩΓΗ 11
2 ΒΙΟΚΑΥΣΙΜΑ 15
3 ΒΙΟΝΤΙΖΕΛ 18
4 ΒΙΟΑΙΘΑΝΟΛΗ 21
4.1 Γενικά 21
4.2 Πρώτες ύλες παραγωγής βιοαιθανόλης 24
3.1.1 Σακχαρούχα και αμυλούχα φυτά 25
4.2.1 Λιγνινοκυτταρινούχος βιομάζα 28
4.3 Μέθοδοι προκατεργασίας 31
4.3.1 Φυσικές μέθοδοι 32
4.3.2 Φυσικοχημικές μέθοδοι 32
4.3.3 Χημικές μέθοδοι προκατεργασίας 36
4.3.4 Βιολογική προκατεργασία 38
4.4 Μέθοδοι υδρόλυσης 38
4.4.1 Όξινη υδρόλυση 39
4.4.2 Ενζυμική υδρόλυση 39
5 ΔΙΕΡΓΑΣΙΕΣ ΠΑΡΑΓΩΓΗΣ ΒΙΟΑΙΘΑΝΟΛΗΣ ΚΑΙ ΒΙΟΝΤΙΖΕΛ 42
5.1 Παραγωγή βιοντίζελ 42
5.1.1 Κλασσικές μέθοδοι 42
5.1.2 Μικροβιακό λίπος 44
5.2 Παραγωγή βιοαιθανόλης 45
5.2.1 Διακριτή υδρόλυση και ζύμωση 45
5.2.2 Ταυτόχρονη σακχαροποίηση και ζύμωση 46
5.2.3 Ενοποιημένη διεργασία 47
6 Μικροοργανισμοί για την παραγωγή αιθανόλης και ενδοκυτταρικού λίπους 48

6.1.1 Αλκοολική ζύμωση 48
6.1.2 Αιθανολοπαραγωγοί Μικροοργανισμοί 51
6.1.3 Αναστολείς της αλκοολικής ζύμωσης 53
6.2.1 Έλαια από μονοκύτταρους μικροοργανισμούς 54
6.2.2 Ο μύκητας *Fusarium Oxysporum* 56
6.2.3 Η ζύμη *Trichosporon fermentans* 57
7 ΜΕΘΟΔΟΙ ΚΑΙ ΥΛΙΚΑ 59
7.1 Μικροοργανισμοί 59
7.2 Πρώτες ύλες και χημικά αντιδραστήρια 59
7.3 Όργανα και συσκευές 60
7.4 Υδροθερμικά προκατεργασμένο άχυρο σίτου 60
7.5 Προκαλλιέργεια της ζύμης *Trichosporon fermentans* 61
7.6 Προκαλλιέργεια και παραγωγή κυτταρικής βιομάζας του μύκητα *Fusarium oxysporum* 62
7.7 Επιλογή πηγής αζώτου για τη μικροβιακή ανάπτυξη του *T. fermentans* και την παραγωγή αιθανόλης σε βυθμισμένες καλλιέργειες. 62
7.8 Επίδραση του pH στην παραγωγή αιθανόλης από τον *T. fermentans* 63
7.9 Επίδραση της αρχικής συγκέντρωσης της γλυκόζης στην παραγωγή αιθανόλης από τον *T. fermentans.* 63
7.10 Παραγωγή αιθανόλης από αναερόβιες βυθισμένες καλλιέργειες του *T. fermentans* παρουσία αιθανόλης 64
7.11 Παραγωγή αιθανόλης από αναερόβιες βυθισμένες καλλιέργειες του *T. fermentans* με χρήση διαφορετικών υποστρωμάτων. 64
7.12 Ρευστοποίηση άχυρου σίτου και συγκαλλιέργεια *Trichosporon fermemtans* και *Fusarium oxysporum* στο ρευστοποιημένο άχυρο σίτου για την παραγωγή αιθανόλης. 65
7.13 Αναλυτικές μέθοδοι 66
8 ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ ΚΑΙ ΣΧΟΛΙΑΣΜΟΣ 72
8.1 Επίδραση της πηγής αζώτου στη μικροβιακή ανάπτυξη και στην παραγωγή αιθανόλης του *T. fermentans.* 72
8.2 Επίδραση του pH στην παραγωγή αιθανόλης από τον *T. fermentans* 79
8.3 Επίδραση της αρχικής συγκέντρωσης γλυκόζης στην παραγωγή αιθανόλης από τον *T. fermentans* 84
8.4 Μελέτη παραγωγής αιθανόλης από τον *Trichosporon fermentans* σε αυξανόμενες αρχικές συγκεντρώσεις αιθανόλης. 91

8.5 Χρήση διαφορετικών υποστρωμάτων για την παραγωγή αιθανόλης από βυθισμένες καλλιέργειες του *T. fermentans*..... 93

8.6 Συγκαλλιέργεια *T.fermentans* και *F. oxysporum* σε ρευστοποιημένο πλούσιο σε ημικυτταρίνη άχυρο σίτου. 98

9 ΓΕΝΙΚΑ ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ 104

ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ..... 107

ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Σκοπός της παρούσα διπλωματικής εργασίας ήταν η μελέτη της παραγωγής αιθανόλης από τη ζύμη *Trichosporon fermentans*, ένας μικροοργανισμός που έχει μελετηθεί εκτενώς ως προς την ικανότητά του να συσσωρεύει ενδοκυτταρικό λίπος αλλά όχι ως προς την ικανότητά του να παράγει αιθανόλη. Για το λόγο αυτό διεξήχθησαν πειράματα τόσο σε απλά όσο και σε σύνθετα υποστρώματα .

Πιο συγκεκριμένα, στις πρώτες σειρές πειραμάτων διερευνήθηκαν ζυμώσεις σε απλά υποστρώματα προκειμένου να εξακριβωθούν οι βελτίστες συνθήκες παραγωγής αιθανόλης από το μικροοργανισμό. Έγιναν πειράματα που εξέτασαν διαφορετικές πηγές αζώτου, διαφορετικά pH καλλιέργειας, διαφορετικές αρχικές συγκεντρώσεις γλυκόζης και διαφορετικές πηγές άνθρακα. Βρέθηκε ότι η παραγωγή αιθανόλης προάγεται ιδιαίτερα χρησιμοποιώντας ως πηγή αζώτου μίγμα yeast extract και πεπτόνης 10 g/L και αναλογίας 1:1. Ο *T. fermentans* παρουσίασε καλή προσαρμοστικότητα σε περιβάλλοντα ήπια όξινα έως ήπια αλκαλικά, ώστοσο η καλύτερη παραγωγή αιθανόλης παρατηρήθηκε για pH 6.0. Χρησιμοποιώντας αυτά τα ευρήματα, στην επόμενη σειρά πειραμάτων που αφορούσε την παρατήρηση ζυμώσεων σε αυξανόμενες συγκεντρώσεις γλυκόζης στο μέσο καλλιέργειας, βρέθηκε ότι ο μικροοργανισμός διεξάγει γρήγορες και αποτελεσματικές ζυμώσεις για αρχικές τιμές γλυκόζης 25 – 100 g/L με τον καλύτερο συντελεστή μετατροπής υποστρώματος να υπολογίζεται στα 0.461 g/g για συγκέντρωση 50 g/L, ενώ σε συγκεντρώσεις 200 g/L και άνω παρουσιάζεται παρεμπόδιση από το υπόστρωμα. Στη συνέχεια εξετάστηκαν διαφορετικές πηγές άνθρακα, συγκεκριμένα φρουκτόζη, ξυλόζη, αραβινόζη και λακτόζη, από τις οποίες μόνο η φρουκτόζη μπόρεσε να αφομειωθεί ικανοποιητικά από τον *T. fermentans*, με συντελεστή απόδοσης 0.402 g/g, αποτέλεσμα που έρχεται σε αντίθεση με τη βιβλιογραφία, όπου αναφέρεται κατανάλωση και πεντοζών σε αερόβιες συνθήκες. Το φαινόμενο αυτό οδήγησησε στο συμπέρασμα ότι ο μεταβολισμός πεντοζών εξαρτάται σε μεγάλο βαθμό από τις συνθήκες αερισμού και καταπιέζεται σε συνθήκες μικροαερόβιας ζύμωσης. Μία ακόμα παρατήρηση βιοχημικού ενδιαφέροντος είναι η ύπαρξη διαύξιμης ανάπτυξης του *T. fermentans*, καθώς στα μετέπειτα στάδια της ζύμωσης φαίνεται να οξειδώνει την αιθανόλη στο περιβάλλον του για την κάλυψη των ενεργειακών του αναγκών. Επίσης, εξετάστηκε η ανθεκτικότητα του μικροοργανισμού στην αιθανόλη και βρέθηκε ότι η παρουσία αιθανόλης σε συγκεντρώσεις μεγαλύτερες από 3% β/ο στο μέσο ανάπτυξης επηρεάζει ιδιαίτερα την παραγωγή αιθανόλης, ενώ σε συγκεντρώσεις από 7% β/ο η μεταβολική δρστηριότητα σταματά πλήρως και δεν παρουσίαζεται παραγωγή αιθανόλης.

Στο δεύτερο κομμάτι της εργασίας εξετάστηκε η δυνατότητα παραγωγής αιθανόλης από ζύμωση με καλλιέργεια *T. femerntans* και από ζύμωση με συγκαλλιέργεια *T. fermentans* και *F. oxysporum* σε υδροθερμικά προκατεργασμένο άχυρο σίτου πλούσιου σε ημικυτταρίνη με 23% Ξηρή Μάζα (ΞΜ). Το υλικό ρευστοποιήθηκε σε αντιδραστήρα ανάμιξης με ελέυθερη πτώση με την προσθήκη σκευάσματος θερμοενζύμων απελευθερώνοντας το 34.9% των συνολικών περιεχόμενων σακχάρων από τη κυτταρίνη και την ημικυτταρίνη που περιέχονταν. Η ζύμωση του ρευστοποιημένου αχύρου από τον *T. fermentans* απέδωσε 21.63 g/kg ΞΜ με μία απόδοση 29% υπολογισμένη επί των υδρολύμένων σακχάρων. Η συνολική απόδοση της διεργασίας όμως υπολογίζοντας τα συνολικά περιεχόμενα σάκχαρα ήταν μόλις 0.101 g/g, φαινόμενο που αποδόθηκε στη χαμηλή απόδοση της προϋδρόλυσης και στην ύπαρξη πεντοζών που ο *T. fermentans* δεν μπορεί να χρησιμοποιήσει ικανοποιητικά. Η διεργασία βελτιώθηκε σημαντικά με την προσθήκη κυττάρων *F. oxysporum* με το συντελεστή απόδοσης βάσει των υδρολυμένων σακχάρων να φτάνει το 0.39 g/g και την τελική συγκέντρωση αιθανόλης να είναι 28.87 g/kg ΞΜ σημειώνοντας αύξηση 33.5%. Ωστόσο, ο συνολικός συντελεστής απόδοσης της διεργασίας υπολογίζοντας τα συνολικά περιεχόμενα στο άχυρο σάκχαρα ήταν και παλι αρκετά χαμηλός φτάνοντας μόλις το 0.132 g/g. Το φαινόμενο αποδόθηκε και πάλι στην χαμηλή απόδοση της προϋδρόλυσης και ρευστοποίησης καθώς και στην ύπαρξη παρεμποδιστών, όπως υδρόξυ-μέθυλο-φουρφουράλης, φαινολών και οξικού οξέος.

ABSTRACT

The goal of this thesis work was the study of ethanol production from the oleaginous yeast *Trichosporon fermantans*, an organism thoroughly studied for its ability to accumulate lipids but not for its ability to ferment substrates to ethanol. To this end, different experiments were carried out either on simple or synthetic growth media.

At first, the fermentation process was studied on simple media to determine the effects of nitrogen and carbon source and that of the initial sugar concentration, the favorable initial pH region and the tolerance showed by the yeast to ethanol. The optimal nitrogen source was proved to be a mixture of yeast extract and peptone at a concentration of 10 g/L and a ratio of 1:1. *T. fermentans* presented a really good adaptability at environments slightly acidic to slightly alkaline, with the optimum pH for ethanol production being 6.0. Furthermore, it was determined that at initial glucose concentrations in the region of 25 – 100 g/L the yeast was able to perform well, achieving yields of up to 0.461 g/g, whereas substrate inhibition was displayed at initial concentrations of 200 g/L and above. When tested on substrates other than glucose, *T. fermentans* was able to satisfactorily utilize only fructose achieving a yield of 0.402 g/g and not lactose, xylose or arabinose, a phenomenon attributed to the aeration conditions, since it has been shown by other investigators that the yeast has the ability to assimilate pentozes in fully oxygenated environments. When tested under ethanol stress, the microorganism was able to successfully ferment sugars for initial concentration of ethanol up to 3% w/v, whereas at 7% w/v its metabolic activity seems to completely stop displaying no ethanol production at all.

In the second part of this thesis work, the yeast was tested on synthetic media, namely on High Hemicellulose Pretreated Wheat Straw of 23% Dry Matter (HHPWS 23% DM). The HHPWS was liquefied with the addition of a mixture of thermoenzymes in an enzymatic liquefaction reactor and fermented for 5 days. This resulted in a final concentration of 21.63 g/kg of ethanol produced and a yield of 29% calculated on the total sugars hydrolyzed. To further enhance the ethanol production and the yield achieved, *Fusarium oxysporum* cells were added to the culture, a microorganism with the ability of hydrolyzing cellulose and hemicellulose, resulting in the development of a Simultaneous Saccharification and Co-Fermentation system (SSCF). The final concentration of ethanol was improved by 33.5% percent reaching a final concentration of 28.87 g/kg of ethanol on the fifth day, but evaluating the system on the total amount of sugars contained in the media the total yield was a mere 17.2%.

ΘΕΩΡΗΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ

1 ΕΙΣΑΓΩΓΗ

Η ενέργεια είναι το νόμισμα της τεχνολογίας. Χωρίς αυτή, όλος ο κοινωνικός ιστός όπως τον ξέρουμε θα κατέρρεε. Τα σύγχρονα κράτη έχουν αντιληφθεί την κρίσιμη σημασία του τομέα της ενέργειας, καθώς αυτή παίζει ένα πολύ σημαντικό ρόλο στην κοινωνική και οικονομική ανάπτυξη της κάθε χώρας. Η λύση μέχρι τώρα ήταν η εκμετάλλευση όσο το δυνατόν περισσότερων ορυκτών πόρων και κοιτασμάτων. Τα τελευταία χρόνια όμως παραδοσιακά ορυκτά καύσιμα, όπως οι υδρογονάνθρακες, το κάρβουνο και το φυσικό αέριο, έχουν αρχίσει να εξαντλούνται λόγω της αυξανόμενης ενεργειακής ζήτησης (1). Πρόσφατη μελέτη που έγινε από το Παγκόσμιο Συμβούλιο Ενέργειας βρήκε ότι χωρίς καμία αλλαγή στις τρέχουσες πρακτικές η παγκόσμια ενεργειακή ζήτηση το 2020 θα είναι περίπου 50-80% υψηλότερη από τα επίδεδα της δεκαετίας του 1990 (1). Με αυτούς τους ρυθμούς αύξησης της ενεργειακής κατανάλωσης είναι σίγουρο τα διαθέσιμα αποθέμα πετρελαίου και φυσικού αερίου θα εξαντληθούν μέσα στις επόμενες δεκαετίες (3).

Αυτή η αυξανόμενη χρήση ορυκτών καυσίμων όμως, έχει εγείρει και περιβαλλοντικές ανησυχίες. Η συνεχόμενη χρήση ορυκτών καυσίμων ενισχύει το φυσικό φαινόμενο του θερμοκηπίου αυξάνοντας τις συγκεντρώσεις των αερίων του θερμοκηπίου στην ατμόσφαιρα και οδηγεί στην υπερθέρμανση του πλανήτη με απρόβλεπτες συνέπειες για τον άνθρωπο και το περιβάλλον (3). Επίσης, σύμφωνα με έκθεση της Παγκόσμιας Τράπεζας η καύση ορυκτών καυσίμων απελευθερώνει στην ατμόσφαιρα τοξικές ουσίες, οι οποίες ευθύνονται για έμμεσα ή άμεσα για πάνω απο 700.000 θανάτους κάθε χρόνο.

Για τους λόγους αυτούς πολλά κράτη έχουν στραφεί στην χρήση εναλλακτικών μορφών ενέργειας. Ως εναλλακτικές μορφές ενέργειας θεωρούνται οι ανανεώσιμες πηγές ενέργειας και η πυρηνική ενέργεια (2). Οι ανανεώσιμες μορφές ενέργειας είναι μορφές εκμεταλλεύσιμης ενέργειας που προέρχοναι από διάφορες φυσικές διαδικασίες, όπως ο άνεμος, η γεωθερμία, η κυκλοφορία του νερού και άλλες (2). Σύμφωνα με την οδηγία 2009/28/ΕΚ του Ευρωπαϊκού Κοινοβουλίου, ως ενέργεια από ανενεώσιμες μη ορυκτές πηγές θεωρείται η αιολική, ηλιακή, υδροθερμική, υδροηλεκτρική, από βιομάζα, η παραγώμενη από τα εκλυόμενα στους χώρους υγειονομικής ταφής αέρια, από αέρια μονάδων επεξεργασίας λυμάτων και από βιοαέρια (2).

Πυρηνική ενέργεια ονομάζεται η ενέργεια που απελευθερώνεται όταν μετασχηματίζονται ατομικοί πυρήνες (2).

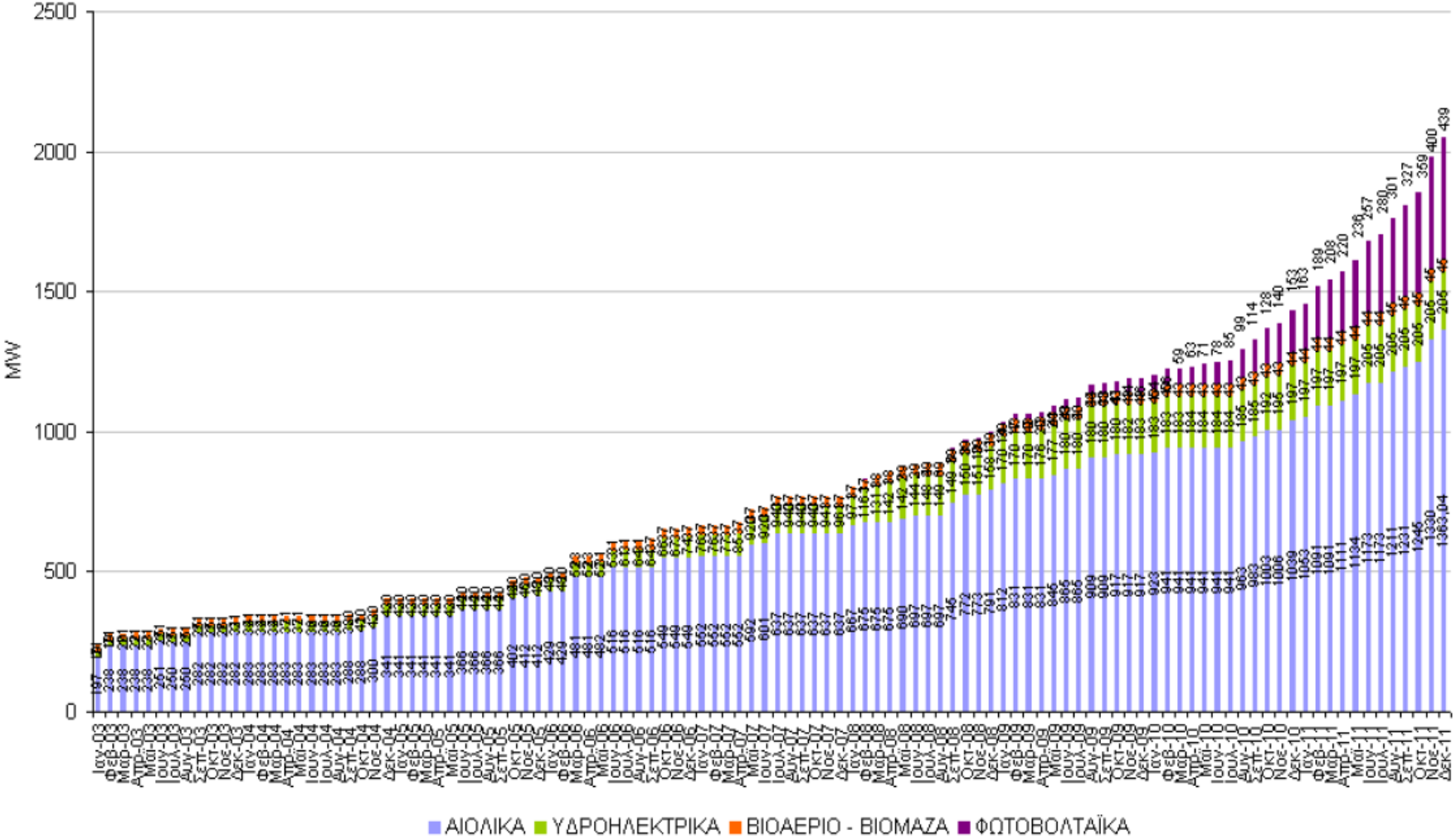
Η Ευρωπαϊκή Ένωση, ακολουθώντας τη διεθνή τάση, προωθεί πολιτικές για στροφή στη χρήση εναλλακτικών μορφών ενέργειας. Σε αυτό το πλαίσιο, το Μάρτιο του 2007 οι Ευρωπαίοι ηγέτες συμφώνησαν στην μελλοντική μείωση των αερίων του θερμοκηπίου κατά 20% και στην αύξηση του μεριδίου της ενέργειας από ανανεώσιμες πηγές στη συνολική κατανάλωση ενέργειας στο 20% μέχρι το 2020 (4). Συγκεκριμένα, βάσει της οδηγίας 2009/28/ΕΚ κάθε κράτος μέλος της Ευρωπαϊκής Ένωσης καλείται να αυξήσει το μερίδιο συμμετοχής ανανεώσιμων μορφών ενέργειας στην παραγωγή ηλεκτρικής ενέργειας, με τα ποσοστά συμμετοχής να κυμαίνονται από 10% έως 49% (5).

Στην Ελλάδα, η χρήση εναλλακτικών πηγών ενέργειας αρχικά υπήρξε αργή. Από το 1950 έως το 1994 ο μοναδικός παραγωγός και πάροχος ενέργειας ήταν η ΔΕΗ. Από το 1994 και συγκεκριμένα με το Νόμο 2244/1994 η αγορά της ηλεκτρικής ενέργειας άνοιξε για πρώτη φορά, επιτρέποντας τόσο σε δημόσιους όσο και σε ιδιωτικούς φορείς να επενδύσουν σε σχέδια για την παραγωγή ενέργειας από ανανεώσιμες πηγές. Το αποτέλεσμα ήταν η δημιουργία των πρώτων ιδιωτικών αιολικών πάρκων στην Ελλάδα. Η ολοένα αυξανόμενη διείσδυση των ανανεώσιμων πηγών ενέργειας στην αγορά φαίνεται από δεδομένα του ΑΔΜΗΕ (πρώην ΔΕΣΜΗΕ) βάσει των οποίων η συνολική εγκατεστημένη δυναμικότητα ανανεώσιμων πηγών ενέργειας το 2003 ήταν 237 MW ενώ το Δεκέμβριο του 2011 ανερχόταν σε 2053 MW (6).

Παρόλες τις νομοθετικές πρωτοβουλίες που έχουν αναλάβει η Ε.Ε. και το Ελληνικό Κράτος, η χρήση βιομάζας και υγρών βιοκαυσίμων δεν είναι ιδιαίτερα διαδεδομένη στην Ελλάδα. Ο λόγος που συμβαίνει αυτό είναι ότι πρέπει πρώτα να αναπτυχθούν οι κατάλληλες τεχνικές και πρακτικές φύτευσης και συγκομιδής ενεργειακών καλλιεργειών καθώς και κατάλληλα σχήματα διανομής προκειμένου η όλη διαδικασία να χαρακτηρίζεται ενεργειακά βιώσιμη (7). Αυτή τη στιγμή, το μοναδικό βιοκαύσιμο κίνησης που διατίθεται στην ελληνική αγορά είναι το βιοντίζελ. Το πρότυπο EN15376 για τα “Καύσιμα Κίνησης – αιθανόλη βιολογικής προέλευσης (βιοαιθανόλη) ως συστατικό ανάμειξης στη βενζίνη – Απαιτήσεις και Μεθοδολογία Ελέγχου” δεν έχει εφαρμοστεί ακόμα στην Ελλάδα, με αποτέλεσμα να μην

έχουν εγκατασταθεί ακόμα μονάδες παραγωγής βιοαιθανόλης (7). Αυτό συμβαίνει διότι η βιοαιθανόλη εμφανίζει πρακτικές δυσκολίες στην ανάμειξη της με τη βενζίνη, κυρίως ο διαχωρισμός του νερού που συμβαίνει σε χαμηλές θερμοκρασίες και σε συνθήκες υψηλής τάσης ατμών. Στον αντίποδα, κάτι τέτοιο δε συμβαίνει με το βιοντίζελ, το οποίο και εν τέλει προτιμάται. (13) Για το λόγο αυτό, η βιοαιθανόλη μετατρέπεται σε αντικροτικό πρόσθετο (αιθυλο-τριτοταγής-βουτυλαιθέρας, ETBE) και μετά αναμιγνύεται με τη βενζίνη.

2003 – 2011 ΕΓΚΑΤΕΣΤΗΜΕΝΗ ΙΣΧΥΣ (MW) ΜΟΝΑΔΩΝ ΑΠΕ ΣΕ ΛΕΙΤΟΥΡΓΙΑ ΣΤΟ ΔΙΑΣΥΝΔΕΔΕΜΕΝΟ ΣΥΣΤΗΜΑ (Άρθρο 9 Ν.3468/2006)



2 ΒΙΟΚΑΥΣΙΜΑ

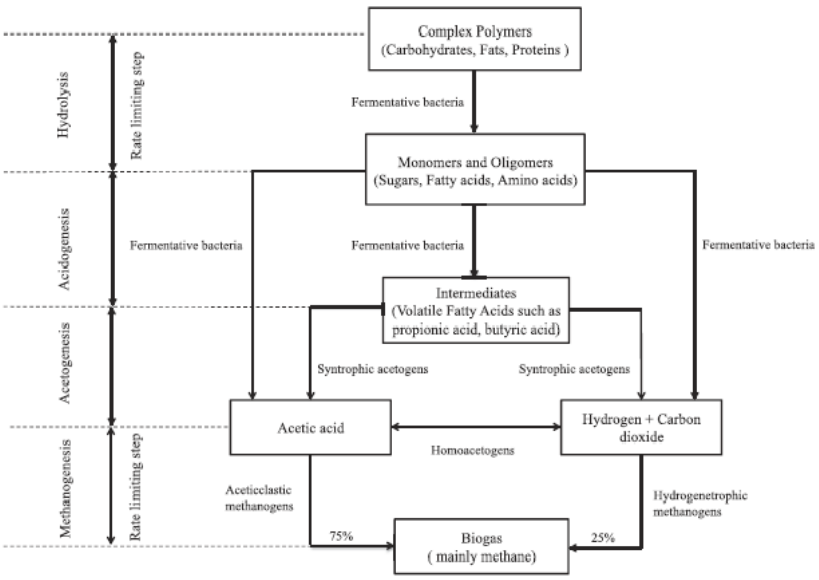
Τα βιοκαύσιμα είναι καύσιμα σε υγρή ή αέρια μορφή. των οποίων η πρώτη ύλη που ονομάζεται βιομάζα περιλαμβάνει οποιοδήποτε υλικό προέρχεται από ζωντανούς οργανισμούς (8). Μπορούν να χρησιμοποιηθούν απευθείας σε ειδικά διαμορφωμένες μηχανές εσωτερικής καύσης (ΜΕΚ) ή να αναμιχθούν με άλλα καύσιμα σε τέτοιο ποσοστό, ώστε να μην επηρεάζουν την καλή λειτουργία του κινητήρα. Η μεγαλύτερη διαφορά μεταξύ των βιοκαυσίμων και των ορυκτών καυσίμων είναι το περιεχόμενο οξυγόνο, ιδιότητα που προσφέρει καλή αντικροτική ικανότητα (9). Επίσης, τα βιοκαύσιμα είναι διαθέσιμα τοπικά, προσβάσιμα και συμβάλλουν στην αειφόρο ανάπτυξη, μειώνοντας τις εκπομπές αερίων του θερμοκηπίου και άλλων τοξικών ουσιών (12). Τα κυριότερα βιοκαύσιμα είναι: η βιοαιθανόλη, η βιομεθανόλη, το βιοντίζελ, το βιοαέριο και το βιοϋδρογόνο.

Η μεθανόλη είναι μία από τις πιο σημαντικές ουσίες που χρησιμοποιούνται στη βιομηχανία σήμερα. Μπορεί να χρησιμοποιηθεί απευθείας ως καύσιμο ή ως πρόσθετο στη βενζίνη. Παράγεται συνθετικά, από την καταλυτική αντίδραση του μονοξειδίου και του διοξειδίου του άνθρακα με το υδρογόνο. Η βιομεθανόλη παράγεται είτε από φυσικό αέριο είτε από βιολογικό syngas. Το βιολογικό syngas προκύπτει από αεριοποίηση και μερική οξείδωση με O_2 και H_2O της βιομάζας. Στη συνέχεια παράγεται μεθανόλη με καταλυτική σύνθεση σε υψηλή πίεση. Τη δεδομένη στιγμή δεν υπάρχουν μέθοδοι παραγωγής που να είναι οικονομικά βιώσιμοι και ταυτόχρονα φιλικοί προς το περιβάλλον. Αυτό συμβαίνει γιατί η παραγωγή βιομεθανόλης από βιομάζα είναι μία πολύ δαπανηρή βιομηχανική διαδικασία. Παρόλα αυτά, η ανάκτηση της μεθανόλης είναι πιο εύκολη από αυτή της αιθανόλης, καθώς δε σχηματίζει αζεότροπο μίγμα με το νερό (12). Ένα βιοκαύσιμο που προκύπτει από την βιομεθανόλη είναι το βιο-MTBE. Το βιο-MTBE είναι ο μεθυλο-τριτοταγής-βουτιλαιθέρας που παράγεται από τη βιομεθανόλη με καταλυτική αντίδραση με ισοβουτυλένιο. Χρησιμοποιείται παγκοσμίως ως οξυγονούχο πρόσθετο στη βενζίνη για την αύξηση του αριθμού οκτανίων. Η

χρήση του στις ΗΠΑ είναι αμφιλεγόμενη, καθώς έχει βρεθεί σε μεγάλες ποσότητες σε υπόγεια ύδατα (9).

Το βιοαέριο είναι ένα μίγμα διαφορετικών αερίων που παράγονται από τη διάσπαση οργανικής ύλης απουσία οξυγόνου, από τα οποία το μεθάνιο, το υδρογόνο και το μονοξείδιο του άνθρακα μπορούν καούν ή να οξειδωθούν. Η επακόλουθη της καύσης ή της οξείδωσης ενέργεια που παράγεται επιτρέπει στο βιοαέριο να χρησιμοποιηθεί ως βιοκαύσιμο για την παραγωγή θερμότητας, ηλεκτρισμού ή ακόμα και ως καύσιμο κίνησης αυτοκινήτων. Το οργανικό κλάσμα οποιασδήποτε μορφής βιομάζας, όπως για παράδειγμα η λυματολάσπη, τα ζωϊκά και βιομηχανικά απόβλητα, μπορεί να χρησιμοποιηθεί ως πρώτη ύλη για την παραγωγή βιοαερίου (15). Η αναερόβια χώνευση οργανικής ύλης για την παραγωγή βιοαερίου περιλαμβάνει τέσσερα στάδια:

1. Υδρόλυση της οργανικής ύλης
2. Οξυγένεση. Τα προϊόντα της υδρόλυσης μετατρέπονται από οξεογενή βακτήρια σε μεθανογενή υποστρώματα, όπως π.χ. οξικό οξύ, υδρογόνο και διοξείδιο του άνθρακα
3. Ακετογένεση. Τα προϊόντα της οξυγένεσης που δεν μπορούν να μετατραπούν σε άμεσα μεθάνιο μετατρέπονται σε μεθανογενή υποστρώματα απο ακετογενή βακτήρια. Τα στάδια της οξυγένεσης και της ακετογένεσης λαμβάνουν χώρα παράλληλα
4. Μεθανογένεση. Παραγωγή μεθανίου. Το πιο κρίσιμο στάδιο της διεργασίας καθώς είναι η πιο αργή βιοχημική και επομένως ρυθμορυθμιστική αντίδραση της διεργασίας (15)



Σχήμα 1 Διαδικασία παραγωγής βιοαερίου (15)

Το υδρογόνο είναι μία πρώτη ύλη που βρίσκεται σε πολύ μεγάλη ζήτηση, κύριως από την πετρελαιοβιομηχανία. Χρησιμοποείται όμως προς το παρόν μόνο σε διεργασίες επεξεργασίας, όπως π.χ. η αεριοποίηση του άνθρακα. Μπορεί παρόλα αυτά να χρησιμοποιηθεί για την παραγωγή θερμότητας μέσω καύσης ή για την παραγωγή ηλεκτρισμού από κυψέλες καυσίμου. Οι τελευταίες είναι ιδιαίτερα αποδοτικές ενεργειακά, καθώς έχουν μία από της τάξεως του 70%, σε σύγκριση με τη μέγιστη απόδοση μίας μηχανής εσωτερικής καύσης που είναι στο 45%, και παράγουν μόνο καθαρό νερό και καθόλου ρύπους. Το πρόβλημα όμως με τις κυψέλες καυσίμου εντοπίζεται στο γεγονός ότι απέχουμε προς το παρόν πολύ από τη αποτελεσματική από άποψη κόστους μαζική παραγωγή υδρογόνου. Για παράδειγμα, σύμφωνα με μελέτη του Αμερικανικού Υπουργείου Ενέργειας, για να καταστεί το χημικά ή το βιολογικά παραγμένο υδρογόνο οικονομικά βιώσιμο, θα πρέπει να έχει τιμή πώλησης τα 2,60$/kg. Για να συμβεί αυτό, θα πρέπει η απόδοση φως/υδρογόνο να φτάσει το 10% τη ενώ με τις υπάρχουσες μεθόδους κυμαίνεται μόλις στο 1%. (16)

Εκτιμάται πάντως ότι ευρεία χρήση του υδρογόνου ως πηγή ενέργειας θα μπορούσε να βοηθήσει σημαντικά στην καταπολέμηση της κλιματικής αλλαγής και στη βελτίωση της ποιότητας του αέρα στην ατμόσφαιρα. Για το λόγο αυτό, έχει αρχίσει να υπάρχει έντονο

ενδιαφέρον για τεχνολογίες και μεθόδους παραγωγής υδρογόνου από βιολογικές πρώτες ύλες και βιομάζα, δηλαδή βιοϋδρογόνου. Μέθοδοι παραγωγής του βιοϋδρογόνου είναι:

- Η φωτόλυση του νερού με τη χρήση μικροφυκών και κυανοβακτηρίων
- Η ζύμωση οργανικών ενώσεων παρουσία ή απουσία φωτός
- Η αποσύνθεση οργανικής ύλης με τη χρήση φωτοσυνθετικών βακτηρίων

Πρέπει να σημειωθεί ότι οι βιολογικές διαδικασίες παραγωγής υδρογόνου είναι πιο φιλικές προς το περιβάλλον και λιγότερο ενεργοβόρες από τις αντίστοιχες θερμοδυναμικές και ηλεκτροχημικές.

3 ΒΙΟΝΤΙΖΕΛ

Το βιοντίζελ είναι το οξυγονωμένο βιοκαύσιμο με βάση μονο-αλκυλικούς εστέρες που προκύπτει από την επεξεργασία φυτικών ελαίων ή ζωϊκών λιπών. Αποτελεί καύσιμο συγκρίσιμης ποιότητας με το συμβατικό ντίζελ και χρησιμοποιείται είτε ως υποκατάστατό του είτε σε μίγματα με αυτό. Μετεστεροποίηση φυτικών ελαίων πραγματοποιήθηκε πρώτη φορά από τον Patrick Duffy το 1853 τέσσσερις δεκαετίες πριν τη λειτουργία της πρώτης μηχανής diesel. Μάλιστα το πρώτο μοντέλο του Rudolf Diesel λειτούργησε στις 10 Αυγούστου 1893 με φυστικέλαιο (13). Τα τελευταία χρόνια έχει αναπτυχθεί έντονο ενδιαφέρον για την παραγωγή και χρήση του βιοντίζελ ως εναλλακτικό καύσιμο κίνησης. Συγκεκριμένα, οι λόγοι που ωθούν όλο και περισσότερα κράτη στη χρήση και παραγωγή βιοντίζελ είναι δύο:

- Η ενεργειακή κρίση. Σύμφωνα με τις περισσότερες προβλέψεις η παγκόσμια παραγωγή πετρελαίου θα φτάσει στο ζενίθ της την περίοδο 1996-2030, ενώ μέχρι το 2035 θα έχει μειωθεί κατά 30% (13). Αντίθετα, την ίδια περίοδο λόγω της ταχείας εξάπλωσης αναπτυσσόμενων οικονομιών, όπως η Κίνα, η παγκόσμια ζήτηση προβλέπεται να αυξηθεί ραγδαία

- Το βιοντίζελ μπορεί να παραχθεί από σχετικά φθηνά υλικά, όπως παραπροϊόντα της αγροτικής παραγωγής (π.χ. υπολείμματα επεξεργασίας της ελιάς) και ζωϊκά λίπη, τα οποία ταυτόχρονα μπορούν να συμβάλουν και στη μείωση της εκπομπής αερίων του θερμοκηπίου

Το βιοντίζελ έχει προσελκύσει το ενδιαφέρον ως εναλλακτικό του συμβατικού ντίζελ κάυσιμο για αρκετούς λόγους.

- Είναι βιοαποικοδομήσιμο, μη τοξικό και είναι ανανεώσιμος πόρος
- Η καύση του δεν παράγει θειώδη
- Παράγει λιγότερο μονοξείδιο του άνθρακα, αιωρούμενα σωματίδια, καπνό και άκαυστους υδρογονάνθρακες
- Λόγω του περισσότερου ελεύθερου οξυγόνου που περιέχει κάνει τέλεια καύση με αποτέλεσμα να υπάρχουν μειωμένες εκπομπές (13)

Οι πρώτες ύλες για την παραγωγή βιοντίζελ χωρίζονται σε πέντε κατηγορίες: τα εδώδιμα ελαιούχα φυτά, όπως για παράδειγμα η σόγια και η ελαιοκράμβη, τα μη εδώδιμα ελαιούχα φυτά, τα χρησιμοποιημένα έλαια, όπως για παράδειγμα μαγειρικά απόβλητα, τα ζωϊκά λίπη και τα έλαια από μικροβιακή παραγωγή. Στην Ελλάδα παραδοσιακά καλλιεργούνται για τους καρπούς τους τέσσερα είδη ελαιούχων φυτών: Ο ηλίανθος, οι αραχίδες, η σόγια και το σουσάμι. Τελευταία έχει εισαχθεί και η ελαιόκραμβη, μία χειμερινή καλλιέργεια που έχει ωστόσο δείξει να προσαρμόζεται καλά στο κλίμα της Ελλάδας (7) (14). Οι φυσικές και οι χημικές ιδιότητες του βιοντίζελ εξαρτώνται ουσιαστικά από την κατανομή των λιπαρών οξέων των τριγλυκεριδίων που περιέχει, συνεπώς εξαρτώνται σε μεγάλο βαθμό και από την πρώτη ύλη παραγωγής του.

Το βιοντίζελ πρώτης γενιάς παράγεται κυρίως από εδώδιμα έλαια. Σύμφωνα με έρευνες η απόκτηση των πρώτων υλών αποτελεί το 75% των εξόδων παραγωγής βιοντίζελ και αυτό αποτελεί σοβαρή απειλή για την οικονομική βιωσιμότητα της βιομηχανίας. Συνεπώς, το τελικό κόστος του βιοντίζελ εξαρτάται κυρίως από την πρώτη ύλη. Με τις τιμές των φυτικών

ελαίων στα ύψη τα τελευταία χρόνια το κόστος παραγωγής του βιοντίζελ θα συνεχίσει να αυξάνεται και έτσι αυτό θα χάσει όποιο ανταγωνιστικό πλεονέκτημα έχει λόγω της υψηλής τιμής του (12).

Βιοντίζελ από φυτικά έλαια και ζωϊκά λίπη είναι κατάλληλο για χρήση ως καύσιμο κίνησης, σε τροποποιημένους όμως κινητήρες λόγω τους υψηλούς ιξώδους που έχει σε σχέση με το ορυκτό ντίζελ (12). Για τη χρήση σε συμβατικούς κινητήρες, εφαρμόζονται τέσσερις μέθοδοι επεξεργασίας προκειμένου να μειωθεί το ιξώδες σε επιθυμητές τιμές. Αυτές είναι η ανάμιξη με καύσιμο ντίζελ, ο σχηματισμός μικρογαλακτωμάτων, η πυρόλυση και μετεστεροποίηση. ΄Για την ανάμιξη συγκεκριμένα, μίγματα 20% βιοντίζελ και 80% ορυκτό ντίζελ (B20) μπορούν να χρησιμοποιηθούν σε μη τροποποιημένους κινητήρες, ενώ το βιοντίζελ σε καθαρή μορφή (B100) μπορεί και αυτό να χρησιμοποιηθεί ως καύσιμο κίνησης εφαρμόζοντας όμως συγκριμένες τροποποιήσεις για να αποφευχθούν προβλήματα συντήρησης και απόδοσης.

Πίνακας 1. Αποδόσεις σε βιοντίζελ από γεωργικές καλλιέργειες στην Ελλάδα.(14)

Καλλιέργεια	Απόδοση καλλιέργειας σε καρπούς (kg/ha)	Μέσο περιεκτικότητα σε έλαιο (%)	Απόδοση σε βιοκαύσιμο (kg/ha)
Ηλίανθος	1200-3000	42	504-1260
Ελαιόκραμβη	1200-2500	42	504-1050
Βαμβακόσπορος	1200-1600	16	170-230
Σπόροι καπνού	617	38	267

Το 2003 η παγκόσμια παραγωγή ανήλθε σε 1,8 δισεκατομμύρια λίτρα, μία τεράστια αύξηση σε σύγκριση με της αρχές του 1990 όπου η παραγωγή ήταν σχεδόν μηδενική. Η μεγαλύτερη παραγωγός χώρα αυτή τη στιγμή είναι η Γερμανία, ενώ χώρες όπως η ΗΠΑ, η Γαλλία και η Ιταλία έχουν εξίσου σημαντική παραγωγή. Στην Ελλάδα ενδεικτικά, από στοιχεία που έχουν εκδόσει από κοινού τα Υπουργεία Οικονομικών, Περιβάλλοντος, Ενέργειας και Κλιματικής Αλλαγής και το Υπουργείο Αγροτικής Ανάπτυξης το 2009 182.000 m^3 παρήχθησαν και αναμείχθηκαν με συμβατικό ντίζελ, ποσότητα που έβαινε μείωμενη για τα επόμενα χρόνια έως το 2012 όποτε η ετήσια αντίστοιχη παραγωγή ήταν 150.000 m^3 . Μέχρι σήμερα λειτουγούν

στην Ελλάδα δεκατρείς μονάδες παραγωγής βιοντίζελ που καλύπτουν το 86,7% των αναγκών της χώρας, ενώ δεκά ακόμα εταιρίες εισάγουν βιοντίζελ B100, 100% βιοντίζελ, κυρίως από την Ιταλία, την Αυστρία και το Βέλγιο (14).

4 ΒΙΟΑΙΘΑΝΟΛΗ

4.1 Γενικά

Η βιοαιθανόλη είναι η αιθανόλη που παράγεται από υδρόλυση και στη συνέχεια ζύμωση της βιομάζας (8). Είναι το πρώτο καύσιμο που χρησιμοποιήθηκε σε ΜΕΚ αντί των συμβατικών ορυκτών καυσίμων από τον Nikolas Otto το 1876. Έκτοτε, η αιθανόλη χρησιμόποιεται ως καύσιμο κίνησης από τα πρώτα κιόλας αυτοκίνητα που παρήχθησαν, όπως για παράδειγμα το περίφημο Ford Model-T, το πρώτο αυτοκίνητο μαζικής παραγωγής. Το ενδιαφέρον για την αιθανόλη ως καύσιμο, ελαττώθηκε κατά το πρώτο μισό του 20^{ου} αιώνα. Λόγω του χαμηλού κόστους παραγωγής της, κίνησε όμως και πάλι το ενδιαφέρον τη δεκαετία του 1970, όταν εκδηλώθηκε η παγκόσμια πετρελαϊκή κρίση, η οποία συνδιάστηκε με προβλήματα διάθεσης στην αγορά της ζάχαρης λόγω υπερπαραγωγής. Τότε δημιουργήθηκε στη Βραζιλία το πρωτοποριακό για την εποχή *"Εθνικό Πρόγραμμα Αλκοόλης"* (9). Το πρόγραμμα βασίστηκε στη χρήση ζαχαρόοκάλαμου ως πρώτη ύλη για την παραγωγή βιοαιθανόλης και στόχευε στην ευρεία χρήση της αιθανόλης ως υποκατάστατο της βενζίνης. Το αποτέλεσμα ήταν μερικά χρόνια μετά τα περισσότερα αυτοκίνητα που πωλούνταν να χρησιμοποιούν ένυδρη βιοαιθανόλη ως καύσιμο κίνησης. Σήμερα είναι το πιο ευρέως διαδεδομένο μη ορυκτό καύσιμο στον κόσμο. Η παγκόσμια παραγωγή της το 2000 ανήλθε σε 20 δισεκατομμύρια λίτρα και διπλασιάστηκε μέσα σε πέντε μόλις χρόνια, με την παγκόσμια παραγωγή το 2005 να ανέρχεται σε πάνω από 40 δισεκατομμύρια λίτρα (9). Οι δύο μεγαλύτερες παραγωγοί χώρες είναι οι Η.Π.Α και η Βραζιλία.

Πίνακας 2 Κατάταξη των δεκαπέντε πρώτων χωρών σε παραγωγή υγρών βιοκαυσίμων το έτος 2011 (Πηγή: Renewables Global Status Report 2009 update)

Α/Α	Χώρα	Υγρή Βιοαιθανόλη (δισεκατομμύρια λίτρα)	Βιοντίζελ (δισεκατομμύρια λίτρα)
1	ΗΠΑ	54.2	3.2
2	Βραζιλία	3.2	2.7
3	Γερμανία	0.8	3.2
4	Αργεντινή	0.2	2.8
5	Γαλλία	1.1	1.6
6	Κίνα	2.1	0.2
7	Καναδάς	1.8	0.2
8	Ινδονησία	0.0	1.4
9	Ισπανία	0.5	0.7
10	Ταϊλάνδη	0.5	0.6
11	Βέλγιο	0.4	0.4
12	Ολλανδία	0.3	0.4
13	Ίταλια	0.0	0.6
14	Κολομβία	0.3	0.3
15	Αυστρία	0.2	0.4

Η βιοαιθανόλη είναι ένα οξυγονωμένο καύσιμο που περιέχει 35% οξυγόνο, πράγμα που μειώνει τις εκπομπές οξειδείων του αζώτου και σωματιδίων κατά την καύση της. Έχει μεγαλύτερο αριθμό οκτανίων, μεγαλύτερα όρια ανάφλεξης, καλύτερους ρυθμούς καύσης και μεγαλύτερη τάση ατμών από τη βενζίνη. Οι ιδιότητες αυτές επιτρέπουν μεγαλύτερο βαθμό συμπίεσης, μικρότερο χρόνο καύσης και πιο ομαλη καύση στον κινητήρα που οδηγούν θεωρητικά τουλάχιστον σε καλύτερη αποδοτικότητα σε μία ΜΕΚ (10). Επίσης, λόγω του ότι είναι ένα οξυγονωμένο καύσιμο, έχει και πολύ καλές αντικροτικές ιδιότητες. Παρόλα αυτά, συνήθως δε χρησιμοποιείται απευθείας ως καύσιμο λόγω της δαπανηρής διαδικασίας που απαιτείται για την αφαίρεση της περιεχόμενης υγρασίας (περίπου 5%), καθώς αιθανόλη και νερό σχηματίζουν αζεότροπο μίγμα (8). Συνήθως αναμιγνύεται σε κάποιο ποσοστό με συμβατική βενζίνη και στη συνέχεια χρησιμοποιείται ως καύσιμο. Το πιο διαδεδομένο τέτοιο καύσιμο, το οποίο μπορεί να χρησιμοποιηθεί σε οποιοδήποτε συμβατικό βενζινοκινητήρα, είναι αυτό όπου η βιοαιθανόλη προστίθεται σε ποσοστό 10% κατ' όγκο και ονομάζεται Ε10. Ένα αρκετά διαδεδομένο μίγμα που χρησιμοποιείται στις ΗΠΑ είναι το Ε85, όπου η

βιοαιθανόλη προστίθεται σε ποσοστό 85%, το οποίο όμως μπορεί να χρησιμοποιηθεί μόνο σε κατάλληλα τροποποιημένους κινητήρες. Τα τελευταία χρόνια η ομοσπονδιακή κυβέρνηση δίνει κίνητρα σε κατασκευαστές για την παραγωγή τροποποιημένων βενζινοκινητήρων που να μπορούν να λειτουργήσουν με μίγματα βιοαιθανόλης και βενζίνης σε αναλογίες που κυμαίνονται από καθαρή βενζίνη έως και το Ε85 (11). Βάσει του προτύπου ποιότητας EN 228 της Ε.Ε. στην Ευρώπη χρησιμοποιείται ένα μίγμα με 5% βιοαιθανόλη. Άλλες χώρες έχουν εφαρμόσει τα δικά τους προγράμματα βιοακαυσίμων, όπως για παράδειγμα ο Καναδάς (Ε10 και Ε85), η Σουηδία (Ε5 και Ε85), η Ινδία (Ε5), η Αυστραλία (Ε10), Κολομβία (Ε10) κ.α (17). Μία τελευταία χρήση της βιοαιθανόλης είναι στην παραγωγή βιο-ΕΤΒΕ. Το βιο-ΕΤΒΕ είναι ο αιθυλο-τριτοταγής-βουτιλαιθέρας που παράγεται από βιοαιθανόλη. Παράγεται με καταλυτική αντίδραση μεταξύ βοαιθανόλης και ισοβουτυλενίου. Χρησιμοποιείται ως οξυγονούχο πρόσθετο στη βενζίνη, και είναι πιο σταθερό από τη βιοαιθανόλη, παράγοντας που βοηθάει στην αποθήκευσή του και προσφέρει καλύτερες αντικροτικές ιδιότητες κατά την καύση της βενζίνης σε μία ΜΕΚ.

Πίνακας 3. Ιδιότητες υγρών καυσίμων , Πηγή (18)

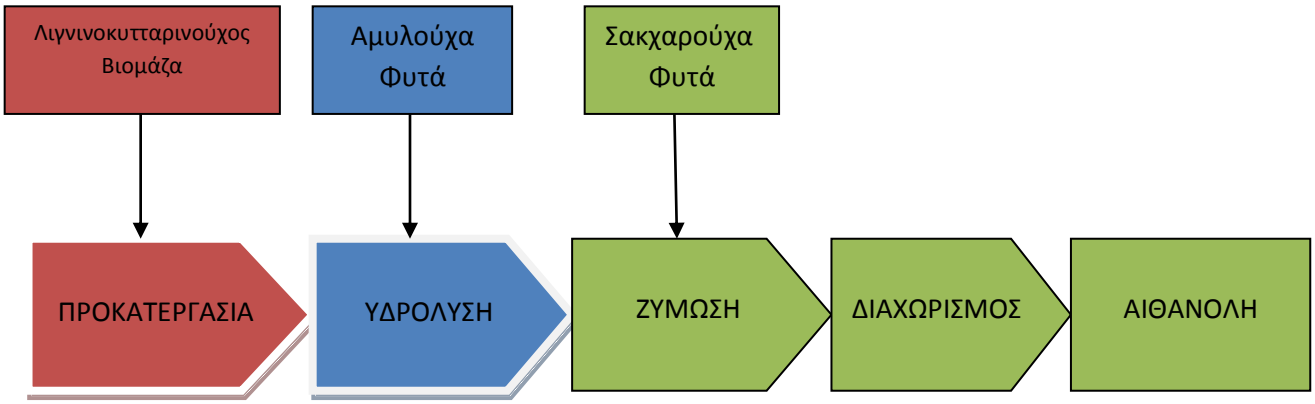
Ιδιότητα καυσίμου	Ισοοκτάνιο	Μεθανόλη	Αιθανόλη
Αριθμός Κετανίου	-	5	8
Αριθμός Οκτανίου	100	112	107
Θερμοκρασία Αυτανάφλεξης (K)	530	737	606
Λανθάνουσας Θερμότητα Εξάτμισης (MJ/Kg)	0.26	1.18	0.91
Κατώτερη Θερμογόνος Δύναμη (MJ/Kg)	44.4	19.9	26.7

4.2 Πρώτες ύλες παραγωγής βιοαιθανόλης

Η βιοαιθανόλη παράγεται από τη ζύμωση της ζάχαρης με τη μέθοδο της αλκοολικής ζύμωσης. Είναι ένα άχρωμο, διαυγές υγρό, υψηλής ενεργειακής περιεκτικότητας και καθαρότερο περιβαλλοντικά από τη βενζίνη (18). Τα υποστρώματα που χρησιμοποιούνται για την παραγωγή της είναι είτε σακχαρούχα (σακχαρότευτλα, γλυκό σόργο κ.α.), είτε αμυλούχα (αραβόσιτος, κρίθη κ.α.), είτε λιγνινοκυτταρινούχα (ξυλώδης βιομάζα, άχυρα κ.α.). Η παραγωγή της χωρίζεται συνήθως σε τρια στάδια:

1) Δημιουργία διαλύμματος σακχάρων που μπορούν να ζυμωθούν
2) Ζύμωση των σακχάρων για την παραγωγή αιθανόλης
3) Διαχωρισμός της αιθανόλης και καθαρισμός (25)

Το στάδιο πριν τη ζύμωση, δηλαδή αυτό της δημιουργίας ζυμώσιμων σακχάρων, είναι η βασική διαφορά ανάμεσα στις διεργασίες παραγωγής βιοαιθανόλης από απλά σάκχαρα, από αμυλούχες πηγές και από λιγνινοκυτταρινούχες πηγές. Όταν η πρώτη ύλη είναι φυτά με σύσταση πλούσια σε σουκρόζη δε χρειάζεται καποια ιδιαίτερη προκατεργασία και υπόκεινται άμεσα σε ζύμωση, μιας και οι ζύμες που χρησιμοποιούνται έχουν τη δυνατότητα από μόνες τους να υδρολύσουν τη σουκρόζη μέσω του ενζύμου ιμβερτάση που παράγουν και στη συνέχεια να ζυμώσουν τη σακχαρόζη και τη φρουκτόζη (8). Στην περίπτωση που η πρώτη ύλη είναι φυτά αμυλούχου σύστασης πριν τη ζύμωση πρόστιθεται ένα ακόμα στάδιο υδρόλυσης με τη χρήση αμυλασών. Τέλος, όταν η πρώτη ύλη είναι βιομάζα λιγνινοκυτταρινούχου σύστασης, απαιτείται και ένα επιπλέον στάδιο ενζυμικής και φυσικοχημικής προκατεργασίας προκατεργασίας



Διάγραμμα 1 Σχηματική απεικόνιση της παραγωγής βιοαιθανόλης ανάλογα με την πρώτη ύλη

3.1.1 Σακχαρούχα και αμυλούχα φυτά

Τα σακχαρούχα φυτά περιέχουν κατά βάση πεντόζες και εξόζες, δηλαδή υδατάνθρακες με πέντε και έξη μόρια άνθρακα αντίστοιχα. Τα κυριότερα σακχαρούχα φυτά που καλλιεργούνται για την παραγωγή βιοαιθανόλης είναι το σακχαροκάλαμο, το σακχαρότευτλο και το γλυκό σόργο.

Το σακχαροκάλαμο είναι ένα αγγειόσπερμο, μονοκότυλο, ποώδες φυτό που ανήκει στην οικογένεια των Αγρωστωδών. Τα δύο τρίτα της παγκόσμιας παραγωγής ζάχαρης προέρχονται από την καλλιέργεια σακχαροκάλαμου. Το 20% του καλαμιού είναι ήδη ζυμώσιμο σάκχαρο και η ζύμωση μπορεί να αρχίσει αμέσως μετά τη συγκομιδή. Ένα στρέμμα σακχαροκάλαμου αποδίδει 600-900 λίτρα αιθανόλη. (8). Η μεγαλύτερη παραγωγός χώρα είναι αυτή τη στιγμή η Βραζιλία με περίπου το 27% της παγκόσμιας παραγωγής, ενώ η μεγαλύτερη απόδοση ανά εκτάριο εμφανίζεται στο Περού με 32 Mg ξηρού σακχαροκάλαμου ανά εκτάριο (10).

Το σακχαρότευτλο είναι ένας διετής τύπος τεύτλου που καλλιεργείται εμπορικά λόγω της υψηλής περιεκτικότητας των ριζών του σε σάκχαρα. Καλλιεργείται ευρέως στην Ευρώπη και αποδίδει αρκετά περισσότερη βιοαιθανόλη ανά στρέμμα από τον αραβόσιτο, ενώ σε σύγκριση με το σακχαρότευτλο η καλλιέργεια του απαιτεί 35-40% λιγότερο νερό και λίπασμα (19). Άλλα πλεονεκτήματα του σακχαρότευτλου είναι ότι έχει χαμηλό κύκλο φυτικής

παραγωγής, υψηλές αποδόσεις και υψηλή προσαρμοστικότητα και ανθεκτικότητα σε ένα ερύ φάσμα κλιματικών συνθηκών (10).

Το γλυκό σόργο είναι ένα μονοετές φυτό με μεγάλη φωτοσυνθετική ικανότητα και υψηλές αποδόσεις σε βιομάζα. Είναι ένα από τα πιο ανθεκτικά σε ξηρασία είδη γεωργικής καλλιέργειας, καθώς έχει τη δυνατότητα καθώς να παραμένει αδρανές ακόμα και στις πιο ξηρές περιόδους. Το γλυκό σόργο είναι ένα από τα πιο υποσχόμενα φυτά από αυτά που καλλιεργούνται για την παραγωγή βιοαιθανόλης, ιδιαίτερα στις αναπτυσσόμενες χώρες τόσο λόγω της ανθεκτικότητας του όσο και λόγω της υψηλής του απόδοσης σε βιοαιθανόλη ανά στρέμμα που είναι περίπου 600 λίτρα βιοαιθανόλης/στρέμμα (8).

Τα σακχαρούχα φυτά απαιτούν μόνο ένα στάδιο άλεσης για την εξαγωγή των σακχάρων που πρόκειται να ζυμωθούν και για αυτό το λόγο η διαδικασία παραγωγής από αυτά θεωρείται μία απλή, οικονομική και τελειοποιημένη διαδικασία. Συγκεριμένα, η αιθανόλη παράγεται απευθείας από τη ζύμωση εκχυλισμάτων σακχάρων των φυτών η από τη ζύμωση της βαγάσσης που προκύπτει ως παραπροϊόν μετά την εξαγωγή των σακχάρων από τα φυτά. Η διαδικασία της ζύμωσης λαμβάνει χώρα σε αντιδραστήρες ημιδιαλείποντος έργου με ανακύκλωση των κυττάρων της ζύμης ή σε συνεχείς αντιδραστήρες σε σειρά με ανακύκλωση των κυττάρων της ζύμης.

Γλυκό Σοργό Σακχαρόκαλαμο Σακχαρότευτλο

Εικόνα 1. Σακχαρούχα φυτά

Εκτός από τα προαναφερόμενα σακχαρούχα φυτά, μία επίσης δημοφιλής πρώτη ύλη για την παραγωγή βιοαιθανόλης είναι και τα φυτά που περιέχουν σε μεγάλο ποσοστό άμυλο, έναν πολυσακχαρίτη που είναι πολυμερές της γλυκόζης όπου τα μόρια της γλυκόζης

συνδέονται μεταξύ τους με γλυκοζιτικό δεσμό. Αμυλούχα φυτά που χρησιμοποιούνται παγκοσμίως για την παραγωγή βιοαιθανόλης είναι ο αραβόσιτος και το σιτάρι. Είναι η πιο ευρέως χρησιμοποιούμενη ύλη σε Η.Π.Α και Ευρώπη για την παραγωγή βιοαιθανόλης

Ο αραβόσιτος είναι ένα ετήσιο, ψηλό φυτό με χοντρό, όρθιο και συμπαγή βλαστό. Αποτελεί μία πολύ προσιτή πρώτη ύλη για την παραγωγή βιοαιθανόλης γιατί το 70% περίπου του φυτού αποτελείται από άμυλο (10). Τη μεγαλύτερη παραγωγή βιοαιθανόλης από αραβόσιτο την έχουν αυτή τη στιγμή οι ΗΠΑ με δυνατότητες που ξεπερνούν 25 δισεκατομμύρια λίτρα ετησίως. (10) Η ποσότητα αυτή αντιστοιχεί στο 90% της συνολικής ετήσιας παραγωγής με το υπόλοιπο να συμπληρώνεται από πηγές όπως σιτάρι, κριθάρι και ορό τυριού (17). Η απόδοση αιθανόλης ανά στρέμμα καλλιέργειας αραβόσιτου είναι σχετικά μέτρια σε σχέση με άλλες πρώτες ύλες, όπως π.χ. το σακχαροκάλαμο, καθώς κυμαίνεται περίπου στα 300 λίτρα/στρέμμα (8).

Το σιτάρι έιναι ένα ετήσιο φυτό που ανήκει στην οικογένεια των δημητριακών. Είναι το πιο ευρέως καλλιεργούμενο δημητριακό στον κόσμο με ετήσια παγκόσμια παραγωγή 600 εκατομμυρίων τόνων (8), Παρόλα αυτά υποσκελίζεται στον τομέα παραγωγής βιοαιθανόλης λόγω της χαμηλότερης σε σύγκριση με τον αραβόσιτο απόδοσης αιθανόλης ανά στρέμμα. Μία χώρα που χρησιμοποιεί σε μεγάλο βαθμό σιτάρι για παραγωγή βιοαιθανόλης είναι η Γαλλία με μία διαδικασία επεξεργασίας παρόμοια με αυτή του αραβόσιτο (19).

Στις διαδικασίες παραγωγής που χρησιμοποιούνται αμυλούχες πρώτες ύλες, πριν την τελική ζύμωση πρέπει να προηγηθεί το στάδιο της σακχαροποίησης. Αυτό είναι απαραίτητο, γιατί οι μικροοργανισμοί που χρησιμοποιούνται δεν έχουν τη δυνατότητα διάσπασης της μακράς πολυμερικής αλυσίδας του αμύλου. Για το λόγο αυτό η πρώτη ύλη ψήνεται πρώτα σε υψηλή θερμοκρασία για να ζελατινοποιηθεί και στη συνέχεια υποβάλεται σε ενζυμική υδρόλυση για να σχηματιστούν μονομερή της γλυκόζης που είναι άμεσα ζυμώσιμα. Τα δύο ένζυμα που χρησιμοποιούνται για τη διάσπαση του αμύλου είναι η α-αμυλάση και η γλυκοαμυλάση (19). Αυτό το στάδιο και κυρίως η χρήση μεγάλων ποσοτήτων ενζύμων είναι που καθιστούν τη διαδικασία λιγότερο αποδοτική οικονομικά σε σχέση με τη ζύμωση σακχαρούχων φυτών.

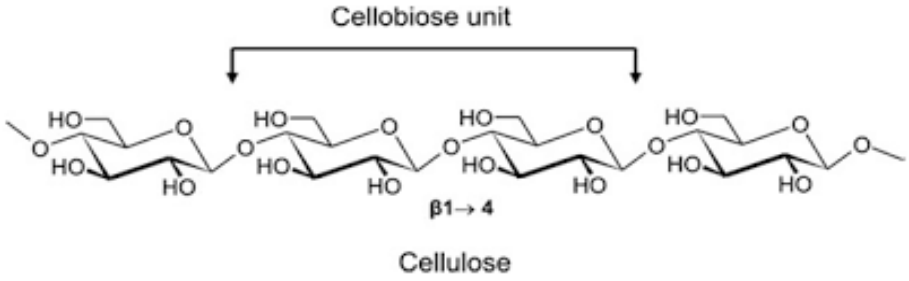
Πίνακας 4. Αποδόσεις αιθανόλης από διαφορετικές πρώτες ύλες. (Πηγή 11)

Πρώτη ύλη	Απόδοση Αιθανόλης (L/ha)
Στελέχη αραβόσιτου	1050-1400
Σιτάρι	2590
Γλυκό Σόργο	3050-4070
Αραβόσιτος	3460-4020
Σακχαρότευτλο	5010-6680
Σακχαροκάλαμο	6190-7500

4.2.1 Λιγνινοκυτταρινούχος βιομάζα

Η λιγνινοκυτταρίνη είναι ένας γενικός όρος με τον οποίο περιγράφονται σαν σύνολο τα συστατικά του κυτταρικού τοιχώματος των φυτών, δηλαδή η λιγνϊνη, η κυτταρίνη και η ημικυτταρίνη. Η λιγνινοκυτταρινούχος βιομάζα αποτελεί μία ελκυστική πρώτη ύλη για την παραγωγή βιοαιθανόλης λόγω της αφθονίας της στη φύση, αποτελώντας το 50% της παγκόσμιας βιομάζας (22). Οι πηγές λιγνινοκυτταρινούχου βιομάζας είναι υπολείμματα και παραπροϊόντα αγροτικής παραγωγής, και μη εδώδιμες ενεργειακές καλλιέργειες. Υπολογίζεται ότι η συνολική μέγιστη δυνατή παγκόσμια παραγωγή από τα υπολείμματα των αγροτικών εργασιών θα μπορούσε να φτάσει τα 491 δισεκατομμύρια λίτρα ετησίως, παραγωγή δεκαέξι φορές μεγαλύτερη από την τρέχουσα (10).

Η κυτταρίνη είναι ένα πολυμερές που αποτελείται από επαναλαμβανόμενα μονομερή β-D-γλυκοπυρανόζης, ή αλλιώς β-D-γλυκόζης, που ενώνονται μεταξύ τους με β,1-4 γλυκοζιτικό δεσμό και σχηματίζουν μακριές αλυσίδες. Λόγω του δεσμού αυτού ο δισακχαρίτης κελλοβιόζη αποτελεί την επαναλαμβανόμενη δομική μονάδα της αλυσίδας της κυτταρίνης. Οι μονάδες της κελλοβιόζης έχουν μορφή ανάκλιντρου (20).

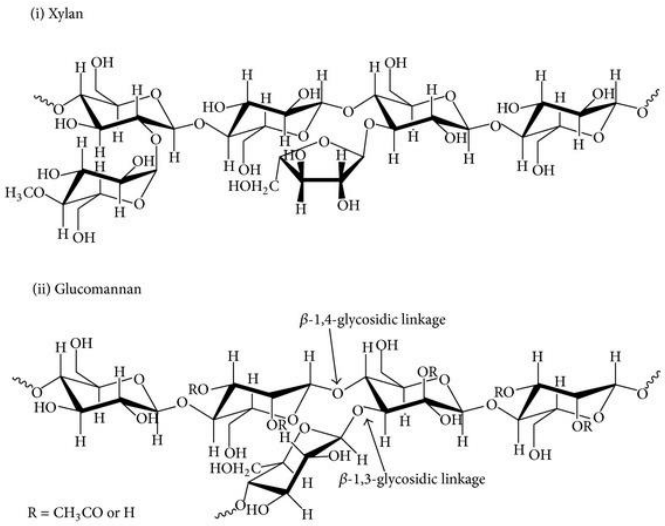


Εικόνα 1 Δομή Κυτταρίνης (40)

Τα μόρια της κυτταρίνης είναι γραμμικά, αδιάλυτα στο νερό και σχηματίζουν κρυσταλλικές περιοχές. Οι κρυσταλλικές περιοχές εμφανίζονται, λόγω των υδρογονικών δεσμών που εμφανίζονται τόσο μεταξύ μορίων γλυκόζης της ίδιας αλυσίδας κυτταρίνης (O3-H->O5' και O6->H-O2'), όσο και μεταξύ μοριών γλυκόζης που ανήκουν σε διαφορετικές αλυσίδες O6-H->O3') (8). Οι αλυσίδες κυτταρίνης προσανατολίζονται παράλληλα σε πολύ κοντινές αποστάσεις μεταξύ τους λόγω των δεσμών υδρογόνου και δημιουργούνται έτσι συμπαγείς περιοχές, οι κρυσταλλικές περιοχές. Ο υψηλός βαθμός κρυσταλλικότητας είναι που προσδίδει ακαμψία στην κυτταρίνη και συνεπώς και στο κυτταρικό τοίχωμα, αλλά είναι και ο λόγος που οι μακριές αλυσίδες της κυτταρίνης διασπόνται πιο δύσκολα στα μονομερή τους προκειμένου να ζυμωθούν, όπως θα δούμε στη συνέχεια (24).

Το δεύτερο βασικό συστατικό της λιγνινοκυτταρινούχου βιομάζας είναι η ημικυτταρίνη. Είναι ένας ετεροπολυσακχαρίτης που αποτελείται κυρίως από πεντόζες, όπως D-ξυλόζη και αραβινόζη, οι οποίες με τους β-1,4 δεσμούς σχηματίζουν τη ραχοκοκαλιά, και εξόζες όπως μαννόζη, γλυκόζη και γαλακτόζη ως την επαναλαμβανόμενη μονάδα. Πιο αναλυτικά,η ημικυτταρίνη είναι ένα πλέγμα διασταυρώμενων φυτικών μη κυτταρινικών συμπολυμερών διαφορετικών μονοσακχαριτών που σχηματίζουν αλυσιδές 500-3000 μονομερών, πολύ πιο μικρές σε σχέση με την κυτταρίνη (8). Μία ακόμη διαφορά με την κυτταρίνη έιναι ότι η ημικυτταρίνη είναι άμορφη, έντονα υγροσκοπική και έτσι εύκολα υδρολύεται σε μονομερή σάκχαρα.

Η κατηγοριοποίηση των ημικυτταρινών συνήθως γίνεται με βάση το κυριότερο μονομερές σάκχαρο (8). Έτσι έχουμε, γλυκάνες, μαννάνες, αραβινάνες, γαλακτάνες και ξυλάνες. Επειδή όμως οι ημικυτταρίνες σπάνια αποτελούνται μόνο από έναν τύπο μονοσακχαρίτη, υπάρχουν διάφορα συμπολυμερή στη φύση όπως η αραβινογλυκουρονοξυλάνη (αραβινόζη, γλυκόζη και ξυλόζη), γλυκομαννάνη (γλυκόζη και μαννόζη) και άλλα.



Εικόνα 2. Ξυλάνη και γλυκομαννάνη (40)

Παρόλα αυτά η ξυλάνη είναι το κύριο συστατικό τη ημικυτταρίνης και αποτελεί το δεύτερο πιο άφθονο πολυσακχαρίτη στη φύση.. Βρίσκεται στα κυτταρικά τοιχώματα των φυτών και στα φύκια σε διαφορετικά ποσοστά, ανάλογα με το φυτό. Αποτελείται από μία κεντρική αλυσίδα μορίων D-ξυλόζης ενωμένων μεταξύ τους με β-1,4 γλυκοζιτικούς δεσμούς. Σε αντίθεση με την κυτταρίνη, η δομή της ξυλάνης έχει εξαιτερική ποικιλομορφία και εξαρτάται από τη πηγή προέλευσή της. Στα φυλλοβόλα δέντρα βρίσκεται ως O-ακετυλ-4-O-γλυκουροξυλάνη, στα κωνοφόρα ως αραβινο-4-O-μέθυλ-D-γλυκουροξυλάνη και στα φύκια ως ομοξυλάνη, ξυλάνη δηλαδή που δεν περιλαμβάνει υποκαστάτες στην κύρια αλυσίδα(8). Η δομή της μπορεί να είναι μία απλή, σχεδόν γραμμική, μη υποκατεστημένη αλυσίδα, όπως σε μερικά ποώδη φυτά, μέχρι ένα πολύπλοκο σύμπλεγμα ετεροπολυσακχαριτών με πολύ υψηλό βαθμό διακλαδώσεων, όπως αυτή που περιέχεται στους σπόρους των δημητριακών.

Η λιγνίνη είναι ένα από τα σπουδαιότερα και πιο άφθονα συστατικά της φυτικής βιομάζας. Η παρουσία της στη φύση είναι στενά συνδεδεμένη με την κυτταρίνη. Το ποσοστό της στα διάφορα είδη φυτών διαφέρει, ενώ δε βρίσκεται σε όλα τα φυτικά είδη. Είναι ένα έντονα διακλαδισμένο αρωματικό πολυμερές με βασική δομική μονάδα το φαινυλοπροπάνιο που συνδέεται με τα μικροϊνίδια της κυτταρίνης σχηματίζοντας το λιγνινοκυτταρινούχο σύμπλεγμα (23). Υπάρχουν τρία διαφορετικά φαινυλοπροπάνια στη λιγνίνη και αυτό κάνει τη

χημική διαφορά μεταξύ κωνοφόρων και πλατύφυλλων. Δεν έχει συγκεκριμένη μορφή και ομοιογένεια, πράγμα ασυνήθιστο για βιοπολυμερές. Οι δεσμοί στη λιγνίνη είναι αιθερικοί δεσμοί καθώς και δεσμοί άνθρακα – άνθρακα. Η διόγκωση της είναι χαμηλή και υδρολύεται δύσκολα κυρίως με αλκαλικά διαλύματα σε υψηλές θερμοκρασίες.

4.3 Μέθοδοι προκατεργασίας

Η κύρια πρόκληση αυτή τη στιγμή για την παραγωγή βιοαιθανόλης από λιγνινοκυτταρινούχο βιομάζα είναι η προκατεργασία της πρώτης ύλης. Στο σύμπλεγμα αυτό της βιομάζας η κυτταρίνη προσδίδει την ακαμψία στους φυτικούς ιστούς, η ημικυτταρίνη παρέχει το υλικό επικόλλησης ενώ η λιγνίνη λειτουργεί σαν κόλλα. Κατά διάρκεια της προκατεργασίας , το σύμπλεγμα αυτό πρέπει να διασπαστεί έτσι ώστε να μειωθεί ο βαθμός κρυσταλλικότητας της κυτταρίνης και να αυξηθεί το ποσοστό των άμορφων περιοχών. Επιπρόσθετα, μεγάλο μέρος της ημικυτταρίνης πρέπει να υδρολυθεί και έτσι να απελευθερωθεί η λιγίνη ή ακόμα και να αποικοδομηθεί (24). Πρέπει επίσης να ληφθεί υπόψην ότι η επακόλουθη υδρόλυση της κυτταρίνης επηρεάζεται σε μεγάλο βαθμό από το πορώδες της λιγνινοκυτταρινούχας πρώτης ύλης. Το ποσοστό υδρόλυσης χωρίς να έχει προηγηθεί προκατεργασία είναι 20% μικρότερο από το θεωρητικό, ενώ αν προηγηθεί προκατεργασία είναι 90% μεγαλύτερο από το θεωρητικό. (21). Συγκεντρωτικά λοιπόν, οι λόγοι για τους οποίους γίνεται προκατεργασία είναι οι εξής (25):

- Η απομάκρυνση της λιγνίνης και της ημικυτταρίνης
- Η μείωση του βαθμού κρυσταλλικότητας της κυτταρίνης
- Η αύξηση του πορώδους της πρώτης ύλης

Επιπλέον, η προκατεργασία θα βελτιώσει το σχηματισμό σακχάρων ή τουλάχιστον θα βελτιώσει την ικανότητα παραγωγής τους κατα το στάδιο της υδρόλυσης και θα περιορίσει το σχηματισμό παρεμποδιστών τόσο στο στάδιο της υδρόλυσης όσο και στο στάδιο της τελικής

ζύμωσης (23). Για το λόγο αυτό έχουν αναπτυχθεί μία σειρά φυσικών, φυσικοχημικών, χημικών και βιολογικών μεθόδων προκατεργασίας της λιγνινοκυτταρινούχας πρώτης ύλης.

4.3.1 Φυσικές μέθοδοι

4.3.1.1 Μηχανικός κατακερματισμός

Η πρώτη ύλη μπορεί να κονιορτοποιηθεί με ένα συνδιασμό θρυμματισμού, λείανσης και άλεσης. Το μέγεθος των υλικών καταλήγει να είναι 10-30mm μετά το θρυμματισμό και 0,2-2mm με την άλεση (22). Η δονούμενη μπάλα άλεσης έχει βρεθεί πως είναι η πιο αποτελεσματική μέθοδος για τη διάσπαση της κρυσταλλικότητας της κυτταρίνης (22). Η απαιτούμενη ισχύς για το μηχανικό κατακερματισμό της πρώτης ύλης εξαρτάται από το τελικό επιθυμητό μέγεθος των σωματιδίων και από τα χαρακτηριστικά της πρώτης ύλης.

4.3.1.2 Πυρόλυση

Η πυρόλυση έχει επίσης χρησιμοποιιηθεί για την προκατεργασία λιγνινοκυτταρινούχας πρώτης ύλης. Τα υλικά θερμαίνονται σε υψηλή θερμοκρασία (300°C) και η κυτταρίνη αποσυντίθεται παράγοντας αέρια προϊόντα και κάρβουνο (22). Η αποσύνθεση είναι αρκετά πιο αργή και σχηματίζονται λιγότερο πτητικές ενώσεις σε χαμηλότερες θερμοκρασίες. Ήπια όξινη υδρόλυση έχει ως αποτέλεσμα 80-85% μετατροπή της κυτταρίνης σε αναγωγικά σάκχαρα με περισσότερο από 50% γλυκόζη. Η διαδικασία μπορεί να βελτιωθεί με την παρουσία οξύγονου (19).

4.3.2 Φυσικοχημικές μέθοδοι

4.3.2.1 Έκρηξη ατμού (αυτοϋδρόλυση)

Η έκρηξη ατμού είναι μία από τις πιο ευρέως χρησιμοποιούμενες μεθόδους προκατεργασίας λιγνινοκυτταρινούχας βιομάζας. Σε αυτή τη μέθοδο, θρυμματισμένη βιομάζα

υπόκειται σε κορεσμένο ατμό υψηλής πίεσης και στη συνέχεια η πίεση μειώνεται απότομα, πράγμα που κάνει τα υλικά να υφίστανται μία εκρηκτική αποσυμπίεση. Η προκατεργασία με έκρηξη ατμού λαμβάνει χώρα σε πίεση 160-260°C και πίεση 0.69-4.83 MPa για μερικά δευτερόλεπτα ή και λεπτά πρωτού τα υλικά εκτεθούν σε ατμοσφαιρική πίεση (25). Η όλη διαδικασία προκαλεί την αποσύνθεση της ημικυτταρίνης και την μερική απομάκρυνση της λιγνίνης, διευκολύνοντας την μετέπειτα υδρόλυση της κυτταρίνης.

Οι παράγοντες που επηρεάζουν την προκατεργασία με έκρηξη ατμού είναι, ο χρόνος παραμονής, η θερμοκρασία, το μέγεθος των αλεσμένων σωματιδίων και η περιεχόμενη υγρασία. Η βέλτιση διαλυτοποίηση και υδρόλυση της ημικυτταρίνης μπορεί να επιτευχθεί είτε με υψηλή θερμοκρασία και χαμηλο χρόνο παραμονής, είτε με χαμηλότερη θερμοκρασία και μεγαλύτερο χρόνο παραμονής. Προσθήκη H_2SO_4 ή SO_2 μπορεί να βελτιώσει σημαντικά το στάδιο της υδρόλυσης περιορίζοντας την παραγωγή παρεμποδιστών και να οδηγήσει σε απομάκρυνση μεγαλύτερο ποσοστό ημικυτταρίνης (25).

Τα κύρια πλεονεκτήματα της προκατεργασίας με έκρηξη ατμού είναι οι χαμηλές ενεργειακές απαιτήσεις, το χαμηλότερο κεφάλαιο επένδυσης, η πλήρης ανάκτηση των σακχάρων και η απουσία κόστους ανακύκλωσης. Οι συμβατικές μηχανικές μέθοδοι έχουν έως και 70% μεγαλύτερες ενεργειακές απαιτήσεις σε σύγκριση με την προκατεργασία με έκρηξη ατμού για να πετύχουν τα ίδια αποτελέσματα (24). Αναγνωρίζεται ως μία από τις πιο οικονομικές μεθόδους προκατεργασίας πρώτης ύλης από φυλλοβόλα δέντρα και αγροτικά υπολείμματα, όχι όμως και από κωνοφόρα δέντρα (24). Οι περιορισμοί της συγκεκριμένης μεθόδου περιλαμβάνουν: την καταστροφή ενός ποσοστού του περιεχόμενου κλάσματος ξυλάνης, την ημιτελή αποδιοργάνωση του λιγνινο-υδατανθρακικού πλέγματος και τη δημιουργία παρεμποδιστών των μικροοργανισμών που χρησιμοποιούνται στη συνέχεια (25). Οι κυριότεροι παρεμποδιστές που παράγονται είναι παράγωγα φουρανίου, φαινολικές ενώσεις και ασθενή οξέα. Λόγω αυτής της παραγωγής παρεμποδιστών της μικροβιακής ανάπτυξης, της ενζυμικής υδρόλυσης και της ζύμωσης, η προκατεργασμένη με έκρηξη ατμού βιομάζα πρέπει να εκπλυθεί με νερό προκειμένου να απομακρυνθούν οι παρεμποδιστές αυτοί καθώς και η διαλυτή στο νερό ημικυτταρίνη (28).

4.3.2.2 Υδροθερμόλυση

Πρόκεται για μία κατεργασία που δεν απαιτεί ραγδαία αποσυμπίεση της πρώτης ύλης και δεν απαιτεί τη χρήση χημικών ουσιών. Η βιομάζα αναμιγνύεται με νερό, το οποίο διατηρείται σε υψηλές θερμοκρασίες (160-240°C) με την εφαρμογή υψηλής πίεσης για παρατεταμένο χρονικό διάστημα, στη συνέχεια ψύχεται σε θερμοκρασία δωματίου όπου το μίγμα που προκύπτει μπορεί να διαχωριστεί σε ένα στερεό και ένα υγρό κλάσμα (23). Το αποτέλεσμα είναι να προκαλλούνται αλλαγές στη δομή της βιομάζας. Πιο συγκεκριμένα, η ημικυτταρίνη αποπολυμερίζεται και τα προϊόντα διάσπασής της διαλύονται στο υγρό κλάσμα, ενώ η κυτταρίνη διατηρείται ολόκληρη στο στερεό κλάσμα. Η λιγνίνη αποπολυμερίζεται και διαλυτοποιείται μερικώς αλλά δεν είναι δυνατή η πλήρης απολιγνοποίηση εξαιτίας της αποσυμπύκνωσης διαλυτών ενώσεων που προέρχονται από τη λιγνίνη (23). Η εναπομείνουσα λιγνίνη στο στερεό κλάσμα έχει αρνητική επίδραση στην επακόλουθη ενζυμική υδρόλυση, καθώς εμποδίζει τις κυτταρινάσες να φτάσουν σε ολόκληρη την επιφάνεια της κυτταρίνης. Συνολικά, απομακρύνεται το 80% της ημικυτταρίνης και το 20-30% της λιγνίνης (28). Για το λόγο αυτό έχουν προταθεί διάφορες τροποιήσεις της υδροθερμόλυσης, όπως για παράδειγμα η διαδοχική θέρμανση σε δύο στάδια, με το δεύτερο να γίνεται σε υψηλότερη θερμοκρασία, μία διεργασία με συνεχή ροή νερού σε υψηλή θερμοκρασία, σε αντίθεση με την κλασσική υδροθερμόλυση που είναι ασυνεχής διασικασία και στο τέλος η γίνεται η προσθήκη υγρής αμμωνίας (23).

Γενικά, η προκατεργασία με θερμό νερό είναι ελκυστική εξαιτίας του χαμηλού κόστους της. Δεν απαιτείται καταλύτης και το κόστος κατασκευής και συντήρησης είναι χαμηλό αφού δεν υπάρχει κίνδυνος χημικής διάβρωσης του εξοπλισμού. Ωστόσο απαιτεί υψηλές ποσότητες νερού και περισσότερη ενέργεια σε σύγκριση με διεργασίες όπως η προκατεργασία με εκτόνωση ατμού (23).

4.3.2.3 Εκτόνωση ίνας με αμμωνία (έκρηξη αμμωνίας/AFEX)

Η εκτόνωση με ίνα αμμωνίας είναι άλλη μία φυσικοχημική μέθοδος προκατεργασίας, κατά την οποία η λιγνινοκυτταρινούχος πρώτη ύλη εκτείθεται σε υγρή αμμωνία σε υψηλή θερμοκρασία και πίεση για ένα χρονικό διάστημα. Στη συνέχεια η πίεση μειώνεται απότομα

πράγμα που κάνει τα υλικά να υφίστανται μία εκρηκτική αποσυμπίεση. Ειδικότερα, η βιομάζα υποβάλλεται σε επεξεργασία με υγρή άνυδρη αμμωνία, περίπου 2kg αμμωνίας ανά kg ξηρής βιομάζας, σε θερμοκρασίες 60-100°C και υψηλή πίεση για 10-60 λεπτά και στη συνέχεια υποβάλλεται σε εκτονωτική αποσυμπίεση με αποτέλεσμα τη διόγκωση και τη φυσική αποδιοργάνωση της δομής της βιομάζας και την μερική μείωση της κρυσταλλικότητας της κυτταρίνης (8). Κατά τη διάρκεια της διαδικασίας μόνο ένα μικρό μέρος του στερεού υλικού διαλυτοποιείται, κυρίως λίγη ημικυτταρίνη και λίγη λιγνίνη (28). Η συλλογή της χρησιμοποιημένης αμμωνίας και η ανακύκλωσή της είναι δυνατή, παρά την υψηλή πτητικότητα της τελευταίας, αλλά το κόστος της διαδικασίας είναι πολύ μεγάλο σχετικά με την αξιοποιήση της μεθόδου για βιομηχανική χρήση (24). Η εκτόνωση ίνας αμμωνίας μπορεί να βελτιώσει σημαντικά τα ποσοστά σακχαροποίησης των διάφορων υλικών που πρόκειται να υποστούν προκατεργασία. Το μεγαλύτερο πλεονέκτημα όμως αυτής της μεθόδου προκατεργασίας είναι ότι δεν παρατηρείται σχηματισμός παρεμποδιστών. Ωστόσο, μπορεί να χρησιμοποιηθεί με καλά αποτελέσματα μόνο για πρώτες ύλες που δεν περιέχουν υψηλά ποσοστά λιγνίνης, όπως σε υπολείμματα αγροτικής παραγωγής ή ποώδη φυτά, ενώ έχει περιορισμένη αποτελεσματικότητα με πρώτες ύλες όπως η ξυλώδης βιομάζα (24).

4.3.2.4 Έκρηξη CO_2

Παρόμοια με την προκατεργασία έκρηξης ατμού και αμμωνίας, η έκρηξη CO_2 χρησιμοποιείται επίσης για την προκατεργασία λιγνινοκυτταρινούχων πρώτων υλών. Αυτή η μέθοδος βασίζεται στη χρήση του CO_2 ως υπερκρίσιμου ρευστού, το οποίο είναι ένα ρευστό σε αέρια μορφή που έχει όμως συμπιεστεί σε θερμοκρασίες πάνω από το κρίσιμο σημείο του με αποτέλεσμα η πυκνότητά του να είναι σαν υγρού ρευστού. Το μέγεθος των μορίων του CO_2 είναι παρόμοιο με αυτό του νερού και της αμμωνίας που αναλύθηκαν παραπάνω και έτσι τα μόρια μπορούν να εισχωρήσουν με τον ίδιο τρόπο στους πόρους της βιομάζας (22). Με την εκρηκτική αποσυμπίεση του CO_2 επέρχεται διαταραχή στη δομή της κυτταρίνης και της ημικυτταρίνης με αποτέλεσμα την αύξηση της ενεργής επιφάνειας που μπορεί να προσβληθεί

κατά τη διάρκεια του στάδιου της υδρόλυσης. Συγκριτικά με άλλες φυσικοχημικές μεθόδους προκατεργασίας έχει διαπιστωθεί ότι η έκρηξη CO_2 είναι πιο αποδοτική οικονομικά από την έκρηξη αμμωνίας και δεν προκαλεί τη δημιουργία παρεμποδιστών όπως παρατηρείται στην προκατεργασία με έκρηξη ατμού. Άλλα πλεονεκτήματα της προκατεργασίας με έκρηξη CO_2 είναι ότι είναι μία μη τοξική μέθοδος, μη εύφλεκτη και με εύκολη ανάκτηση του CO_2 (24).

4.3.3 Χημικές μέθοδοι προκατεργασίας

4.3.3.1 Αλκαλική προκατεργασία

Η επίδραση που έχουν ορισμένες βάσεις στη λιγνινοκυτταρινούχα βιομάζα είναι η βάση της αλκαλικής προκατεργασίας που είναι αποτελεσματική ανάλογα με το ποσοστό περιεχόμενης λιγνίνης στη βιομάζα. Η προκατεργασία με αλκάλεα αυξάνει την ικανότητα διάσπασης της κυτταρίνης και είναι πιο αποτελεσματική στη διαλυτοποίηση της λιγνίνης, εμφανίζοντας μικρότερη διαλυτοποίηση της ημικυτταρίνης και της κυτταρίνης από τις αντίστοιχες υδροθερμικές και οξειδωτικές μεθόδους (24). Όλη η λιγνίνη και ένα μέρος της ημικυτταρίνης αφαιρούνται, ενώ τα υδροξείδια του νατρίου, ασβεστίου, αμμωνίου και θείου που χρησιμοποιούνται διογκώνουν τη βιομάζα, αυξάνουν την εσωτερική ενεργή επιφάνεια της κυτταρίνης και προκαλούν μείωση του βαθμού πολυμερισμού και της κρυσταλλικότητάς της (8). Η αλκαλική προκατεργασία μπορεί να πραγματοποιηθεί σε θερμοκρασία δωματίου και σε χρόνους που ποικίλουν από δευτερόλεπτα έως και μερικές μέρες. Είναι πιο αποτελεσματική σε βιομάζα από αγροτικά υπολείμματα από ότι σε ξυλώδη βιομάζα. Παρόλα αυτά, προκαλεί απώλεια ζυμώσιμων σακχάρων και δημουργία παρεμποδιστών. Οι μέθοδοι που βασίζονται στην προκατεργασία με αλκάλεα είναι γενικά αποτελεσματικότερες στην διαλυτοποίηση ενός μεγαλύτερου μέρους της λιγνίνης ενώ διατηρούν σχεδόν ανέπαφο και αδιαλυτοποίητο το μεγαλύτερο μέρος της ημικυτταρίνης (25).

4.3.3.2 Όξινη προκατεργασία

Ο κύριος στόχος της προκατεργασίας με οξέα είναι η διαλυτοποίηση της ημικυτταρίνης που περιέχεται στη βιομάζα προκειμένου να γίνει η κυτταρίνη περισσότερο προσβάσιμη στα ένζυμα που θα την υδρολύσουν. Πυκνά διαλύματα οξέων, όπως H_2SO_4 και HCl, έχουν χρησιμοποιηθεί για την επεξεργασία λιγνινοκυτταρινούχου βιομάζας, αλλά παρότι είναι ισχυροί παράγοντες, είναι ταυτόχρονα ιδιαίτερα τοξικοί, διαβρωτικοί και επικίνδυνοι και απαιτούν τη χρήση εξοπλισμού που να είναι ανθεκτικός στη διάβρωση (24). Το υψηλό κόστος που προκύπτει από τη χρήση πυκνών διαλυμμάτων οξέων έχει μειώσει το ενδιαφέρον για τη βιομηχανική τους χρήση. Καταλληλότερες για βιομηχανική εφαρμογή κρίνονται οι μέθοδοι στις οποίες χρησιμοποιούνται αραιά οξέα, όπως το θειϊκό οξύ. Η προκατεργασία αυτή γίνεται σε συγκεντρώσεις 0.5-1.2% β/β και θερμοκρασίες 170-190°C για μικρό χρονικό διάστημα ή χαμηλότερες θερμοκρασίες (120°C) για μεγαλύτερο χρονικό διάστημα (23). Εκτός από τη διαλυτοποίηση της ημικυτταρίνης, η μέθοδος αυτή έχει το επιπλέον πλεονέκτημα της μετατροπής της ημικυτταρίνης σε ζυμώσιμα σάκχαρα. Ωστόσο, ανιχνεύονται ενώσεις από την αποικοδόμηση των σακχάρων, όπως η φουρφουράλη, οι οποίες στο στάδιο της ζύμωσης επηρεάζουν σε μεγάλο βαθμό τη μικροβιακή ανάπτυξη (25).

4.3.3.3 Προκατεργασία με οργανικούς διαλύτες (organosolv)

Σε αυτή τη μέθοδο προκατεργασίας ένας οργανικός ή ένα υδατικό διάλυμα οργανικού διαλύτη χρησιμοποιείται με ανόργανα οξέα που δρουν ως καταλύτες για τη διάσπαση των εσωτερικών δεσμών λιγνίνης και ημικυταρίνης και την παραγωγή προκατεργασμένης κυτταρίνης, καταλληλότερης για ενζυμική υδρόλυση. Οι οργανικοί διαλύτες που χρησιμοποιούνται είναι μεθανόλη, αιθανόλη, ακετόνη, αιθυλενογλυκόλη κ.α. (24). Οργανικά οξέα όπως το οξαλικό, το ακετυλοσαλικιλικό και το σαλικιλικό χρησιμοποιούνται επίσης ως καταλύτες της διαδικασίας και επιτυγχάνουν μάλιστα υψηλή απόδοση ανάκτησης της ξυλόζης. Οι διαλύτες που χρησιμοποιούνται στην προκατεργασία πρέπει να διαχωρίζονται γιατί δρουν παρεμποδιστικά στη μικροβιακή ανάπτυξη, την ενζυμική υδρόλυση και τη ζύμωση των

σακχάρων. Η απομάκρυνση των διαλυτών γίνεται με μεθόδους διαχωρισμού όπως η εξάτμιση και η συμπύκνωση (25).

4.3.4 Βιολογική προκατεργασία

Η βιολογική προκατεργασία έχει εξερευνηθεί παλαιότερα στη χρήση λιγνινοκυτταρινούχων υλικών ως πρώτη ύλη για την παραγωγή χαρτιού (24). Πρόσφατα αυτή η περιβαλλοντικά φιλική μέθοδος έχει γνωρίσει ανανεωμένο ενδιαφέρον ως μέθοδος προκατεργασίας για τη βελτίωση της ενζυμικής σακχαροποίησης της βιομάζας για την παραγωγή βιοαιθανόλης. Στις βιολογικές μεθόδους προκατεργασίας, μύκητες που προκαλούν καστανή, λευκή και μαλακή σήψη χρησιμοποιούνται για τη διάσπαση της λιγνίνης και της ημικυτταρίνης καθώς και για τη μείωση του βαθμού πολυμερισμού της κυτταρίνης. Η αποικοδόμηση της λιγνίνης από μύκητες που προκαλούν λευκή σήψη, ο πιο αποτελεσματικός για την βιολογική προκατεργασία βιομάζας, συμβαίνει μέσω της δράσης ενζύμων που διασπούν τη λιγνίνη, όπως περοξιδάσες και λακκάσες (25). Τα πλεονεκτήματα της μεθόδου είναι η φιλικότητα προς το περιβάλλον, οι χαμηλές ενεργειακές απαιτήσεις, το χαμηλό απαιτούμενο κεφάλαιο και το γεγονός ότι δε χρησιμοποιούνται άλλοι χημικοί παράγοντες (26). Παρόλα αυτά, ο πολύ χαμηλός βαθμός υδρόλυσης εμποδίζει την εφαρμογή της σε βιομηχανικές διεργασίες. Για το λόγο αυτό χρησιμοποιείται πολλές φορές σε συνδυασμό με χημικές μεθόδους προκατεργασίας (8). Άλλα μειονεκτήματα της συγκεκριμένης μεθόδου προκατεργασίας είναι η παρεμπόδιση της ανάπτυξης των μικροοργανισμών στο στάδιο της ζύμωσης λόγω του σχηματισμού παραγώγων από τη λιγνίνης και η σημαντική απώλεια ξυλάνης και μαννάνης.

4.4 Μέθοδοι υδρόλυσης

Μετά την προκατεργασία της βιομάζας, στην περίπτωση που αυτή είναι λιγνινοκυτταρινούχας σύσταστης, ακολουθεί το στάδιο της υδρόλυσης, της διάσπαση ενός

μακρομορίου δηλαδή με την προσθήκη ενός μορίου νερού. Η αντίδραση καταλύεται από αραιό οξύ ή ένζυμα. Χωρίς προκατεργασία η υδρόλυση έχει μία απόδοση περίπου 20%, ενώ εάν έχει προηγηθεί προκατεργασία η απόδοσή της είναι περίπου 90% (22).

4.4.1 Όξινη υδρόλυση

Η χημική υδρόλυση βασίζεται στην έκθεση του υλικού σε ένα χημικό για κάποιο χρονικό διάστημα σε συγκεκριμένη θερμοκρασία, προκειμένου αυτό να διασπαστεί σε μονομερή ζυμώσιμα σάκχαρα. Υπάρχουν δύο κατηγορίες όξινων υδρολύσεων, αυτή όπου η υδρόλυση γίνεται με τη χρήση πυκνού οξέος και αυτή που η υδρόλυση γίνεται με τη χρήση αραιού οξέος (22).

Στην υδρόλυση με χρήση πυκνού οξέος η κυτταρίνη μετατρέπεται γρήγορα σε γλυκόζη και οι ημικυτταρίνες στα αντίστοιχα μονομερή σάκχαρά τους. Το κύριο πλεονέκτημα της μεθόδου είναι η υψηλή ανάκτηση σακχάρων, ενώ τα μειονεκτήματα της είναι το υψηλό κόστος συντήρησης του μηχανολογικού εξοπλισμού και το γεγονός ότι για να είναι οικονομικά βιώσιμη στο τέλος πρέπει να γίνεται ανάκτηση των οξέων προκειμένου να ξαναχρησιμοποιηθούν (24).

Η υδρόλυση με αραιά οξέα είναι η παλαιότερη εφαρμοζόμενη μέθοδος για τη μετατροπή βιομάζας σε αιθανόλη. Σε αυτή τη μέθοδο αραιά οξέα όπως το θειϊκό οξύ αναμιγνύονται με τη βιομάζα για να υδρολυθεί η ημικυτταρίνη σε πεντόζες και εξόζες. Η διαδικασία εκτελείται σε δύο στάδια, το πρώτο σε πιο ήπιες συνθήκες για την ανάκτηση πεντοζών και το δεύτερο σε πιο έντονες για την ανάκτηση εξοζών. Το μεγαλύτερο πλεονέκτημα της υδρόλυσης με αραιά οξέα είναι ο γρήγορος ρυθμός αντίδρασης που διευκολύνει τη συνεχή ροή της διεργασϊας (8).

4.4.2 Ενζυμική υδρόλυση

Μία άλλη βασική μέθοδος υδρόλυσης είναι η ενζυμκή υδρόλυση. Τα ένζυμα είναι φυτικές πρωτεϊνες που απαντώνται στη φύση και καταλύουν διάφορες αντιδράσεις. Στην προκειμένη περίπτωση, τα ένζυμα προκαλούν αποπολυμερισμό της κυτταρίνης σε γλυκόζη, η

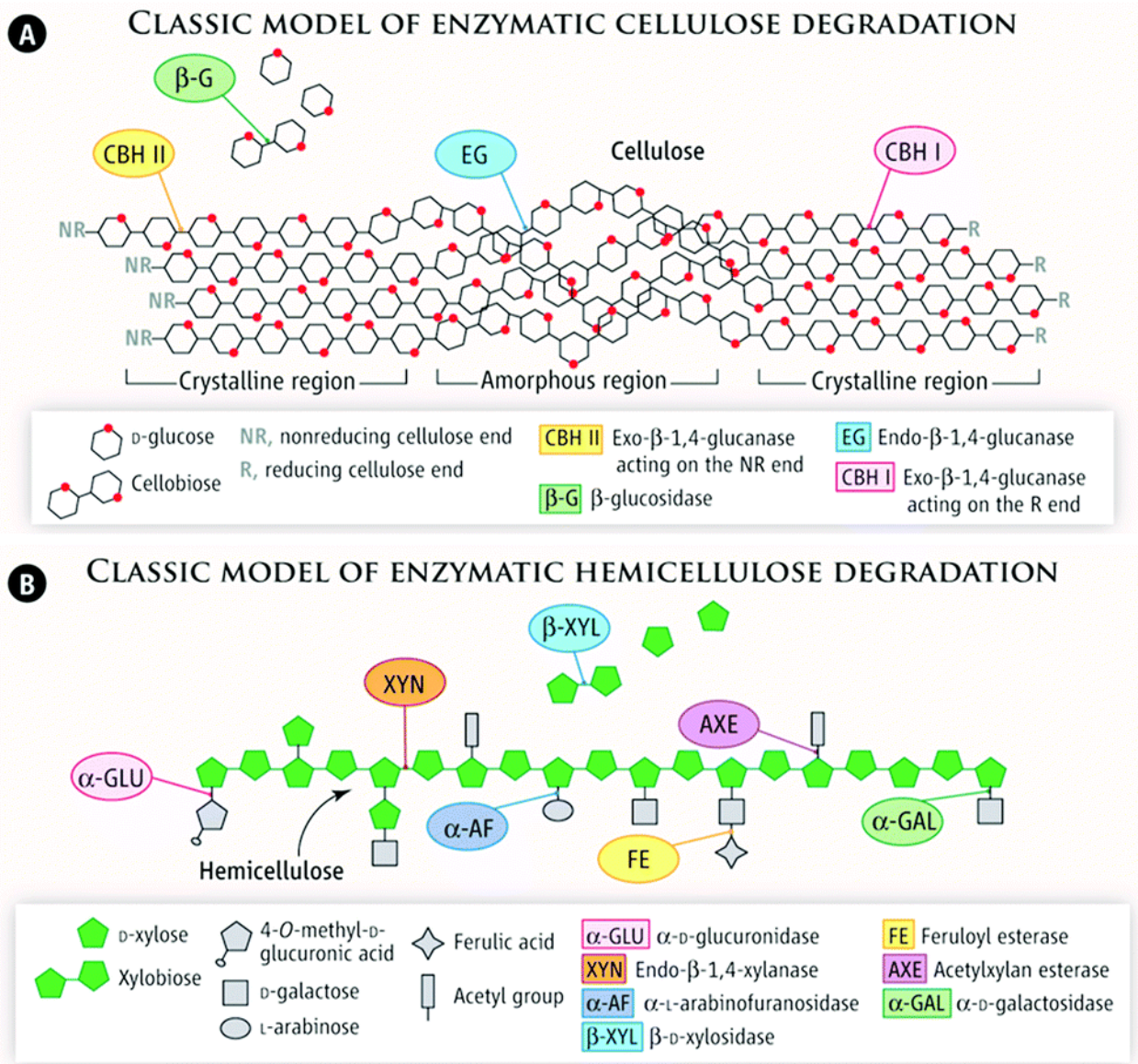
οποία μπορεί να χρησιμοποιηθεί για την παραγωγή αιθανόλης μαζί με τα σάκχαρα που απελευθερώνονται από την διάσπαση της ημικυτταρίνης κατά τη διάρκεια της προκατεργασίας. Έτσι η πιο σημαντική ενζυμική δράση που είναι αναγκαία για την υδρόλυση της προκατεργασμένης βιομάζας είναι εκείνη των κυτταρινασών, μίας ομάδας ενζύμων που δρουν συνεργιστικά για την υδρόλυση της κυτταρίνης (22). Υπάρχουν τρία κύρια είδη κυτταρινασών (25):

- Οι ενδογλουκανάσες ή αλλιώς 1,4-D-γλυκανοϋδρολάσες. Αυτά τα ένζυμα επιδρούν στις περιοχές της ίνας κυτταρίνης που έχουν χαμηλό βαθμό κρυσταλλικότητας και δημιουργούν ελεύθερα άκρα
- Οι έξωγλουκανάσες ή αλλιώς 1,4-D-γλουκανο κελλοβιοϋδρολάσες. Τα ένζυμα αυτά διασπούν και άλλο το μόριο, αφαιρώντας μόρια κελλοβιόζης από τα νέα ελεύθερα άκρα
- Οι β-γλυκοζιδάσες. Τα ένζυμα αυτά υδρολύουν τα μόρια της κελλοβιόζης σε γλυκόζη. Η δράση της β-γλυκοζιδάσης είναι πολύ σημαντική, καθώς η κελλοβιόζη είνια πολύ ισχυρότερος παρεμποδιστής της εξωγλουυκανάσης από τη γλυκόζη

Ταυτόχρονα όμως και άλλη μία ενζυμική δράση είναι απαραίτητη, εκείνης των ημικυτταρινασών, ενζύμων δηλαδή που αποικοδομούν την ημικυτταρίνη σε απλά σάκχαρα.Η δράση κρίνεται αναγκαία μιας και το ημικυτταρινούχο κλάσμα μπορεί να συνεισφέρει σημαντικά σε ζυμώσιμα σάκχαρα και να ελαττωθεί σημαντικά το κόστος της παραγωγής βιοαιθανόλης. Τα κύρια είδη των ημικυτταρινασών είναι (25):

- Οι ξυλανάσες. Οι ξυλανάσες χωρίζονται με τη σείρα τους σε δύο κατηγορίες: α) τις ενδοξυλανάσες που διασπούν την αλυσίδα της ξυλάνης σε μικρότερους ολιγοσακχαρίτες και β) τις β-ξυλοζιδάσες που διασπούν τους ολιγοσακχαρίτες αυτούς σε ξυλόζη
- Οι α-L-αραβινοφουρανοσιδάσες που υδρολύουν τα μόρια της αραβινόζης

- Οι α-Γλυκουρονοζιδάσες που απομακρύνουν τις ομάδες γλυκουρονικού οξέος από την κύρια αλυσίδα της ξυλάνης
- Οι ακετυλοεστεράσες που απελευθερώνουν ακέτυλο ομάδες που δρουν ως υποκαταστάτες της κύριας αλυσίδας των πολυμερών της ξυλάνης
- Οι εστεράσες του φερουλικού και π-κουμαρικού οξέος που υδρολύουν το δεσμό μεταξύ των υδρόξθκινναμικών οξέων και των κύριων πολυμερών αλυσιδών της ξυλάνης.



Εικόνα 3 Ενζυματική υδρόλυση της κυτταρίνης και της ημικυττάρινης

5 ΔΙΕΡΓΑΣΙΕΣ ΠΑΡΑΓΩΓΗΣ ΒΙΟΑΙΘΑΝΟΛΗΣ ΚΑΙ ΒΙΟΝΤΙΖΕΛ

Η χρήση βιοκαύσιμων αντί των συμβατικών ορυκτών καυσίμων δεν είναι μία καινούρια ιδέα, ο άνθρωπος είχε οραματιστεί τη χρήση τους σχεδόν από τη στιγμή που δημιουργήθηκε η πρώτη μηχανή εσωτερικής καύσης. Το ενδιαφέρον για τα βιοκαύσιμα έχει μείνει ζωντανό μέχρι σήμερα έχοντας αναζωπυρωθεί ιδιαίτερα τελευταία, κυρίως λόγω διάφορων προκλήσεων που σχετίζονται με τις τεράστιες και ολοένα αυξανόμενες ενεργειακές ανάγκες, αλλά και με την περιβαλλόντικη βιώσιμότητα του μοντέλου κατανάλωσης καυσίμων. Με τη βιοαιθανόλη και το βιοντίζελ να είναι τα πλέον παραγώμενα βιοκαύσιμα, η επιστημονική έρευνα έχει στραφεί έντονα στη δημιουργία αποτελεσματικών και οικονομικών μεθόδων για την παραγωγή των δύο αυτών βιοκαυσίμων

5.1 Παραγωγή βιοντίζελ

Υπάρχουν αρκετές γενικά αποδεκτές μέθοδοι που έχουν καθιερωθεί για την παραγωγή βιοντίζελ. Τα φυτικά έλαια, τα ζωϊκά λίπη και τα έλαια από μικροβιακή παραγωγή είναι οι καταλληλότερες πρώτες ύλες για την παραγωγή βιοντίζελ. Οι τέσσερις βασικές μέθοδοι που χρησιμοποιούνται για την παραγωγή βιοντίζελ είναι οι παρακάτω:

5.1.1 Κλασσικές μέθοδοι

Άμεση χρήση και ανάμιξη των ελαίων

Στις αρχές της δεκαετίας του 1980 άρχισε να διερευνάται έντονα η πιθανότητα απευθείας χρήσης φυτικών ελάιων ως καύσιμο κίνησης. Αυτό αποδείχτηκε ότι δεν ήταν εφικτό λόγω προβλημάτων στις επιδόσεις των κινητήρων. Τα κύρια προβλήματα είναι το υψηλό ιξώδες, η παρουσία όξινων ομάδων, τα περιεχόμενα λιπαρα οξέα, η δημιουργία κόμμεων, η εναπόθεση άνθρακα και οι κακές λιπαντικές ιδιότητες (26). Σε μία προσπαθεια να

ξεπεραστούν τα προβλήματα αυτά, προτάθηκε η ανάμειξη με ορυκτό ντίζελ. Σε δοκιμές που έγιναν χρησιμοποιήθηκαν μίγματα με προσθήκη 10% έως 50% φυτικών ελαίων (26). Παρότι παρατηρήθηκε μία μικρή βελτίωση στην απόδοση των κινητήρων, η χρήση ανεπεξέργαστων φυτικών ελαίων ακόμα και σε μίγματα έχει κριθεί μη ικανοποιητική λόγω του ότι η δομή τους και άρα και ο πολυακόρεστος χαρακτήρας και το ιξώδες τους μένουν αμετάβλητα

Μικρογαλακτώματα των ελαίων

Προκειμένου να λυθούν τα προβλήματα που σχετίζονται με τη δομή και το υψηλό ιξώδες των φυτικών ελαίων μπορεί να εφαρμοστεί η μέθοδος της μικρογαλακτωματοποίησης. Ως μικρογαλάκτωμα ορίζεται ένας κολλοειδές εναιώρημα οπτικώς ισοτροπικών ρευστών μικροδομών με διαστάσεις στην κλίμακα των 1-150 nm από δύο μη αναμίξιμα ρευστά και από ένα ή περισσότερα αμφίφυλα μόρια (29). Στη συγκεκριμένη περίπτωση, μικρογαλάκτωμα μπορεί να δημιουργηθεί με την ανάμιξη φυτικού ελαίου, εστέρα σε μέσο διασποράς ή με την ανάμιξη φυτικού ελαίου με αλκοόλες όπως μεθανόλη, αιθανόλη και 1-βουτανόλη και μίας επιφανειενεργού ουσίας. Με τη δημιουργία μικρογαλακτωμάτων φυτικών ή άλλης προέλευσης ελαίων μπορεί λυθεί το πρόβληματα με το υψηλό ιξώδες και να βελτιωθεί ο ψεξασμός του καυσίμου μέσω εκρηκτικής ατμοποίησης των συστατικών των μικυλλίων (26).

Πυρόλυση (thermal cracking)

Η πυρόλυση είναι η μετατροπή μίας ουσίας σε μία άλλη με τη μεταφροά θερμότητας και τη χρήση ή όχι ενός καταλύτη. Η θέρμανση γίνεται απουσία οξυγόνου και οδηγεί στη σχάση χημικών δεσμών αποδίδοντας μικρότερα μόρια. Η πυρολιτική χημεία είναι δύσκολο να χαρακτηριστεί λόγω της μεγάλης ποικιλίας των αντιδράσεων που μπορούν να συμβούν και της μεγάλης ποικιλίας των προϊόντων που μπορεί να παραχθούν. Η πρώτη ύλη για την πυρόληση στη συγκεκριμένη περίπτωση μπορεί να είναι φυτικά έλαια, ζωϊκά λίπη, φυσικά λιπαρά οξέα και μεθυλεστέρες λιπαρών οξέων. Η πυρόληση λιπών ερευνάται πάνω από εκατό χρόνια,

ειδικά στις περιοχές εκείνες που δεν έχουν κοιτάσματα υδρογονανθράκων. Τα προϊόντα της πυρόλυσης ελαίων και λιπών είναι είναι χημικά παρόμοια με τα ορυκτά καύσιμα, αλλά η απομάκρυνση του περιεχόμενου οξυγόνου απομακρύνει κάθε περιβαλλόντικό όφελος σε σχέση με ένα οξυγονωμένο βιοκαύσιμο και ο βιομηχανικός εξοπλισμός που απαιτείται είναι ακριβός για μονάδες μέτριας παραγωγικότητας (26).

Μετεστεροποίηση

Η μετεστεροποίηση ή αλλιώς αλκοόλυση είναι η αντίδραση λίπους ή ελαίου με μία αλκοόλη προς το σχηματισμό εστέρων και γλυκερόλης, ενώ συνήθως χρησιμοποιείται και κάποιος καταλύτης για να βελτιωθούν ο ρυθμός και η απόδοση της αντίδρασης. Πιο συγκεκριμένα, ένα τριγλυκερίδιο αντιδρά με μία αλκοόλη και παράγονται ένα μίγμα αλκυλεστέρων των λιπαρών οξέων και γλυκερίνη ως παραπροϊόν. Μεταξύ των αλκοολών που μπορούν να χρησιμοποιηθούν στη μετεστεροποίηση είναι η αιθανόλη, η μεθανόλη, η προπανόλη και η βουτανόλη με τις πρώτες δύο να είναι αυτές που χρησιμοποιούνται περισσότερο (8). Η αντίδραση μπορεί να καταλυθεί από, αλκάλεα, οξέα ή ένζυμα. Η μετεστεροποίηση είναι η κύρια διαδικασία που χρησιμοποιείται για την παραγωγή βιοντίζελ στην Ευρώπη και στις ΗΠΑ. Χρησιμοποιείται επίσης για την παραγωγή μεθυλεστέρων για χρήση ως απορρυπαντικά ή ως πρώτη ύλη στη βιομηχανία των καλλυντικών (17).

5.1.2 Μικροβιακό λίπος

Μία άλλη ενδιαφέρουσα πηγή ελαίων για την παραγωγή βιοντίζελ είναι τα μικροβιακά λιπίδια ή πιο ευρέως γνωστά μονοκυτταρικά λιπίδια. Τα μονοκυτταρικά λιπίδια παράγονται από μερικούς ελαιογόνους μικροοργανισμούς, όπως οι ζύμες, οι μύκητες, τα βακτήρια και τα μικροφύκη. Έχει αποδειχτεί ότι μικροβιακά έλαια μπορούν να χρησιμοποιηθούν για την παραγωγή βιοντίζελ και έχουν μάλιστα και μερικά συγκριτικά πλεονεκτήματα σε σχέση με τα φυτικά έλαια και τα ζωϊκά λίπη: μικρός κύκλος ζωής, λιγότερη απαιτούμενη κατεργασία, εξαρτόνται λιγότερο από το μέρος , το κλίμα και η παραγωγή τους είναι πιο εύκολο να

κλιμακωθεί (8). Σε πολλές περιπτώσεις τα μικροβιακά λιπίδια έχουν παρόμοια περιεκτικότητα σε λιπαρά οξέα με τα φυτικα έλαια που χρησιμοποιούνται για την παραγωγή βιοντίζελ. Τα μικροβιακά λιπίδια αποτελούνται κυρίως από τριγλυκερίδια, τα οποία περιέχουν λιπαρά οξέα όπως το παλμιτικό, το παλμιτοελαϊικό, το ελαϊκό και το λινολεϊκό (44). Η χρήση μονοκυτταρικών λιπιδίων ως πρώτη ύλη για την παραγωγή βιοντίζελ σε βιομηχανική κλίμακα είναι αρκετά ελπιδοφόρα καθώς προσφέρει πολλά πλεονεκτήματα: είναι ανανεώσιμη πηγή, έχει υψηλό ρυθμό ανάπτυξης και δεν καταλαμβάνει χώρο που μπορεί να χρησιμοποιηθεί για αγροτικές εργασίες (27).

5.2 Παραγωγή βιοαιθανόλης

Κατά την διεργασία παραγωγής αιθανόλης από λιγνιγνονοκυτταρινούχα ή αμυλούχα υλικά, η ενζυμική υδρόλυση και η ζύμωση της γλυκόζης μπορούν να διεξαχθούν ξεχωριστά σε διαφορετικούς αντιδραστήρες, μία μέθοδος που ονομάζεται SHF (Separate Hydrolysis and Fermentation: διακριτή υδρόλυση και ζύμωση) ή ταυτόχρονα στον ίδιο αντιδραστήρα, με τη μέθοδο που ονομάζεται SSF (Simultaneous Saccharification and Fermentation: ταυτόχρονη σακχαροποίηση και ζύμωση) ή με τη μέθοδο CBP (Consolidated Bioprocess: ενοποιημένη διεργασία) (8).

5.2.1 Διακριτή υδρόλυση και ζύμωση

Όταν η ενζυμική υδρόλυση και η ζύμωση εκτελούνται σε δύο διακριτά διαδοχικά στάδια τότε η διεργασία ονομάζεται “Διακριτή υδρόλυση και ζύμωση” ή συντομογραγικά SHF. Η πρώτη ύλη, είτε προκατεργασμένη λιγνινοκυτταρινούχος βιομάζα είτε αμυλούχος βιομάζα, τοποθετείται σε έναν πρώτο αντιδραστήρα, όπου υδρολύεται ενζυμικά σε μονομερή σάκχαρα. Στη συνέχεια η υδρολυμένη βιομάζα μεταφέρεται σε έναν βιοαντιδραστήρα, όπου μικροοργανισμός που χρησιμοποιείται για ζύμωση εξοζών μετατρέπει τη γλυκόζη σε αιθανόλη. Η ζύμωση των πεντοζών, όταν πραγματοποιείται, γίνεται σε ξεχωριστή μονάδα, γιατί οι μικροοργανισμοί που έχουν τη δυνατότητα να ζυμώνουν τόσο τις εξόζες όσο και τις πεντόζες το κάνουν με ρυθμούς πολύ χαμηλότερους σε σχέση με εκείνους που έχουν τη δυνατότητα να ζυμώνουν μόνο εξόζες. Όταν ολοκληρωθεί η ζύμωση της γλυκόζης, το μίγμα μπαίνει σε

αποστακτική στήλη προκειμένου να αφαιρεθεί η αιθανόλη και να παραμείνει η ξυλόζη. Σε έναν δεύτερο βιοαντιδραστήρα η ξυλόζη μετατρέπεται και αυτή σε αιθανόλη και το τελικό προϊόν αποστάζεται για την ανάκτηση της αιθανόλης. Το κύριο πλεονέκτημα της SHF είναι ότι το κάθε στάδιο πραγματοποιείται στις βέλτιστες συνθήκες, δηλαδή η υδρόλυση στους 45-50°C και η ζήμωση στους 28-37°C (41). Τα μειονεκτήματα τις μεθόδου είναι το υψηλό κόστος πραγματοποίησης διακριτών διεργασίων, καθώς και το γεγονός ότι τα υδρολυτικά ένζυμα παρεμποδίζονται από τα προϊόντα της υδρόλυσης που συσσωρεύονται λόγω της ασυνεχούς φύσης της διεργασίας, με αποτέλεσμα να μειώνεται σταδιακά ο ρυθμός της υδρόλυσης (41).

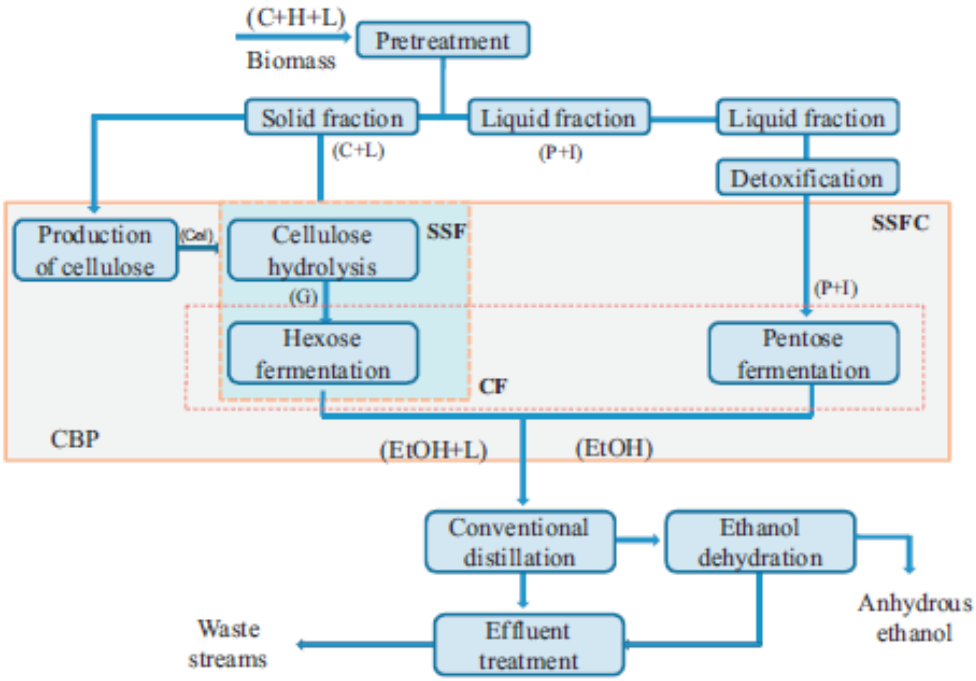
5.2.2 Ταυτόχρονη σακχαροποίηση και ζύμωση

Ένας τρόπος μείωσης του κόστους και της εμφάνισης παρεμποδιστών στο στάδιο της υδρόλυσης είναι η"Ταυτόχρονη Σακχαροποίηση και Ζύμωση" ή συντομογραφικά SSF. Η SSF πραγματοποιείται σε έναν αντιδραστήρα υπό συνθήκες όσο το δυνατόν άριστες τόσο για τα ένζυμα που χρησιμοποιούνται για την υδρόλυση, όσο και για το μικροοργανισμό που χρησιμοποιείται για τη ζύμωση, παράγοντας πολύ κρίσιμος για την αποτελεσματικότητα της διεργασίας. Το κλειδί της διεργασίας είναι η ικανότητα ταχείας μετατροπής των σακχάρων σε αιθανόλη με το που αυτά σχηματίζονται, μειώνοντας έτσι τη συσσώρευση τους στον αντιδραστήρα. Έχοντας υπόψην ότι τα σάκχαρα εμφανίζουν μεγαλύτερη παρεμπόδιση από την αιθανόλη, η ταυτόχρονη σακχαροποίηση και ζύμωση μπορεί να φτάσει υψηλότερους ρυθμούς, αποδόσεις και συγκεντρώσεις αιθανόλης από ότι ή Διακριτή Υδρόλυση και Ζύμωση. Επίσης, η SSF προσφέρει έναν πιο εύκολο χερισμό και λιγότερο μηχανολογικό εξοπλισμό, καθώς δεν χρησιμοποιούνται ξεχωριστοί αντιδραστήρες υδρόλυσης. Ωστόσο, το μεγαλύτερο μειονέκτημα της μεθόδου είναι ότι οι άριστες συνθήκες ζύμωσης και υδρόλυσης είναι πολύ διαφορετικές κάνοντας τη βελτιστοποίηση των διαφορετικών παραμέτων της διεργασίας να είναι ένα πολύ δύσκολο έργο (32). Η υδρόλυση με κυτταρινάσες πραγματοποιείται σε θερμοκρασίες περίπου 50 ^{o}C, ενώ οι περισσότεροι μικροοργανισμοί έχουν μία βέλτιστη, αναφορικά με την παραγωγή αιθανόλης, θερμοκρασία 28-37 ^{o}C (43). Για το λόγο αυτό αναζητούνται θερμοανθεκτικοί μικροοργανισμοί που να έχουν τη δυνατότητα ζύμωσης σακχάρων ή χρησιμοποιούνται μικροοργανισμοί ανασυνυασμένου DNA (42).

Μία παραλλαγή της συγκεκριμένης μεθόδου είναι η ταυτόχρονη σακχαροποίηση και ζύμωση εξόζών και πεντοζών (SSCF: Simultaneous Saccharification and Co-Fermentation). Η μέθοδος αυτή προσανατολίζεται στην πλήρη αφομοίωση τόσο των εξοζών όσο και των πεντοζών που απελευθερώνονται κατά τη διάρκεια της υδρόλυσης. Η χρήση μικτών καλλιεργειών από ζύμες που αποικοδομούν μόνο εξόζες με ζύμες που αποικοδομούν και εξόζες και πεντόζες έχει προταθεί, αλλά υπάρχουν προβλήματα που σχετίζονται με το γεγονός ότι οι πρώτοι μικροοργανισμο;ί αναπτύσσονται πιο γρήγορα από τους τελευταίους (28).

5.2.3 Ενοποιημένη διεργασία

Μία εναλλακτική στρατηγική στην παραγωγή βιοαιθανόλης από λιγνινοκυτταρινούχα βιομάζα είναι η " Ενοποιημένη Διεργασία " συντομογραφικά γνωστή ως CBP (Consolidated Bioprocess), η οποία αποτελείται από ένα μόνο στάδιο κατά το οποίο ένα μικροβιακό σύστημα εκτελεί τόσο την παραγωγή κυτταρινασών για την υδρόλυση της πρώτης ύλης όσο και τη ζύμωση των σακχάρων που προκύπτουν, τόσο των εξοζών όσο και των πεντοζών. Αυτή η διαφορά δίνει το πλεονέκτημα στη διεργασία ότι δεν απαιτούνται δαπάνες λειτουργικές η κεφαλαιουχικές που να σχετίζονται με την παραγωγή ενζύμων (31). Επιπλέον, δεν εκτρέπεται μέρος του υποστρώματος για την παραγωγή ενζύμων, ενώ τα βιοσυστήματα παραγωγής ενζύμων και ζύμωσης είναι απόλυτα συμβατά. Το μειονέκτημα της συγκεκριμένης μεθόδου είναι ότι οι μικροοργανισμοί που μπορούν να αφομοιώσουν και εξόζες και πεντόζες παράγουν αιθανόλη με σχετικά χαμηλούς ρυθμούς και σε μικρές συγκεντρώσεις για να μπορέσουν να χρησιμοποιηθούν βιομηχανικά (8). Ωστόσο, τεχνικές μεταβολικής μηχανικής ίσως μπορέσουν στο μέλλον να μετατρέψουν μικροοργανισμούς σε κατάλληλους βιοκαταλύτες με τα επιθυμητά χαρακτηριστικά για την παραγωγή αιθανόλης.



Εικόνα 4 Συγκεντρωτικό διάγραμμα διεργασιώ παραγωγής βιοαιθανόλης. C:κυτταρίνη, H:ημικυτταρίνη, L:λιγνίνη, P:πεντόζες, I:παρεμποδιστές, Cel:κυτταρινάσες, G:γλυκόζη, EtOH: αιθανόλη, CF: Ταυτόχρονη ζύμωση εξοζών και πεντοζών, SSF: ταυτόχρονη σακχαροποίηση και ζύμωση, SSFC: ταυτόχρονη σακχαροποίηση και ζύμωση εξοζών και πεντοζών, CBP: ενοποιημένη διεργασία (28)

6 Μικροοργανισμοί για την παραγωγή αιθανόλης και ενδοκυτταρικού λίπους

6.1.1 Αλκοολική ζύμωση

Η αλκοολική ζύμωση είναι μία βιολογική διαδικασία κατά την οποία σάκχαρα όπως η γλύκόζη, η φρουκτόζη και η σουκρόζη, μετατρέπονται σε ενέργεια παράγοντας αιθανόλη και διοξείδιο του άνθρακα υπό αναερόβιες συνθήκες σύμφωνα με τις αντιδράσεις:

$$3C_5H_{10}O_5 \rightarrow 5C_2H_5OH + 5CO_2$$

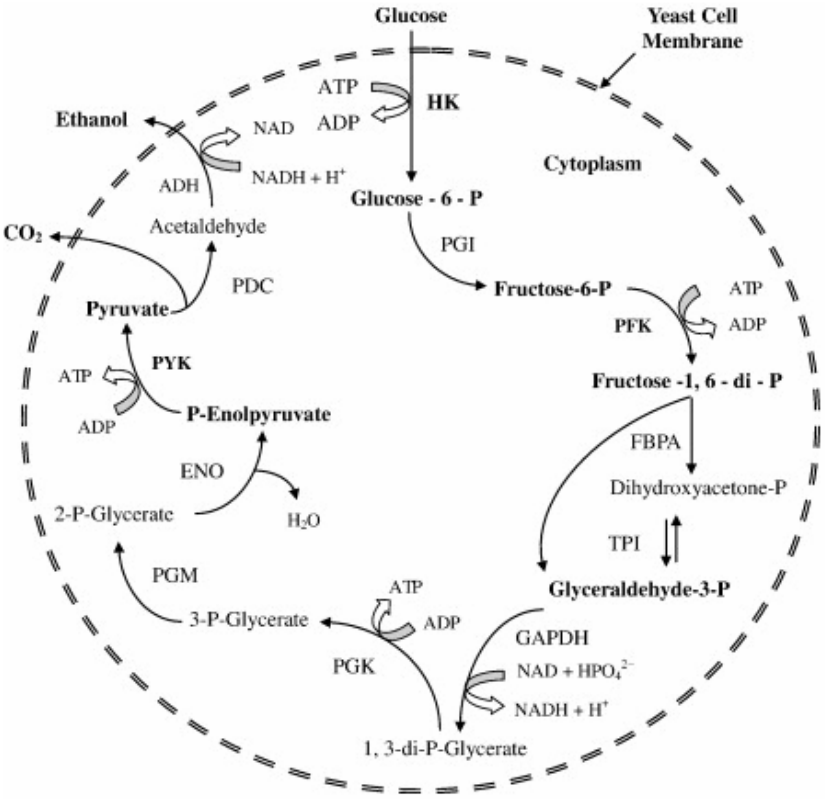
$$C_6H_{12}O_6 \rightarrow 2C_2H_5OH + 2CO_2$$

Όπως σε κάθε παρόμοια αντίδραση, η ζύμωση δεν είναι 100% επιλεκτική και η παραγωγή παραπροϊόντων είναι αναπόφευκτη. Προϊόντα όπως το οξικό οξύ, οι γλυκόλες κ.α. σχηματίζονται σε ποσότητες που απαιτούν την απομάκρυνσή τους κατά τη διαδικασία καθαρισμού του τελικού προϊόντος. Η ζύμωση λαμβάνει χώρα σε υδατικό περιβάλλον και μετά το πέρας της ζύμωσης η περιεκτικότητα σε αιθανόλη φτάνει περίπου το 15%.

Για τη μετατροπή των σακχάρων σε ενέργεια υπό αναερόβιες συνθήκες οι μικροοργανισμοί χρησιμοποιούν τρία μεταβολικά μονοπάτια: τη γλυκόλυση, το μονοπάτι των φωσφορυλιωμένων πεντοζών και το μονοπάτι Entner-Doudoroff. Η γλυκόλυση, ή αλλιώς μονοπάτι EMP, οδηγεί στη διάσπαση ενός μορίου γλυκόζης σε δύο μόρια πυροσταφιλικού οξέος. Η ενέργεια που απελευθερώνεται κατά τη διαδικασία χρησιμοποιείται για το σχηματισμό των μορίων υψηλού ενεργειακού περιεχομένου ATP και NADH. Σε αντίθεση με την αερόβια αναπνοή, όπου κύρια πηγή ενέργειας για τους μικροοργανισμούς είναι τα ATP που δημιουργούνται από την οξείδωση του πυροσταφιλικού προς CO_2 και H_2O κατά το στάδιο της αναπνοής, σε αναερόβιες συνθήκες, όπως στη ζύμωση, η κύρια πηγή ενέργειας των μικροοργανισμών είναι τα ATP που δημιουργούνται κατά τη διάρκεια της γλυκόλυσης. Το πυροσταφιλικό στη συνέχεια μετατρέπεται σε αιθανόλη και αποβάλλεται από το κύτταρο, βοηθώντας στο σχηματισμό μορίων NAD^+ που χρησιμοποιούνται για τη συνεχή εξέλιξη των αντιδράσεων της γλυκόλυσης (30). Ένα δεύτερο μεταβολικό μονοπάτι είναι αυτό των φωσφορυλιωμένων πεντοζών, το οποίο συμβαίνει παράλληλα με αυτό της γλυκόλυσης. Είναι το βασικό μεταβολικό μονοπάτι που χρησιμοποιείται από τα βακτήρια και της ζύμες για την αφομοίωση των πεντοζών. Η αναγωγάση της ξυλόζης μετατρέπει την ξυλόζη σε ξυλιτόλη, η οποία μετά μετατρέπεται σε ξυλουλόζη από την αφυδρογονάση της ξυλιτόλης και μεταβολίζεται από το μονοπάτι των φωσφορικών πεντοζών (29). Το τρίτο μεταβολικό μονοπάτι που χρησιμοποιείται για το μεταβολισμό εξοζών από κάποιους μικροοργανισμούς, πολύ λιγότερους σε σχέση με αυτούς που χρησιμοποιούν τη γλυκόλυση, είναι το Entner-Douboroff, κατά το οποίο χρησιμοποιούνται ένζυμα διαφορετικά από τα δύο προηγούμενα μονοπάτια. Ο μεταβολισμός των σακχάρων συμβαίνει μέσω του 6-φωσφογλυκονικού οξέος το οποίο διασπάται σε πυροσταφυλικό και 3-φωσφορική γλυκεραλδεϋδη η οποία μεταβολίζεται και αποδίδει και αυτή ένα ακόμα μόριο πυροσταφιλικού (30). Σε αντίθεση με τη γλυκόλυση, το

μονοπάτι ED αποδίδει μόνο ένα μόριο ATP, με αποτέλεσμα τα βακτήρια που μεταβολίζουν τη γλυκόζη μέσω αυτού του μονοπατιού να παράγουν λιγότερη κυτταρική βιομάζα και να διοχετεύουν μεγαλύτερο ποσοστό της πηγής άνθρακα προς μεταβολικά προϊόντα, όπως η αιθανόλη (8).

Τέλος, πρέπει να τονιστεί η επίδραση του οξυγόνου στη διαδικασία της ζύμωσης σε σχέση με τα μεταβολικά μονοπάτια. Η συγκέντρωση του διαλυμένου οξυγόνου έχει μεγάλη επίδραση στο ρυθμό μικροβιακής ανάπτυξης και της παραγωγής προϊόντων. Οι αερόβιες συνθήκες γενικά, ευνοούν την αερόβια αναπνόη, τη μικροβιακή ανάπτυξη και το σχηματισμό προϊόντων μέσω έντονων οξειδωτικών καταβολικών αντιδράσεων, ενώ οι αναερόβιες συνθήκες ευνοούν το σχηματισμό προϊόντων μέσω αντιδράσεων αναβολισμού, όπως συμβαίνει κατά τη διάρκεια της ζύμωσης με την παραγωγή αιθανόλης (29). Παρόλα αυτά ακόμα και σε αναερόβιες συνθήκες, μικρές συγκεντρώσεις οξυγόνου είναι απαραίτητες για άλλες λειτουργίες των μικροοργανισμών (8).



Εικόνα 5 Μεταβολικό μονοπάτι Embden-Meyerhof-Parnas (50)

6.1.2 Αιθανολοπαραγωγοί Μικροοργανισμοί

Αρκετοί είναι οι μικροοργανισμοί στη φύση, όπου υπό κατάλληλες συνθήκες μπορούν να παράξουν αιθανόλη με έναν από τους τρόπους που περιγράφηκαν παραπάνω. Για να μπορεί κάποιος μικροοργανισμός να χρησιμοποιηθεί βιομηχανικά για την παραγωγή βιοαιθανόλης πρέπει να πληρεί κάποιες προϋποθέσεις, οι κύριες εκ των οποίων είναι: οι υψηλές αποδόσεις σε αιθανόλη, η υψηλή παραγωγικότητα και η ανθεκτικότητα σε υψηλές συγκεντρώσεις αιθανόλης (31). Παρακάτω παρουσιάζονται συνοπτικά οι τέσσερις κυριότεροι μικροοργανισμοί που είτε ήδη χρησιμοποιούνται εκτενώς είτε έχουν μεγάλες προοπτικές για μελλοντική χρήση.

Saccharomyces cerevisiae

Ο *Saccharomyces cerevisiae* είναι ένας είδος ζύμης που χρησιμοποείται ευρεώς σε πολλές διαδικασίες, όπως την παραγωγή ψωμιού, μπύρας και κρασιού. Το μεγαλύτερο ποσοστό αιθανόλης που παράγεται σήμερα παγκοσμίως προέρχεται από διεργασίες ζύμωσης σακχάρων από αυτή τη ζύμη (11). Ο μικροοργανισμός αυτός μεταβολίζει εξόζες επιδεικνύοντας υψηλές αποδόσεις και μεγάλη παραγωγικότητα ταυτόχρονα με μία υψηλή ανοχή στη αιθανόλη (32). Σε αναερόβιες συνθήκες μετατρέπει 1 mol γλυκόζης σε 2 mol αιθανόλης (8). Παρόλα αυτά, δεν έχει φυσικά τη δυνατότητα αφομοίωσης της ξυλόζης, ενώ μπορεί να ζυμώσει το ισομερές της ξυλόζης ξυλουλόζη (32). Για το λόγο αυτό, έχει δοθεί έμφαση στη γενετική τροποίηση του προκείμενου να καταστεί δυνατή η ζύμωση και της ξυλόζης και να χρησιμοποιηθεί ο *S. Cerevisiae* στην παραγωγή αιθανόλης από λιγνινοκυτταρινούχα υλικά. Χρησιμοποιώντας τεχνικές μεταβολικής μηχανικής και ανασυνδυασμένου DNA, έχει επιχειρηθεί η εισαγωγή στο φυσικό γονιδίωμα του S. cerevisiae γονιδίων που είναι υπεύθυνα για το μεταβολισμό τυς ξυλόζης και τη ζύμωσή της σε αιθανόλη (32).

Zymomonas mobilis

Ο δεύτερος πιο σημαντικός αιθανολοπαραγωγός μικροοργανισμός είναι το βακτήριο *Zymomonas mobilis,* ο οποίος χρησιμοποιείται ευρύτατα στη βιομηχανία οινοπνευματώδων ποτών. Είναι το μοναδικό του είδους *Zymomonas* και έχει σημαντικές ικανότητες παραγωγής βιοαιθανόλης. Χρησιμοποιεί το μεταβολικό μονοπάτι Entner-Douboroff μετατρέποντας το πυροσταφιλικό οξύ σε αιθανόλη και διοξείδιο του άνθρακα. Μερικά από τα πλεονεκτήματά του είναι: η υψηλή απόδοση σε αιθανόλη, η χαμηλή παραγωγή κυτταρικής βιομάζας, η υψηλότερη σε σχέση με τον *Saccharomyces cerevisiae* ανοχή στην αιθανόλη, η δυνατότητα ζύμωσης σε ανοξικές συνθήκες και η ευκολία σε γενετικές τροποιήσεις (33). Ο μικροοργανισμός δεν έχει τη δυνατότητα ζύμωσης πεντοζών, για αυτό όπως και στον *Saccharomyces cerevisiae* έχουν εφαρμοστεί στρατηγικές εισαγωγής γινιδίων που ευθύνονται για τη ζύμωση της ξυλόζης (33).

Escherichia coli

Ο *Escherichia coli* έχει τη φυσική δυνατότητα να καταναλώνει ένα μεγάλο εύρος υποστρωμάτων, μετατρέποντας εξόζες, πεντόζες και ουρονικά οξέα στο κεντρικό μεταβολίτη, το πυροσταφιλικό οξύ. Αυτός ο μεταβολίτης μετατρέπεται σε ένα μίγμα αποτελούμενο από σχεδόν ίσα μέρη αιθανόλης, οξικού, γαλακτικού και φορμικού οξέος. Κατά κανόνα οι ζυμώσεις γίνονται σε pH 7 και θερμοκρασίες 30-35°C (8). Η παρουσία οργανικών οξέων, όπως είναι το οξικό και το γαλακτικό οξύ, στο τελικό ζυμωτικό υλικό ταυτόχρονα με την αιθανόλη, κάνει τη χρησιμοποιήση του συγκεκριμένου μικροοργανισμού μία μη ελκυστική επιλογή για την παραγωγή αιθανόλης. Επιπλέον, οι αποδόσεις παραγωγής αιθανόλης είναι χαμηλότερες από 0.2g ανά g σακχάρων, απόδοση που θεωρείται αρκετα χαμηλή (8).

Pichia stipitis

Το ενδιαφέρον για τη ζύμη αυτή ξεκίνησε λόγω της ικανότητας του μικροοργανισμού να μεταβολίζει φυσικά εκτός από τη γλυκόζη και την ξυλόζη. Το μειονέκτημα της διεργασίας παραγωγής αιθανόλης από την *Pichia stipitis* είναι ότι παρεμποδίζεται από τις ουσίες που

σχηματίζονται κατά τη διάρκεια της προκατεργασίας και της υδρόλυσης των λιγνινοκυτταρινούχων υλικών, καθώς και το γεγονός ότι για τον συμμεταβολισμό της γλυκόζης και της ξυλόζης απαιτούνται μικροαερόβιες συνθήκες. Η στρατηγική που ακολουθήθηκε ήταν η εισαγωγή του γονιδίου URA1 από τον *S. cerevisiae.* Έτσι, η ανασυνδυασμένη ζύμη μπόρεσε να αναπτυχθεί αερόβια μεταβολίζοντας τη γλυκόζη και την ξυλόζη (8).

6.1.3 Αναστολείς της αλκοολικής ζύμωσης

Η παραγωγή αιθανόλης από βιομάζα έχει αποδειχτεί μία δύσκολη διαδικασία σε πολλά επίπεδα. Λόγω του γεγονότος ότι η βιομάζα δύσκολα προσβάλεται από ένζυμα και μικροοργανισμούς χρειάζονται ένα στάδιο προκατεργασίας και ένα υδρόλυσης, όπως εξηγήθηκε παραπάνω. Δυστυχώς όμως κατά τη διάρκεια των δύο αυτών σταδίων σχηματίζονται αναστολείς της μικροβιακής ανάπτυξης που επηρεάζουν σε μεγάλο βαθμό τη διαδικασία της ζύμωσης. Υπάρχουν τέσσερις κύριες ομάδες ενώσεων που παρεμποδίζουν τη ζύμωση (34) (35):

- Φουρφουράλη και 5-υδροξυμεθυλοφουρφουράλη. Προκύπτουν από την καταστροφή εξοζών και πεντοζών, όταν οι συνθήκες προκατεργασίας είναι πολύ έντονες. Προκαλούν μία παρατεταμένη φάση υστέρησης τόσο κατά την αερόβια όσο και κατά την αναερόβια μικροβιακή ανάπτυξη και επηρεάζουν αρνητικά την παραγωγή αιθανόλης
- Ασθενή οξέα. Προκύπτουν από την απο-ακετυλίωση της ημικυτταρίνης ή από την αποικοδόμηση σακχάρων και λιγνίνης κατά τη διάρκεια της προκατεργασίας. Επιδρούν αρνητικά στα κύτταρα, καθώς μειώνουν σημαντικά το εσωκυτταρικό pH, μειώνουν την ικανότητα των μικροοργανισμών να παράξουν αρκετά μόρια ATP και αποτρέπουν τη δημιουργία ενζύμων που χρησιμοποιούνται για το μεταβολισμό σακχάρων.
- Φαινολικές ενώσεις. Είναι συστατικές ενώσεις της λιγνίνης. Με την προκατεργασία της βιομάζας απελευθερώνονται και ενσωματώνονται στο

εσωτερικό των κυττάρων επηρεάζοντας τη δομική τους ακεραίοτητα και το εσωκυτταρικό pH με τρόπο παρόμοιο με τα ασθενή οξέα.

- Άλλες ενώσεις. Υψηλές συγκεντρώσεις σακχάρων και αλάτων προκαλούν ισχυρές οσμωτικές πιέσεις στα κύτταρα, με αποτέλεσμα να υπάρχει μία παρατεταμένη φάση υστέρησης κατά τα πρώτα στάδια της ζύμωσης. Η αιθανόλη είναι αναστολέας της μικροβιακής ανάπτυξης καθώς σε υψηλές συγκεντρώσεις επηρεάζει τη δομή της κυτταρικής μεμβράνης.

6.2.1 Έλαια από μονοκύτταρους μικροοργανισμούς

Η παραγωγή ελαίων από μονοκύτταρους μικροοργανισμούς (Single Cell Oils, SCOs) έχει προκαλέσει τελευταία το βιομηχανικό ενδιαφέρον, επειδή μπορεί να χρησιμοποιηθεί ως εναλλακτική των γεωργικών και ζωϊκών πηγών ελαίων και λιπών. Η παραγωγή και η συσσώρευση ενδοκυτταρικού λίπους προκαλείται, όταν ένα θρεπτικό συστατικό του μέσου ανάπτυξης περιορίζεται, ενώ η πηγή άνθρακα βρίσκεται σε περίσσεια (36). Όταν ένα θρεπτικό συστατικό εξαντλείται, ο άνθρακας εξακολουθεί να απορροφάται από τα κύτταρα και αποθηκεύεται υπό τη μορφή λίπους. Η διαδικασία μπορεί να προκληθεί από την έλλειψη διάφορων θρεπτικών συστατικών, όπως π.χ. φώσφορος, ψευδάργυρος, σίδηρος και άλλα ιχνοστοιχεία, είναι πολύ πιο έντονη όταν περιορίζεται σημαντικά η πηγή αζώτου στο θρεπτικό μέσο (37). Είναι σημαντικό να τονιστεί ότι η συσσώρευση τριγλυκεριδίων ως ενεργειακό απόθεμα είναι συνήθης σε όλους τους ευκαριωτικούς οργανισμούς όπως μύκητες, φυτά και ζώα, ενώ εμφανίζεται σπάνια και σε βακτήρια. Παρόλα αυτά, δεν συσσωρεύουν όλοι οι μικροοργανισμοί το ίδιο ποσοστό ενδοκυτταρικού λίπους. Για παράδειγμα η ζύμη *S. cerevisiae* μπορεί αποθηκεύσει ενδοκυτταρικά λίπος ίσο με το 10-12% της ξηρής βιομάζας της (38). Για το λόγο αυτό, ως ελαιογόνοι μικροοργανισμοί ονομάζονται αυτοί που μπορούν να συσσωρεύσουν εντός των κυττάρων τους λίπος που να αντιστοιχεί σε ποσοστό μεγαλύτερο από το 20% κατά βάρος επί ξηράς ουσίας.

Κατά τη φάση της ανάπτυξης το άζωτο είναι απαραίτητο για την παραγωγή νουκλεϊκών οξέων και πρωτεϊνών για το στάδιο της αναπαραγωγής των μικροοργανισμων. Λόγω έλλειψης

όμως αζώτου, τα κύτταρα απορροφούν άνθρακα χωρίς να μπορούν να τον μετατρέψουν σε νέα κύτταρα. Η μη ελαιογόνοι μικροοργανισμοί μετατρέπουν την περίσσεια άνθρακα σε πολυσακχαρίτες τους οποίους και αποθηκεύουν για μελλοντική χρήση, ενώ οι ελαιογόνοι συντονίζονται προς τη σύνθεση λιπιδίων και συσσωρεύουν τριγλυκερίδια σε ενδοκυτταρικά λιπαρά σώματα (36). Συνεπώς το ερώτημα είναι, ποιά είναι η βασική βιοχημική διαφορά μεταξύ των ελαιογόνων και των μη ελαιογόνων μικροοργανισμών; Για καιρό είχαν υπάρξει διάφορες θεωρίες, αλλά τελικά αποδείχτηκε ότι στους ελαιογόνους μικροοργανισμούς υπάρχει το ένζυμο ATP κιτρικής λυάσης, ενώ στους μη ελαιογενείς δεν υπάρχει. Πιο συγκεκριμένα, σε συνθήκες έλλειψης αζώτου στους ελαιογόνους μικροοργανισμούς ενεργοποιείται η AMP απαμινάση προκαλώντας την ταχεία πτώση της συγκέντρωσης του ενζύμου στο κύτταρο, με αποτέλεσμα την μείωση της δραστικότητας της ισοκιτρικής αφυδρογονάσης. Για το λόγο αυτό εμποδίζεται ο κύκλος του τρικαρβοξυλικού οξέος και εμφανίζεται περίσσεια κιτρικού οξέος. Η περίσσεια αυτή κιτρικού διασπάται από την κυτοσολική ATP κιτρική λυάση σε ακετυλο-CoA και οξαλικό οξύ, τα οποία στη συνέχεια εστερεποιούνται προς σχηματισμών τριγλυκεριδίων (36) (37).

Υπάρχουν πολλά είδη ευκαρυωτικών και προκαρυωτικών μικροοργανισμών που μπορούν επιτυχώς να συσσωρεύσουν ενδοκυτταρικό λίπος. Μία από αυτές είναι τα μικροφύκη. Τα επίπεδα του παραγώμενου ενδοκυτταρικού λίπους στα μικροφύκη κυμαίνονται από 20-50% του βάρους της ξηρής βιομάζας τους, ενώ κάποιες φορές μπορεί να φτάσει και το 80% (8). Σε αντίθεση με τις κλασσικές καλλιέργειες, τα μικροφύκη αυξάνονται ταχύτατα διπλασιάζοντας τη μάζα τους κάθε εικοσιτέσσερις ώρες (8).

Τα βακτήρια παρουσιάζουν και αυτά περιορισμένες δυνατότητες συσσώρευσης λίπους. Ο μέσος όρος περιεκτικότητας του ελαίου σε βακτήρια είναι περίπου 20-40% της ξηρής βιομάζας τους. Πολλά υποσχόμενα στο συγκεκριμένο τομέα είναι τα βακτήρια της ομάδας του ακτινομύκητα, καθώς είναι ικανά να συνθέτουν ιδιαίτερα υψηλά ποσοστά λιπαρών οξέων, περίπου στο 70% της ξηρής βιομάζας τους (44). Παρόλα αυτά, δεν προσφέρονται ιδιαίτερα για την παραγωγή και αξιοποίηση ενδοκυτταρικού λίπους, γιατί είναι λίγα τα στελέχη που έχουν τέτοιες δυνατότητες και ταυτόχρονα είναι πολύ δύσκολη η εκχύλιση των λιπιδίων ή σχετίζεται με αλλεργικούς και τοξικούς παράγοντες (39).

Οι ζύμες και οι μύκητες θεωρούνται ως ιδανικοί ελαιογόνοι μικροοργανισμοί. Μερικά στελέχη ζύμης και μυκήτων μπορούν να συσσωρεύσουν λιπίδια μέχρι και σε ποσοστό 70% της ξηρής βιομάζας τους (36). Μία από τις πιο αποτελεσματικές για την παραγωγή ενδοκυτταρικού λίπους είναι η ζύμη *Cryptococcus curvatus* που μπορεί να συσσωρεύει λιπίδια σε ποσοστό μεγαλύτερο του 60% της ξηρής βιομάζας της ενώ αναπτύσσεται κάτω υπό συνθήκες έλλειψης αζώτου (39).

6.2.2 Ο μύκητας *Fusarium Oxysporum*

Το στέλεχος *Fusarium oxysporum* είνα ένας είδος μύκητα που απομονώθηκε από το κύμινο και παράγει ένα ευρύ φάσμα κυτταρινασών και ημικυτταρινασών σε βυθισμένες καλλιέργειες αφομοιώνοντας τόσο εξόζες όσο και πεντόζες (69). Έχει την ιδιότητα να μετατρέπει κατευθείαν την κυτταρίνη και την ξυλάνη σε αιθανόλη, συνεπώς είναι ιδανικός υποψήφιος για την απευθείας χρήση σε διεργασίες παραγωγής αιθανόλης από λιγνονοκυτταρινούχα υλικά, καθώς μπορεί να παράξει όλα τα απαραίτητα ένζυμα υδρόλυσης της βιομάζας. Διάφοροι φυσικοί παράγοντες όπως το pH, η θερμοκρασία και οι συνθήκες αερισμού επηρεάζουν σημαντικά την παραγωγή αιθανόλης από τον *F. oxysporum.* Η μέγιστη συγκέντρωση αιθανόλης έχει παρατηρηθεί για τιμές pH 5.5-6.0 σε, ενώ βέλτιστη θερμοκρασία για την παραγωγή ενζύμων και για την παραγωγή αιθανόλης οι 30°C. Το pH για την αναερόβια καλλιέργεια είναι επίσης το βέλτιστο για την ενεργότητα της β-γλυκοζιδάσης που είναι και το ένζυμο κλειδί για την άμεση μετατροπή της κυτταρίνης από τον *F. Oxysporum*. Μειονεκτήματα του συγκέκριμένου μικροοργανισμού στην παραγωγή αιθανόλης είναι ο χαμηλός ρυθμός μετατροπής του υποστρώματος, ο χαμηλός ρυθμός διάσπασης της κυτταρίνης και ο σχηματισμός σημαντικών ποσοτήτων οξικού οξέος σαν παραπροϊόν (69) (70).

6.2.3 Η ζύμη *Trichosporon fermentans*

Ο μικροοργανισμός *Trichosporon fermentans*, είναι ένα είδος ελαιογόνου ζύμης που ανήκει στην οικογένεια *Ctyrptococcus*, πράγμα που σημαίνει ότι έχει την ικανότητα συσσώρευσης ενδοκυτταρικού λίπους σε ποσοστό περίπου 57% της επί ξηρού βιομάζας του (46). Αρχικά, μελετήθηκε η ικανότητα του για παραγωγή λιπασών και διαπιστώθηκε ότι χρησιμοποιώντας ως πρώτη ύλη ελαιόλαδο έχει πολύ μεγάλες δυνατότητες στο συγκεκριμένο τομέα (49). Λόγω του πρόσφατου ενδιαφέροντος που έχει αναπτυχθεί για τεχνολογίες παραγωγής λιπιδίων από μονοκύτταρους μικροοργανισμούς (SCO) έχει μελετηθεί η ικανότητα του *T. fermentans* για την παραγωγή SCOs από διάφορες πηγές βιομάζας, όπως το άχυρο ρυζιού (47) και η γλυκοπατάτα (48) δείχνοντας καλή παραγωγή ενδοκυτταρικού λίπους από τις περισσότερες υδρολυμένες πηγές βιομάζας. Αυτό συμβαίνει γιατί ο *T. fermentans* έχει ένα ευρύ φάσμα πηγών άνθρακα που μπορεί να καταναλώσει, καθώς αφομειώνει τόσο εξόζες όσο και πεντόζες για την παραγωγή ενδοκυτταρικού λίπους (46) (48). Το παραγόμενο ενδοκυτταρικό λίπος είναι παρόμοιο με τα φυτικά έλαια καθώς περιέχει παλμιτικό, στεαρικό, ολεϊκό και λινολεϊκό οξύ, ενώ τα ακόρεστα λιπάρα αντιστοιχούν στο 64% της συνολικής σύστασής του (46). Τέλος, οι βέλτιστες συνθήκες αερόβιας ανάπτυξης του είναι pH 6-6.5, θερμοκρασία 25°C ενώ οργανικές πηγές αζώτου, όπως η πεπτόνη, φαίνεται να προάγουν ιδιαίτερα την κυτταρική ανάπτυξη σε σχέση με ανόργανες πηγές (48). Ωστόσο, παρότι η παραγωγή λίπους από τον *T. fermentans* είναι μία, λίγο έως πολύ, καλά μελετημένη διαδικασία, λίγα είναι γνωστά για τη συμπεριφορά του μικροοργανισμού σε αναερόβιο περιβάλλον με ισορροπημένο σε άνθρακα και άζωτο μέσο καλλιέργειας. Η συμπεριφορά αυτή καθώς και οι δυνατότητες του μικροοργανισμού για ζύμωση και παραγωγή αιθανόλης είναι τα αντικείμενα μελέτης της παρούσας διπλωματικής εργασίας.

ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ

7 ΜΕΘΟΔΟΙ ΚΑΙ ΥΛΙΚΑ

7.1 Μικροοργανισμοί

Στην παρούσα διπλωματική εργασία χρησιμοποιήθηκαν δύο μικροοργανισμοί, ο *Trichosporon fermentans* CBS 439,83 και ο *Fusarium oxysporum* F3. Ο πρώτος αποκτείθηκε από το CBS-KNAW Fungal Biodioveristy Center της Ουτρέχτης στην Ολλανδία, ενώ ο δεύτερος απομονώθηκε από τα κύμινο (51). Η διατήρηση των μικροοργανισμών γινόταν σε δοκιμαστικούς σωλήνες των 20 mL, πληρωμένους με 7 mL θρεπτικού μέσου σε επικλινή μορφή στους 4°C. Το θρεπτικό μέσω που χρησιμοποιήθηκε για τον *Trichosporon fermentans* ήταν : 20 g/L γλυκόζη, 10 g/L πεπτόνη, 10 g/L yeast extract, 6 g/L KH_2PO_4, 2 g/L Na_2HPO_4 και 20 g/L άγαρ (52), ενώ για τον *Fusarium oxysporum* χρησιμοποιήθηκε θρεπτικό υλικό από άγαρ με εκχύλισμα πατάτας (PDA, 3.9% β/ο) (53).

7.2 Πρώτες ύλες και χημικά αντιδραστήρια

Τα χημικά αντιδραστήρια που χρησιμοποιήθηκαν ήταν αναλυτικής καθαρότητας και προήλθαν από τις εταιρίες Sigma (ΗΠΑ), Merck (Γερμανία), Fluka (Ελβετία) και Panreac Quimica S.A.U (Ισπανία). Τα διαλύματα που χρησιμοποιήθηκαν στην υγρή χρωματογραφία υψηλής πίεσης ήταν αντίστοιχης αναλυτικής καθαρότητας. Το πειραματικό σκεύασμα Thermomix παραχωρήθηκε από το Τεχνολογικό Πανεπιστήμιο του Ελσίνκι. Περιέχει ενεργότητες ενζύμων Κελλοβιοϋδρολάση At CBHI/Cel17A, Κελλοβιοϋδρολάση Ct CBHII/Ce16A, Ενδογλουκανάση Ta EGII/Cel15A και Ξυλανάση Ta XYL/Xyn10A.

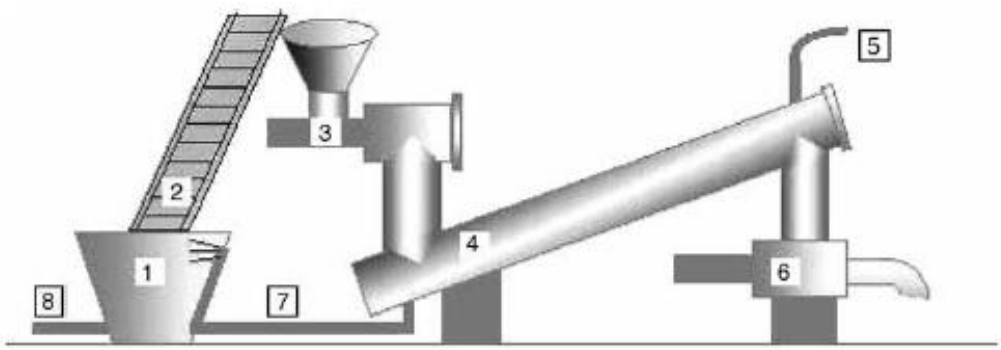
7.3 Όργανα και συσκευές

- Φωτόμετρο (Hitachi UV 200)
- pH-μετρο 537 (WTW, Γερμανία)
- Ηλεκτρονικοί ζυγοί ακριβείας
- Αυτόκλειστο (Sanyo, Μ. Βρετανία)
- Θερμοστατούμενοι περιστροφικοί επωαστήρες ZHWY-211C (Zhicheng, Κίνα)
- Συσκευές φυγοκέντρησης Bechman Coulter
- Σύστημα χρωματογραφίας υψηλής πίεσης Shimadzu LC-20AD (Ιαπωνία) εξοπλισμένο με στήλη διαχωρισμού AMINEX HPX-87H (Bio-rad, 300x78 mm, partivle size 9mm) και ανιχνευτή διάθλασης Shimadzu RID 10A (Ιαπωνία)

7.4 Υδροθερμικά προκατεργασμένο άχυρο σίτου

Η προκατεργασία του αχύρου που χρησιμοποιήθηκε πραγματοποιήθηκε στην πιλοτική μονάδα IBUS στη μονάδα που φαίνεται στην Εικόνα 6. Η προκατεργασία βασίζεται στη χρήση νερού και ατμού, χωρίς τη χρήση πρόσθετων χημικών ενώσεων, οι οποίες μετά θα έπρεπε να ανακτηθούν, να καθαριστούν και να ξαναχρησιμοποιηθούν. Το άχυρο αρχικά κόπηκε σε κομμάτια των 5-10 εκατοστών και τροφοδοτήθηκε σε δοχείο, όπου διαβρέχτηκε με νερό θερμοκρασίας 80° C για χρόνο έως και 30 λεπτά. Στη συνέχεια οδηγήθηκε με ειδικά σχεδιασμένη αντλία στον αντιδραστήρα, ο οποίος ήταν ειδικά σχεδιασμένος για να αντέχει σε υψηλές πιέσεις και θερμοκρασίες. Εκεί, το άχυρο θερμάνηθκε με νερό κατά αντιρροή σε θερμοκρασία 185°C και για χρόνο 19 λεπτά. Η προκατεργασμένη βιομάζα εξήλθε του αντιδραστήρα με μία δεύτερη αντλία σωματιδίων και μεταφέρθηκε στο σύστημα έκπλυσης και συμπίεσης. Κανονικά, μετά την έκπλυση και την απομάκρυνση της υγρής φάσης το στερεό κλάσμα συμπιέζεται σε συγκέντρωση στερεών 30 – 40% (64). Το αποτέλεσμα της διεργασίας είναι ένα υγρό κλάσμα, το οποίο περιέχει τη διαλυτοποιημένη ημικυτταρίνη, μικρομοριακές ενώσεις, ολιγοσακχαρίτες και το μεγαλύτερο μέρος των παραγόμενων παρεμποδιστών, και ένα στερεό κλάσμα, το οποίο περιέχει το μεγαλύτερο μέρος της κυτταρίνης (πάνω από 90%)

και ένα μέρος της λιγνίνης (64). Ωστόσο, κατά την προκατεργασία του άχυρου σίτου που χρησιμοποιήθηκε σε αυτή τη διπλωματική δεν έγινε διαχωρισμός υγρού και στερεού κλάσματος. Η τελική σύσταση του μίγματος ήταν (% ξηρή βάση) 39 ± 1.5 και 22.0 ± ημικυτταρίνη, 28.2 ± 1.8 λιγνίνη και 8.0 ± 1.5 τέφρα. Στο υλικό μετρήθηκαν επίσης (g/L): 4 ± 0.3 οξικό οξύ, 0.1 ± 0.04 υδρόξυ-μέθυλο-φουρφουράλη και 0.4 ± 0.1 φαινόλες



1. Είσοδος βιομάζας και δοχείο διαβροχής με ζεστό νερό που ανακυκλώνεται από τον αντιδραστήρα
2. Ταινιόδρομος με βάση που απομακρύνει το νερό
3. Αντλία No.1 για εισαγωγή της βιομάζας στον αντιδραστήρα
4. Ζώνη αντίδρασης με σύστημα διπλού κοχλιόδρομου
5. Είσοδος νερού στον αντιδραστήρα
6. Αντλία No.2 για εξαγωγή της βιομάζας από τον αντιδραστήρα
7. Σύστημα ανακύκλωσης για το νερό της διεργασίας
8. Αποχέτευση

Εικόνα 6. Πιλοτική μονάδα προκατεργασίας IBUS (64)

7.5 Προκαλλιέργεια της ζύμης *Trichosporon fermentans*

Πριν τη ζύμωση, η ζύμη αναπτύχθηκε σε προκαλλιέργεια. Σε φιάλες των 250 mL (Erlenmeyer flasks) ζυγίζονταν 2 g γλυκόζη (2% β/ο) για χρήση ως πηγή άνθρακα. και θρεπτικό μέσο σύστασης: 10 g/L yeast extract, 10 g/L πεπτόνη, 6 g/L KH_2PO_4 και 2 g/L Na_2PO_4 και ρυθμιζόταν το pH στο 6.5. Η πηγή άνθρακα και το μέσο καλλιέργειας αποστειρώνονταν ξεχωριστά σε θερμοκρασία 120°C για 15 λεπτά. Έπειτα, υπό ασυπτικές συνθήκες, στις κωνικές φιάλες των 250 mL παρασκευαζόταν θρεπτικό μέσο με πηγή άνθρακα, ενεργού όγκου 100 mL και οι δύο φιάλες εμβολιάζονταν με έναν βρόχο ζύμης η κάθεμια. Οι προκαλλιέργειες επωάζονταν υπό ανάδευση (200 rpm) για 24 ώρες στους 30°C.

7.6 Προκαλλιέργεια και παραγωγή κυτταρικής βιομάζας του μύκητα *Fusarium oxysporum*

Για την παρασκευή του εμβολίου σε κάθε δοκιμαστικό σωλήνα αποθεματικής καλλιέργειας του μύκητα προστείθεντο 15 mL αποστειρωμένου απιονισμένου νερού και χρησιμοποιούνταν 5 mL εναιωρήματος ανά φιάλη για τον εμβολιασμό, υπό ασυπτικές συνθήκες, κωνικών φιαλών (Erlenmeyer flasks) όγκου 250 mL και ενεργού όγκου 100 mL. Οι καλλιέργειες περιείχαν το ακόλουθο θρεπτικό μέσο: 1 g/L KH_2PO_4, 0.30 g/L $CaCl_2.2H_2O$, 0.30 g/L $MgSO_4.7H_2O$, 10 g/L $(NH_4)_2PO_4$, 6.94 g/L $NaH_2PO_4.2H_2O$, 9.52 g/L $Na_2HPO_4.2H_2O$. Ως πηγή άνθρακα χρησιμοποιήθηκε γλυκόζη 2% β/ο αποστειρωμένη ξεχωριστά στους 120^oC για 15 λεπτά. Πριν τον εμβολιασμό, το pH ρυθμιζόταν στο 6.0. Οι προκαλλιέργειες επωάζονταν υπό ανάδευση (200 rpm) στους 30^oC για 24 ώρες.

Στη συνέχεια, παράχθηκε και αποστειρώθηκε θρεπτικό μέσο, όπως περιγράφηκε παραπάνω, και μεταφέρθηκαν 5 mL της προκαλλιέργειας (5% εμβόλιο) στο καινούριο αυτό μέσο προκειμένου να δημουργηθεί νέα καλλιέργεια και να ενισχυθεί η κυτταρική βιομάζα του μύκητα. Η αερόβια καλλιέργεια επωαζόταν υπό ανάδευση (200 rpm) στους 30^oC για 48 ώρες.

7.7 Επιλογή πηγής αζώτου για τη μικροβιακή ανάπτυξη του *T. fermentans* και την παραγωγή αιθανόλης σε βυθμισμένες καλλιέργειες.

Για την επίδραση της πηγής αζώτου πραγματοποιήθηκαν δύο πειράματα. Στο πρώτο πείραμα πραγματοποιήθηκαν αερόβιες καλλιέργειες σε μέσο: 7 g/L KH_2PO_4, 2.5 g/L $Na_2HPO_4.2H_2O$, 1.5 g/L $MgSO_4.7H_2O$, 0.13 g/L $FeCL_3.4H_2O$, 0.15 g/L $CaCl_2.2H_2O$, 0.02 g/L $ZnSO_4.7H_2O$, 0.06 g/L $MnSO_4.H_2O$ και 100 g/L γλυκόζη με διαφορετικές πηγές αζώτου σε διαφορετικές συγκεντρώσεις και το pH ρυθμιστήκε στο 6.5. Πιο συγκεκριμένα, εξετάστηκαν ως πηγές αζώτου το φωσφορικό αμμώνιο (ανόργανο άζωτο) και το yeast extract (οργανικό άζωτο) σε συγκεντρώσεις 3 g/L και 5 g/L. Αφού το θρεπτικό μέσο αποστειρώθηκε για 15 λεπτά στους 120^oC, οι καλλιέργειες εμβολιαστήκαν με 5% εμβόλιο προερχόμενο από προκαλλιέργεια και έπειτα τοποθετήθηκαν στον επωαστήρα υπό ανάδευση (200 rpm) και θερμοκρασία 30^oC για πέντε μέρες.

Στο δεύτερο πείραμα πραγματοποιήθηκαν αναερόβιες καλλιέργειες στο ίδιο μέσο που περιγράφηκε παραπάνω με το pH να ρυθμίζεται στο 6.5 χρησιμοποιώντας τόσο γλυκόζη (10% β/ο) όσο και ξυλόζη (10% β/ο), για να διερευνηθεί η επίδραση της πηγής αζώτου στην παραγωγή αιθανόλης. Ως πηγές αζώτου χρησιμοποιήθηκαν 3 g/L yeast extract και 3 g/L πεπτόνη κρέατος, 5 g/L yeast extract και 5 g/L πεπτόνη κρέατος, 3 g/L $(NH_4)_2PO_4$ και τέλος 5 g/L $(NH_4)_2PO_4$. Αφού το θρεπτικό μέσο αποστειρώθηκε για 40 λεπτά στους 109^oC, οι καλλιέργειες εμβολιαστήκαν με 5% εμβόλιο προερχόμενο από προκαλλιέργεια και έπειτα τοποθετήθηκαν σε επωαστήρα υπό ανάδευση (80 rpm) σε θερμοκρασία 30^oC και μικροαερόβιες συνθήκες για 5 ημέρες, με λήψη δειγμάτων ανά 24 ώρες. Ο ενεργός όγκος όλων των καλλιεργειών ήταν 100 mL προκειμένου να υπάρχουν κατάλληλες μικροαερόβιες συνθήκες.

7.8 Επίδραση του pH στην παραγωγή αιθανόλης από τον *T. fermentans*

Για την εξακρίβωση του καταλληλότερου pH για την παραγωγή αιθανόλης από τον *T. fermentans* έγινε εμβολιασμός με 5% εμβόλιο από προετοιμασμένη προκαλλιέργεια σε μέσο : 7 g/L KH_2PO_4, 2.5 g/L $Na_2HPO_4.2H_2O$, 1.5 g/L $MgSO_4.7H_2O$, 0.13 g/L $FeCL_3.4H_2O$, 0.15 g/L $CaCl_2.2H_2O$, 0.02 g/L $ZnSO_4.7H_2O$, 0.06 g/L $MnSO_4.H_2O$, 5 g/L yeast extract και 5 g/L πεπτόνη κρέατος με πηγή άνθρακα 100 g/L γλυκόζη που προηγουμένως είχε αποστειρωθεί. Αφού το θρεπτικό μέσο αποστειρώθηκε για 15 λεπτά στους 120^oC, με το pH να ρυθμίζεται στο 4, 5 ,6, 7 και 8, ακολούθησε ζύμωση των καλλιεργειών με διαφορετικό pH υπο μικροαερόβιες συνθήκες σε επωαστήρα υπό ανάδευση (80 rpm) σε θερμοκρασία 30^oC για 5 μέρες. Ο ενεργός όγκος όλων των καλλιεργειών ήταν 100 mL προκειμένου να υπάρχουν κατάλληλες μικροαερόβιες συνθήκες.

7.9 Επίδραση της αρχικής συγκέντρωσης της γλυκόζης στην παραγωγή αιθανόλης από τον *T. fermentans.*

Για την επίδραση της αρχικής συγκέντρωσης καθαρής πηγής άνθρακα στην παραγωγή αιθανόλης από τον μικροοργανισμό πραγματοποιήθηκαν, εις διπλούν, πειράματα σε πέντε διαφορετικές συγκεντρώσεις. Παρασκευάστηκαν καλλιέργειες με τον τρόπο που περιγράφτηκε

στην προηγούμενη παράγραφο, με πηγή άνθρακα γλυκόζη σε συγκεντρώσεις 25, 50, 100, 200 και 300 g/L και με το pH να ρυθμίζεται στο 6.0. Το θρεπτικό μέσο αποστειρώθηκε για 15 λεπτά στους 120°C και ακολούθησε ζύμωση των καλλιεργειών υπό μικροαερόβιες συνθήκες σε επωαστήρα υπό ανάδευση (80 rpm) και θερμοκρασία 30°C για 6 μέρες. Ο ενεργός όγκος όλων των καλλιεργειών ήταν 100 mL προκειμένου να υπάρχουν κατάλληλες μικροαερόβιες συνθήκες.

7.10 Παραγωγή αιθανόλης από αναερόβιες βυθισμένες καλλιέργειες του *T. fermentans* παρουσία αιθανόλης

Τα πειράματα παραγωγής αιθανόλης υπό την επίδραση αιθανόλης πραγματοποιήθηκαν σε αναερόβιες βυθισμένες καλλιέργειες σε κωνικές φιάλες των 250 mL (Erlenmeyer flasks), με το θρεπτικό μέσο που έχει αναφερθεί παραπάνω και 50 g/L γλυκόζη ως πηγή άνθρακα. Το θρεπτικό μέσο αποστειρώθηκε για 15 λεπτά στους 120°C. Οι αρχικές συγκεντρώσεις αιθανόλης που εξετάστηκαν ήταν 1%, 3%, 5%, 7% και 9%. Πριν τον εμβολιασμό, προστέθηκε ασυπτικά στις καλλιέργειες αιθανόλη στις προαναφερόμενες συγκεντρώσεις, στη συνέχεια έγινε εμβολιασμός με 5% εμβόλιο από αναπτυγμένη προκαλλιέργεια και ακολούθησε ζύμωση των καλλιεργειών υπό μικροαερόβιες συνθήκες σε επωαστήρα υπό ανάδευση (80 rpm) και θερμοκρασία 30°C για 4 μέρες. Το pH του μέσου ρυθμίστηκε όπου χρειάστηκε στη τιμή 6.0. Ο ενεργός όγκος όλων των καλλιεργειών ήταν 100 mL προκειμένου να υπάρχουν κατάλληλες μικροαερόβιες συνθήκες.

7.11 Παραγωγή αιθανόλης από αναερόβιες βυθισμένες καλλιέργειες του *T. fermentans* με χρήση διαφορετικών υποστρωμάτων.

Εξετάστηκε η ικανότητα αφοιμείωσης υποστρωμάτων πέραν τη γλυκόζης σε σχέση με την παραγωγή αιθανόλης. Οι πηγές άνθρακα που εξετάστηκαν ήταν η αραβινόζη, η λακτόζη, η φρουκτόζη και η ξυλόζη σε συγκεντρώσεις 25 g/L. Θρεπτικό μέσο που περιγράφηκε παραπάνω, τοποθετήθηκε σε κωνικές φιάλες των 250 mL (Erlenmeyer flasks) που περιείχαν την πηγή άνθρακα και είχαν πρηγουμένως αποστειρωθεϊ για 40 λεπτά στους 109°C σε τελικό ενεργό όγκο 100 mL. Στη συνέχεια οι καλλιέργειες εμβολιάστηκαν με 5 mL προκαλλιέργειας

που είχε αναπτυχθεί το προηγούμενο εικοσιτετράωρο και ακολούθησε ακολούθησε ζύμωση των καλλιεργειών υπό μικροαερόβιες συνθήκες σε επωαστήρα υπό ανάδευση ανάδευση (80 rpm) και θερμοκρασία 30°C για 4 μέρες. Ο ενεργός όγκος όλων των καλλιεργειών ήταν 100 mL προκειμένου να υπάρχουν κατάλληλες μικροαερόβιες συνθήκες

7.12 Ρευστοποίηση άχυρου σίτου και συγκαλλιέργεια *Trichosporon fermemtans* και *Fusarium oxysporum* στο ρευστοποιημένο άχυρο σίτου για την παραγωγή αιθανόλης.

Η συγκαλλιέργεια των *T. fermentans* και *F. oxysporum* πραγματοποιήθηκε σε προϋδρολυμένο πλούσιο σε ημικυτταρίνη άχυρο σίτου (High Hemicellulose Pretreated Wheat Straw, HHPWS) 23% ξηρής μάζας του αχύρου. Μετά την προκατεργασία του υλικού, η οποία περιγράφεται αναλυτικά σε προηγούμενο κεφάλαιο, δεν έγινε έκπλυση και διαχωρισμός της υγρής από τη στερεή φάση, αλλά οι δύο φάσεις διατηρήθηκαν σε μίγμα. Για τη ρευστοποίηση του HHPWS χρησιμοποιήθηκε το πρότυπο ενζυμικό σκεύασμα Thermomix με τη χρήση 5 mg/g ΞΜ ενζυμικού φορτίο. Το άχυρο τοποθετήθηκε μαζί με το ενζυμικό σκεύασμα σε αντιδραστήρα ανάμιξης ελεύθερης πτώσης στους 50°C για έξι ώρες. Η κατεύθυνση περιστροφής ήταν τόσο κατά τη φορά όσο και αντίθετα από τη φορά του ρολογιού και η θερμοκρασία διατηρήθηκε χρησιμοποιώντας λάδι ως θερμαντικό μέσο που έρεε στο εξωτερικό του συστήματος. Σκοπός ήταν η μερική διάσπαση της κυτταρίνης και της ημικυτταρίνης με τη βοήθεια των ενζύμων που προστέθηκαν και η απελευθέρωση ολιγοσακχαριτών και μονοσακχαριτών. Η ρευστοποίηση έγινε σε συγκέντρωση υλικού 23% ΞΜ.

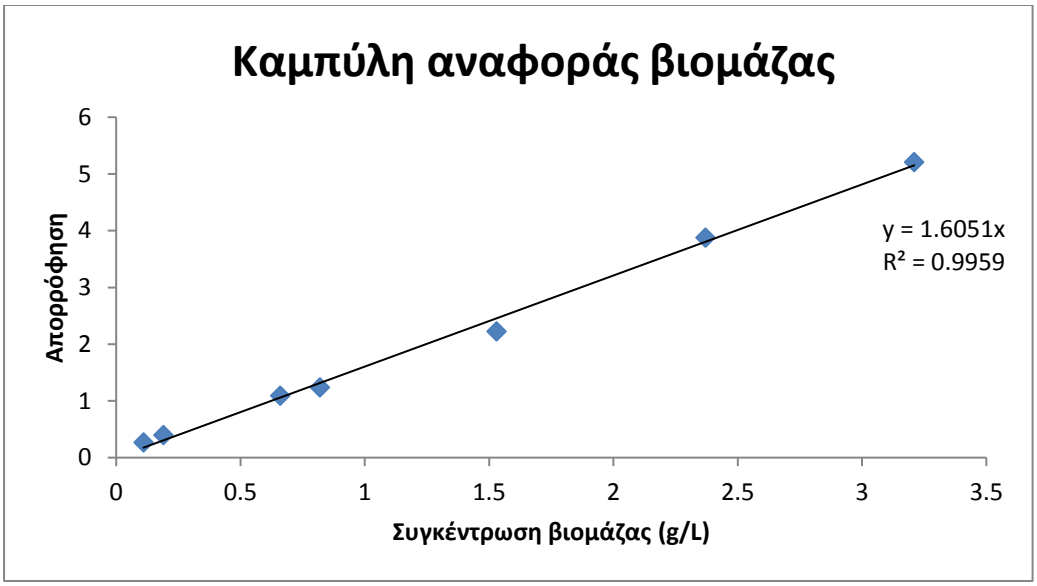
Πίνακας 5 Παραγωγή σακχάρων κατά την προϋδρόλυση αχύρου σίτου

Σάκχαρα	Άχυρο σίτου 23% DM
Συνολικα σακχαρα g/L	167.8
Υδρολυμένα σακχαρα g/L	58.6±2.6
Ποσοστό υδρολυμένων	34.9%
Υδρολυμένη γλυκόζη g/L	27.4±1.8
Υδρολυμένη ξυλόζη g/L	5.9±0.4

Στη συνέχεια το ρευστοποιημένο άχυρο σίτου χρησιμοποιήθηκε για την αξιολόγηση τόσο του *T. fermentans* όσο και του συστήματος *T. fermentans* και *F. oxysporum* ως προς την παραγωγή αιθανόλης. Πιο συγκεκριμένα, μετά τα στάδια της προκαλλιέργειας (24h) και αερόβιας καλλιέργειας (48h) του *F. Oxysporum* και της προκαλλιέργειας του *T. fermentans* (24h),) πραγματοποιήθηκαν δύο καλλιέργειες σε ρευστοποιημένο HHPWS 23% DM: μία καλλιέργεια μόνο με τη ζύμη *T. fermentans* και μία καλλιέργεια με το σύστημα *T. fermentans* και *F. oxysporum*. Για τον εμβολιασμό των καλλιεργειών χρησιμοποιήθηκε φυγοκεντρημένη κυτταρική βιομάζα του *F. Oxysporum* (50 mg/g ΞΜ) και 5% εμβόλιο από την προκαλλιέργεια του *T. fermentans* . Σε όλες τις καλλιέργειες το pH ρυθμίστηκε στο 6.0. Οι καλλιέργειες στη συνέχεια τοποθετήθηκαν υπό μικροαερόβιες συνθήκες σε επωαστήρα υπό ανάδευση ανάδευση (80 rpm) και θερμοκρασία 30°C για 5 μέρες. Δείγματα λαμβάνονταν ανά 24 ώρες με τον εξής τρόπο: σε προζυγισμένα φιαλίδια, τοποθετούνταν μικρό δείγμα της κάθε καλλιέργειας το οποίο αραιωνόταν τέσσερις φορές με τη χρήση απιονισμένου νερού. Στη συνέχεια γινόταν έντονη ανάδευση σε Vortex προκειμένου να εκχυλισθεί η περιεχόμενη αιθανόλη και ύστερα φυγοκέντρηση για 10 λεπτά και ταχύτητα 5000 rpm προκειμένου να κατακάτσει η στερεή μάζα και να ληφθούν δείγματα για το χρωματογράφο υψηλής πίεσης.

7.13 Αναλυτικές μέθοδοι

- Ο υπολογισμός της βιομάζας έγινε σύμφωνα με τη μέθοδο OD (optical density), όπου δείγματα μετά από κατάλληλες αραιώσεις και υπό συνεχή ανάδευση φωτομετρούνταν στα 600 nm. Για την ποσοτικοποίηση των αποτελεσμάτων κατασκευάστηκε πρώτα καμπύλη αναφοράς της βιομάζας. Για την κατασκευή της καμπύλης αναφοράς της βιομάζας μετρήθηκε η απορρόφηση στα 600 nm γνωστών συγκεντρώσεων διαλυμάτων ζύμης. Χρησιμοποιήθηκαν συγκεντρώσεις από 0.1 έως 3.2 g/L

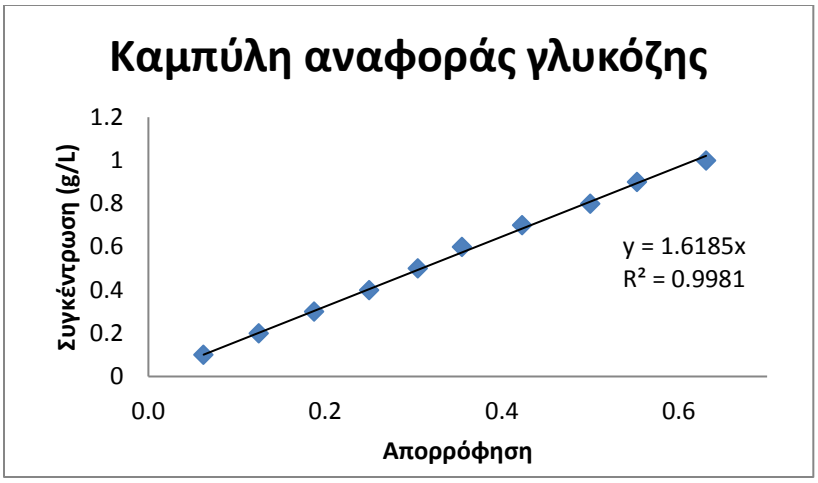


Διάγραμμα 1. Καμπύλη αναφοράς βιομάζας στα 600 nm

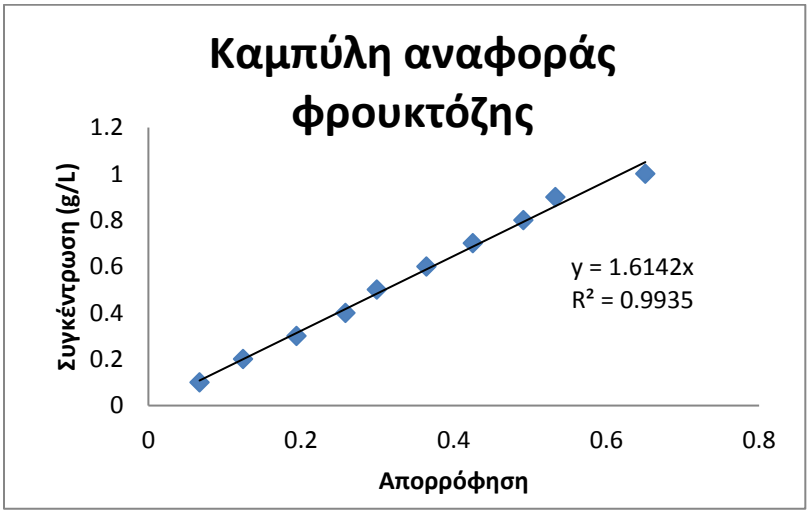
- Η παραγώμενη ποσότητα αιθανόλης μετρήθηκε με τη μέθοδο υγρής χρωματογραφίας υψηλής πίεσης (HPLC) με στήλη διαχωρισμού και ανιχνευτή δείκτη διάθλασης. Η ανάλυση πραγματοποιήθηκε με τη χρήση 5 mM H_2SO_4 ως κινητή φάση, με ροή 0.6 mL/min. Ο όγκος του δείγματος ήταν 50 μL και ο χρόνος ανάλυσης 30 λεπτά στους 40°C. Πριν τη εισαγωγή για μέτρηση με τη μέθοδο HPLC τα δείγματα φυγοκεντρούνταν για 10 λεπτά και ταχύτητα 5000 rpm σε φυγόνεκτρο και έπειτα φιλτράρονταν με φίλτρα 0.2 ή 0.4 mm (Macherey – Nagel).
- Τα σάκχαρα μετρήθηκαν μετρήθηκαν και με τη μέθοδο υγρής χρωματογραφίας υψηλής πίεσης (HPLC) με στήλη διαχωρισμού και ανιχνευτή δείκτη διάθλασης. . Η ανάλυση πραγματοποιήθηκε με τη χρήση απιονισμένου νερού υψηλής καθαρότητας (HPLC grade) ως κινητή φάση, με ροή 0.6 mL/min. Ο όγκος του δείγματος ήταν 50 μL και ο χρόνος ανάλυσης 35 λεπτά στους 70°C. Πριν τη εισαγωγή για μέτρηση με τη μέθοδο HPLC τα δείγματα φυγοκεντρούνταν για 10 λεπτά και ταχύτητα 5000 rpm σε φυγόνεκτρο και έπειτα φιλτράρονταν με φίλτρα 0.2 ή 0.4 mm (Macherey – Nagel).

Εικόνα 7. Υγρός χρωματογράφος υψηλής πίεσης Shimadzu

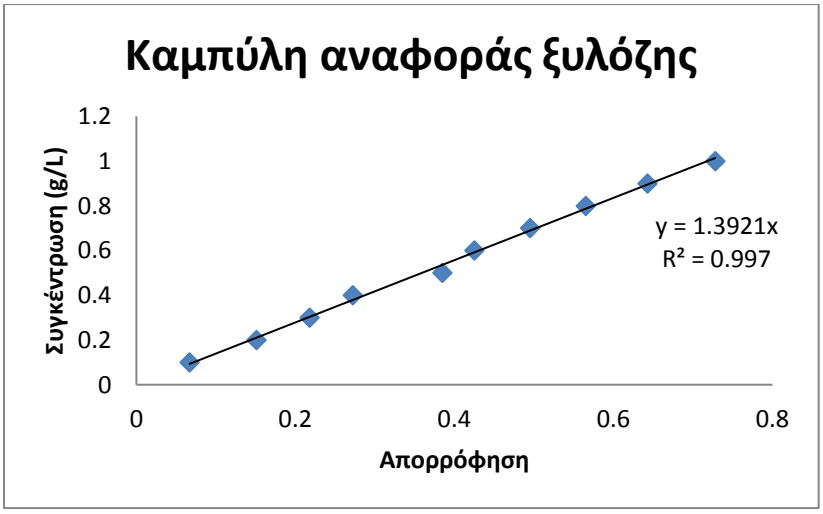
- Ο υπολογισμός των αναγωγικών σακχάρων στις καλλιέργειες της ζύμης έγινε με τη μέθοδο του δινιτροσαλυκιλικού οξέος (DNS). Σύμφωνα με τη μέθοδο αυτή, σε 250 μL δείγματος προστίθενται 250 μL διαλύματος DNS. Πραγματοποιείται βρασμός για 5 λεπτά και ακολουθεί προσθήκη 2 mL απιονισμένου νερού. Τέλος, τα δείγματα φωτομετρούνται στα 540 nm (56). Για την ποσοτικοποίηση των αποτελεσμάτων της μεθόδου DNS κατασκευάστηκαν καμπύλες αναφοράς για τη γλυκόζη, τη φρουκτόζη, την ξυλόζη, τη λακτόζη και την αραβινόζη.



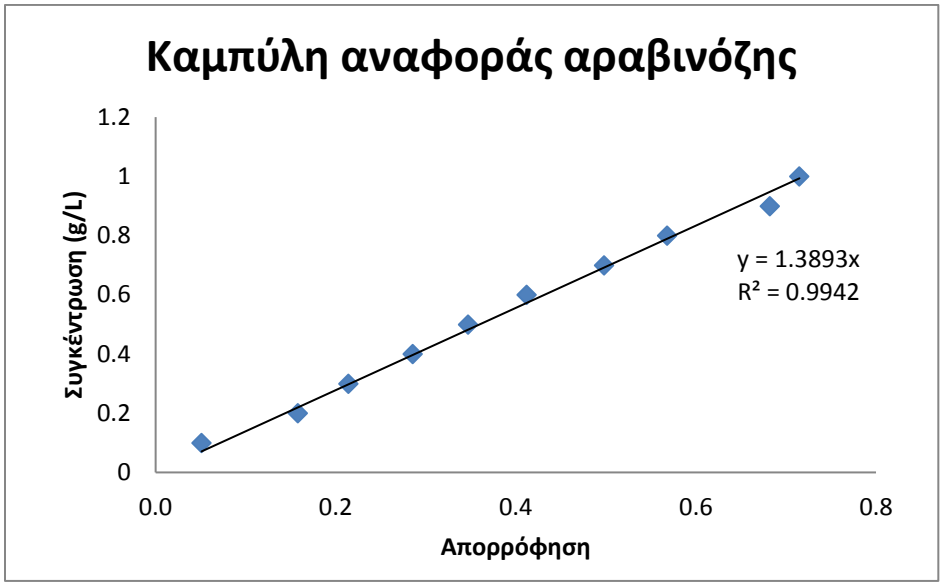
Διάγραμμα 2. Καμπύλη αναφοράς γλυκόζης



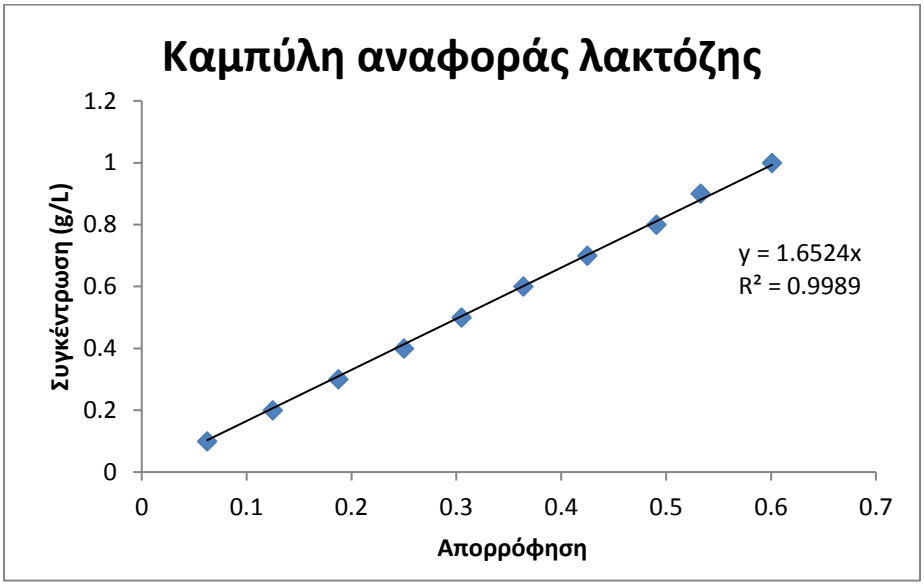
Διάγραμμα 3. Καμπύλη αναφοράς φρουκτόζης



Διάγραμμα 4. Καμπύλη αναφοράς ξυλόζης



Διάγραμμα 5. Καμπύλη αναφοράς αραβινόζης



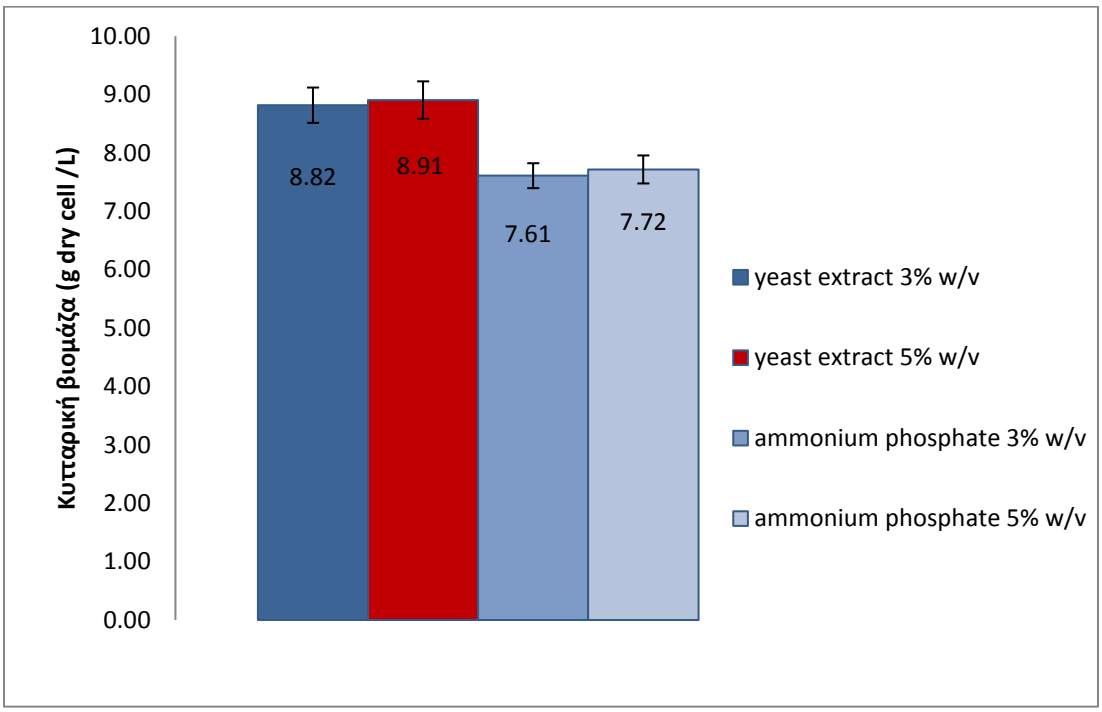
Διάγραμμα 6. Καμπύλη αναφοράς λακτόζης

ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ – ΣΧΟΛΙΑΣΜΟΣ

8 ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ ΚΑΙ ΣΧΟΛΙΑΣΜΟΣ

8.1 Επίδραση της πηγής αζώτου στη μικροβιακή ανάπτυξη και στην παραγωγή αιθανόλης του *T. fermentans.*

Στο αρχικό στάδιο της εργασίας, έγινε μια προκαταρκτική διερεύνηση σχετικά με το ποιά πηγή αζώτου είναι πιο κατάλληλη για το σχηματισμό βιομάζας του μικροοργανισμου. Για το λόγο αυτό εξετάστηκαν δύο πηγές, μία ανόργανη, το όξινο φωσφορικό αμμώνιο σε συγκεντρώσεις 3 g/L και 5 g/L, και μία οργανική, το yeast extract σε συγκεντρώσεις 3 g/L και 5 g/L. Ύστερα από πέντες μέρες αερόβιας καλλιέργειας προέκυψε το ακόλουθο αποτέλεσμα.

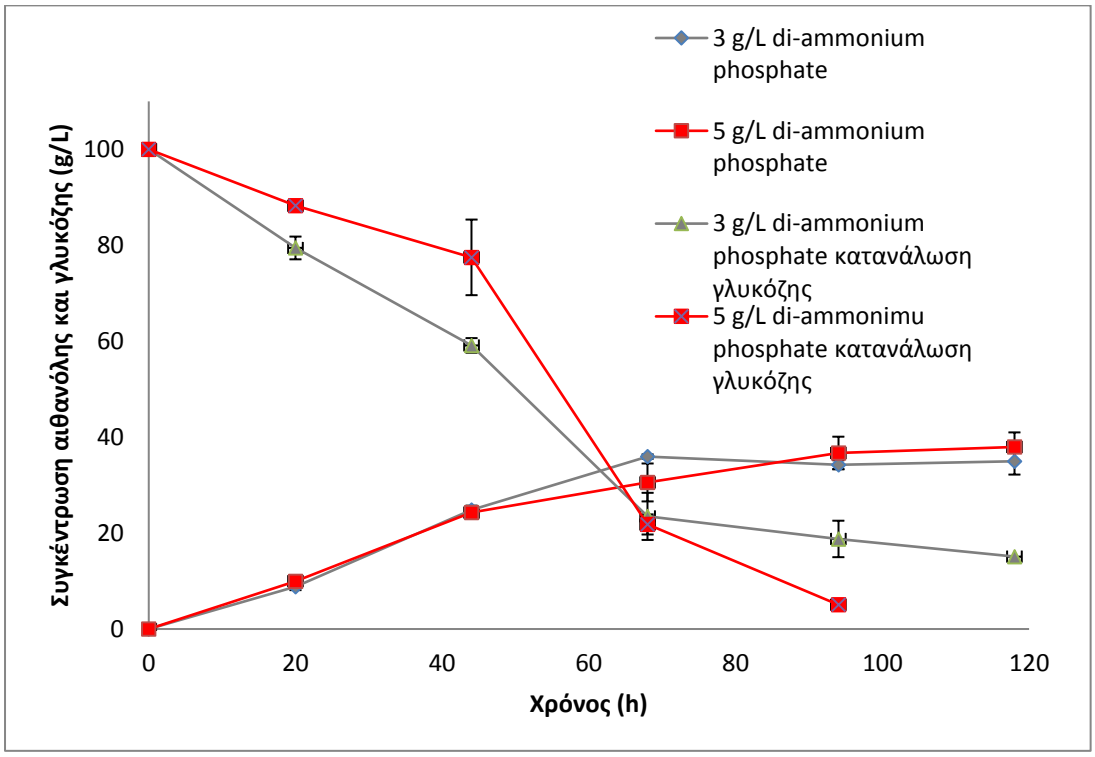


Σχήμα 2. Παραγωγή βιομάζας από διαφορετικές πηγές και συγκεντρώσεις αζώτου σε αερόβια καλλιέργεια τεσσάρων ημερών

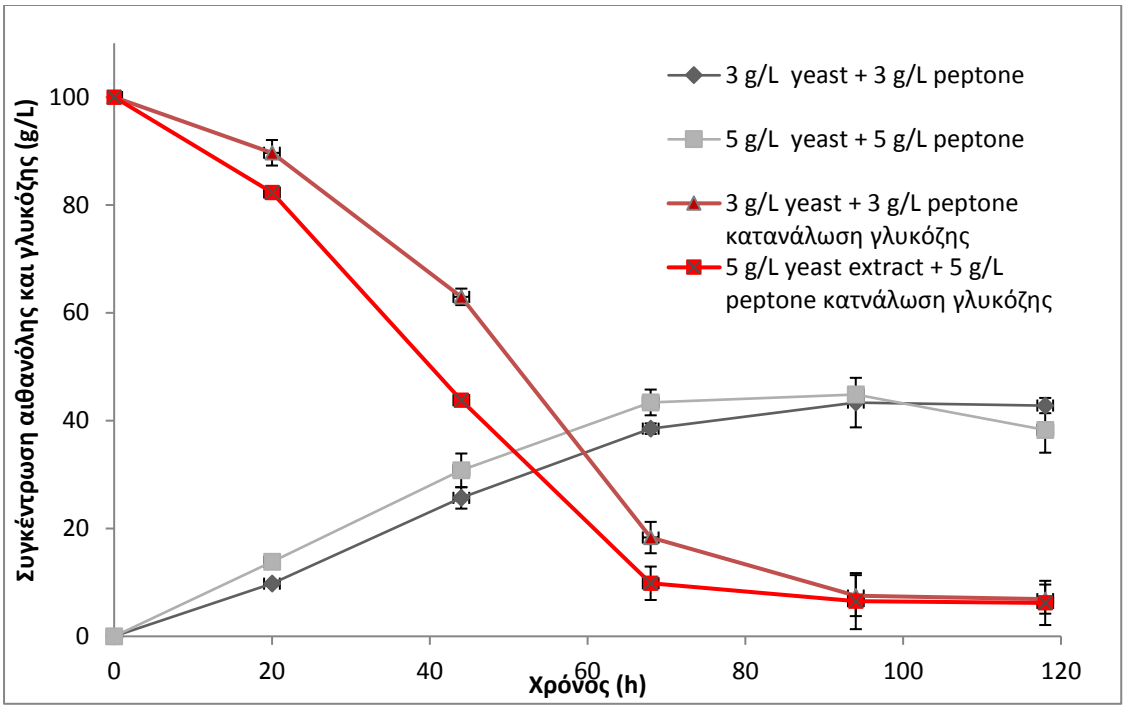
Όπως είναι εμφανές και από το παραπάνω σχήμα πιο κατάλληλη πηγή, για το σχηματισμό βιομάζας είναι το yeast extract. Συγκεκριμένα, η βιομάζα έφτασε τα 8.91 g/L σε συγκέντρωση 5 g/L yeast extract, ενώ στην αντίστοιχη περίπτωση για το όξινο φωσφορικό αμμώνιο η βιομάζα έφτασε τα 7.72 g/L. Αυτό ήταν κάτι λίγο έως πολύ αναμενόμενο, καθότι αρκετοί μικροοργανισμοί επωφελούνται από την ύπαρξη οργανικών πηγών αζώτου, και ιδιαίτερα από

την παρουσία στο μέσο ανάπτυξης yeast extract, καθώς αυτές περιέχουν αμινοξέα, πεπτίδια, νουκλεοτίδια και άλλα διαλυτά χρήσιμα συστατικά (57), αλλά έβαλε κάποιες αρχικές βάσεις ως προς το που θα έπρεπε να κατευθυνθεί η έρευνα.

Έχοντας στο μυαλό το αποτέλεσμα αυτής της προκαταρκτικής έρευνας, το επόμενο στάδιο ήταν να εξεταστούν διαφορετικές πηγές αζώτου σε σχέση με την παραγωγή αιθανόλης σε μικροαερόβιες συνθήκες. Οι πηγές που εξετάστηκαν ήταν το όξινο φωσφορικό αμμώνιο σε συγκεντρώσεις 3 g/L και 5 g/L και ένα μίγμα από πεπτόνη κρέατος και yeast extract σε συγκεντρώσεις 6 g/L και 10 g/L με αναλογία 1:1. Ο λόγος επιλογής των συγκεκριμένων συγκεντρώσεων, ήταν η παρουσία ίδιας συγκέντρωσης καθαρού αζώτου, καθώς στο όξινο φωσφορικό άζωτο περιέχεται καθαρό άζωτο σε ποσοστό 21%, στο yeast extract σε ποσοστό 11% και στην πεπτόνη 14%. Στα Διαγράμμα 6 και 7 παρουσιάζεται η κινητική παραγωγής αιθανόλης και κατανάλωσης της γλυκόζης που χρησιμοποιήθηκε ως πηγή άνθρακα.



Διάγραμμα 7. Παραγωγή αιθανόλης και κατανάλωση σακχάρων σε μέσο γλυκόζη 10% w/v χρησιμοποιώντας ανόργανες π±ηγές αζώτου



Διάγραμμα 8. Παραγωγή αιθανόλης και κατανάλωση σακχάρων σε μέσο γλυκόζης 10% w/v χρησιμοποιώντας οργανικές πηγές αζώτου

Η κατανάλωση του υποστρώματος ξεκινά αμέσως μετά τον εμβολιασμό των καλλιεργειών, αλλά δε φαίνεται να καταναλώνεται ποτέ πλήρως, καθώς τις δύο τελευταίες μέρες της καλλιέργειας ακολουθείται ένας πολύ αργός ρυθμός αφομείωσής του. Η παραγωγή αιθανόλης και στις τέσσερις εξεταζόμενες περιπτώσεις, ακολουθεί μία έντονη πορεία τις τρεις πρώτες μέρες, ισορροπώντας από εκεί και ύστερα για τις επόμενες δύο μέρες. Όπως φαίνεται από τα δύο διαγράμματα οι οργανικές πηγές αζώτου αποδεικνύονται πιο ωφέλιμες και για την παραγωγή αιθανόλης από τον *T. fermentans.* Η μέγιστη παραγωγή αιθανόλης παρατηρήθηκε από την καλλιέργεια που περιείχε 5 g/L yeast extract και 5 g/L πεπτόνη την τέταρτη μέρα, φτάνοντας τα **44.85 g/L**. Αντίθετα, στη μέγιστη συγκέντρωση όξινου φωσφορικού αμμωνίου παράχθηκαν **37.95 g/L**. Η διαφορά μεταξύ των δύο τελικών συγκεντρώσεων δεν είναι τεράστια και αποδεικνύει ότι ο *T. fermentans* μπορεί να χρησιμοποιήσει και τις δύο πηγές με ικανοποιητικά αποτελέσματα. Η κύρια διαφορά που παρατηρείται είναι ότι με τη χρήση οργανικού αζώτου παρατηρούνται μεγαλύτερος συντελεστής μετατροπής υποστρώματος σε αιθανόλη ($Y_{p/s}$) και μεγαλύτερη μέση και μέγιστη παραγωγικότητα. Πιο συγκεκριμένα, η

μέγιστη παραγωγικότητα είναι 1.2 φορές μεγαλύτερη στη μέγιστη συγκέντρωση οργανικού αζώτου σε σχέση με την αντίστοιχη συγκέντρωση ανόργανου αζώτου. Μία τελευταία παρατήρηση είναι ότι η παραγωγικότητα παρουσιάζει σε όλες τις καλλιέργειες μέγιστο τη δεύτερη μέρα ακολουθώντας τις επόμενες μέρες πτωτική τάση. Τα αποτελέσματα συνοψίζονται στον παρακάτω πίνακα

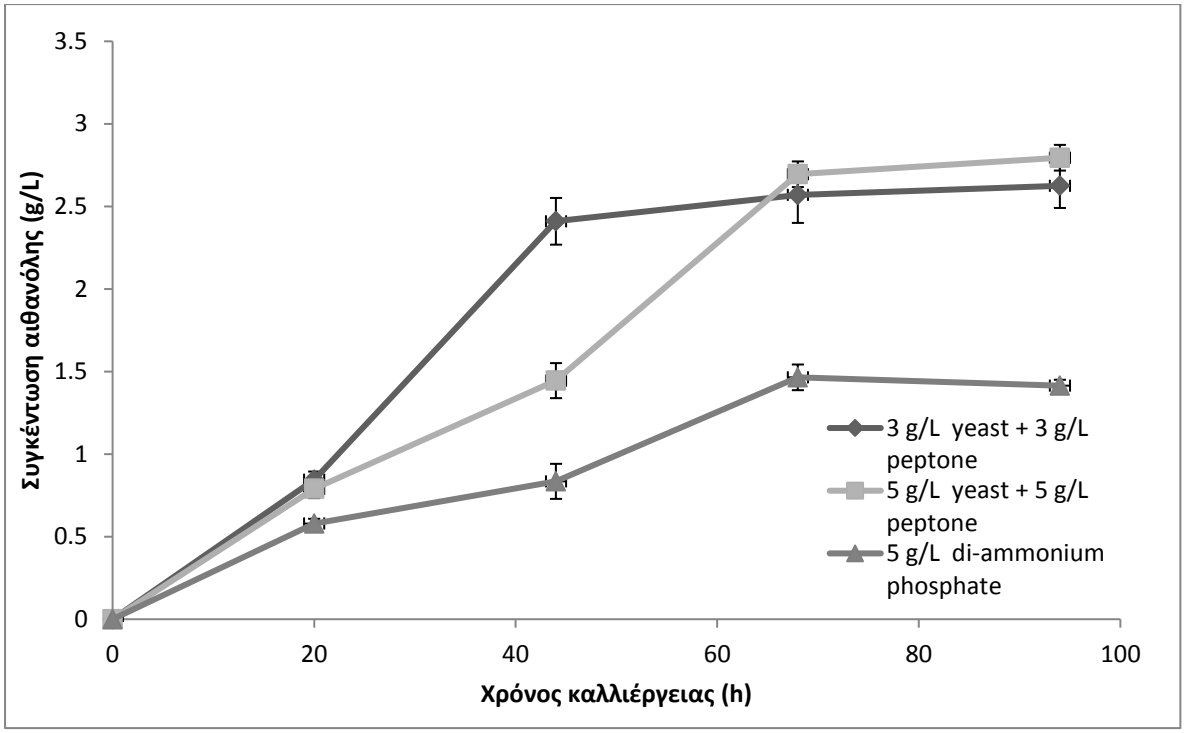
Πίνακας 6. Αποτελέσματα καλλιεργειών με πηγή άνθρακα γλυκόζη και διαφορετικές πηγές αζώτου

γλυκόζη 100 g/L	αιθανόλη (g/L)	$Y_{p/s}$ (g/g)	μέγιστη παραγωγικότητα (g/L·h)	μέση παραγωγικότητα (g/L·h)
3 g/L όξινο φωσφορικό αμμώνιο	35.94±0.47	0.359±0.005	0.56±0.02	0.29±0.23
5 g/L όξινο φωσφορικό αμμώνιο	37.95±1.05	0.367±0.017	0.55±0.02	0.32±0.03
3 g/L yeast extract + 3 g/L πεπτόνη	43.35±2.4	0.4335±0.046	0.58±0.05	0.36±0.01
5 g/L yeast extract + 5 g/L πεπτόνη	**44.85±0.21**	**0.449±0.002**	0.69±0.07	0.32±0.04

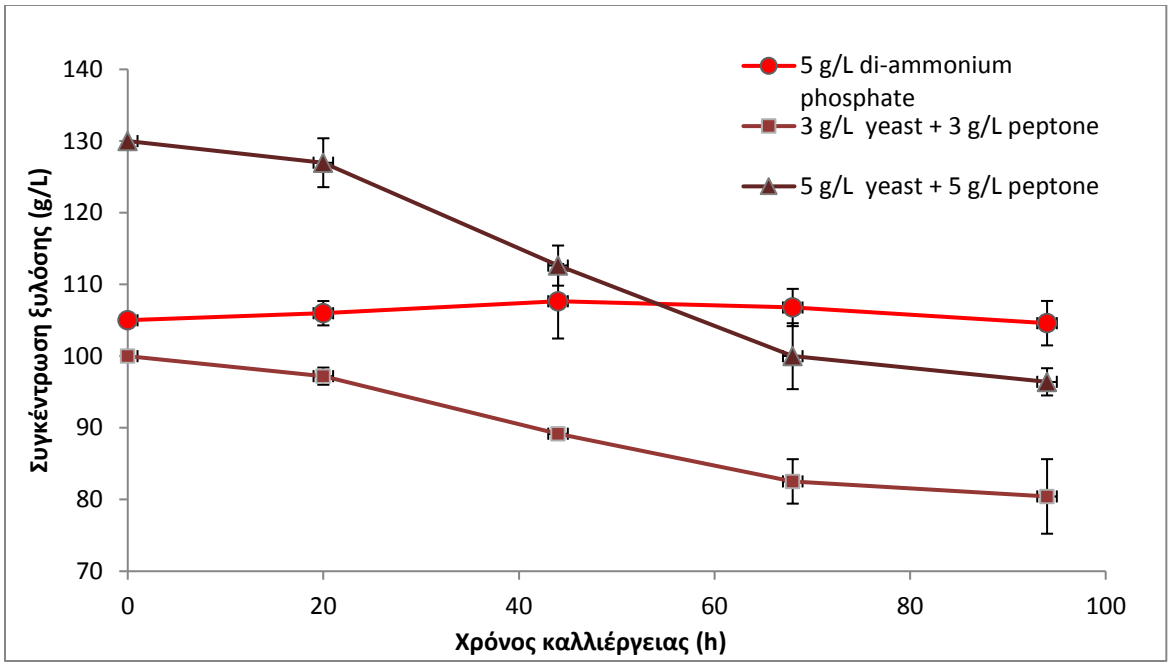
Άξια σχολιασμού είναι και η μείωση της συγκέντρωσης της αιθανόλης την πέμπτη μέρα της καλλιέργειας. Ενδέχεται το δεδομένο αυτό να υποδεικνύει ότι ο *T. fermentans* ακολουθεί μοντέλο διαύξιμης ανάπτυξης οξειδώνοντας πολύ αργά την αιθανόλη σε περίπτωση που η συγκέντρωση της γλυκόζης βρεθεί χαμηλότερα από κάποιο όριο, κατά τρόπο παρόμοιο με τον *S. cerevisiae* (58). Το ενδεχόμενο αυτό θα αξιολογηθεί στο τέλος, αφού έχουν παρουσιαστεί όλα τα πειράματα που διεξήχθησαν.

Αντίστοιχα είναι και τα ευρήματα στην περίπτωση που χρησιμοποιήθηκε ξυλόζη ως πηγή άνθρακα. Όπως θα δειχθεί στα παρακάτω διαγράμματα, ο *T. fermentans* δε δείχνει ότι μπορεί να αφομειώσει την ξυλόζη το ίδιο καλά όπως τη γλυκόζη, αλλά το γεγονός ότι μπορεί σε κάποιο βαθμό να την αξιοποιήσει για την παραγωγή αιθανόλης είναι σημαντικό, καθώς είναι μία πρώτη ένδειξη ότι ο *T. fermentans* ίσως μπορεί να χρησιμοποιηθεί για τη ζύμωση και

σύνθετων υποστρωμάτων. Η πιθανότητα αυτή θα διερευνηθεί περισσότερο στη συνέχεια της συγκεκριμένης εργασίας.



Διάγραμμα 9. Παραγωγή αιθανόλης σε μέσο ξυλόζη με διαφορετικές πηγές αζώτου



Διάγραμμα 10. Κατανάλωση σακχάρων σε μέσο ξυλόζη με διαφορετικές πηγές άνθρακα

Σε συγκέντρωση 3 g/L όξινου φωσφορικού αμμωνίου δεν παρατηρήθηκε παραγωγή αιθανόλης ούτε κατανάλωση ξυλόζης και για το λόγο αυτό δεν περιλαμβάνεται στα αποτελέσματα. Η παραγωγή αιθανόλης φαίνεται να ακολουθεί το ίδιο μοντέλο κινητικής, όπως και στην περίπτωση της κατανάλωσης γλυκόζης: τις τέσσερις πρώτες μέρες ακολουθείται ένας πιο έντονος ρυθμός, ενώ τις επόμενες δύο η παραγωγή σχεδόν σταματάει. Πιο κατάλληλη πηγή αζώτου για την παραγωγή αιθανόλης φαίνεται να είναι και πάλι ο συνδυασμός 5 g/L yeast και 5g/L πεπτόνη, καθώς εμφανίζει τη μεγαλύτερη παραγωγή αιθανόλης και το μεγαλύτερο συντελεστή μετατροπής υποστρώματος σε αιθανόλη ($Y_{p/s}$) που είναι **2.79 g/L** και **0.028 g/g** αντίστοιχα. Η καλύτερη μέγιστη παραγωγικότητα εμφανίζεται για 3 g/L yeast και 3 g/L πεπτόνη, αλλά η μέση παραγωγικότητα των δύο είναι πολύ παραπλήσια, οπότε αξιολογούνται ως σημαίνοντες παράγοντες ο συντελεστής $Y_{p/s}$ και η καλύτερη συνολική παραγωγή αιθανόλης. Συνολικά πάντως, σε ζύμωση ξυλόζης ο *T. fermentans* δεν αποδίδει ιδιαίτερα, αν και αυτό θα αξιολογηθεί καλύτερα σε επόμενη σειρά πειραμάτων.

Στην κατανάλωση υποστρώματος, τα πράγματα είναι κάπως διαφορετικά σε σχέση με την περίπτωση της γλυκόζης. Για την περίπτωση χρήσης όξινου φωσφορικού αμμωνίου σε συγκέντρωση 5 g/L, δε φαίνεται να παρατηρείται ιδιαίτερη κατανάλωση ξυλόζης. Αντίθετα, με τη χρήση οργανικών πηγών αζώτου υπάρχει κάποια κατανάλωση υποστρώματος που είναι

μεγαλύτερη στην περίπτωση συγκεντρώσεων 5 g/L yeast και 5g/L πεπτόνη. Η κατανάλωση αρχίζει κατά βάση μετά την πρώτη μέρα, καθώς από ότι φαίνεται το πρώτο εικοσιτετράωρο ο *T. fermentans* προσαρμόζεται στο περιβάλλον της ξυλόζης. Τα αποτελέσματα συνοψίζονται στον παρακάτω πίνακα.

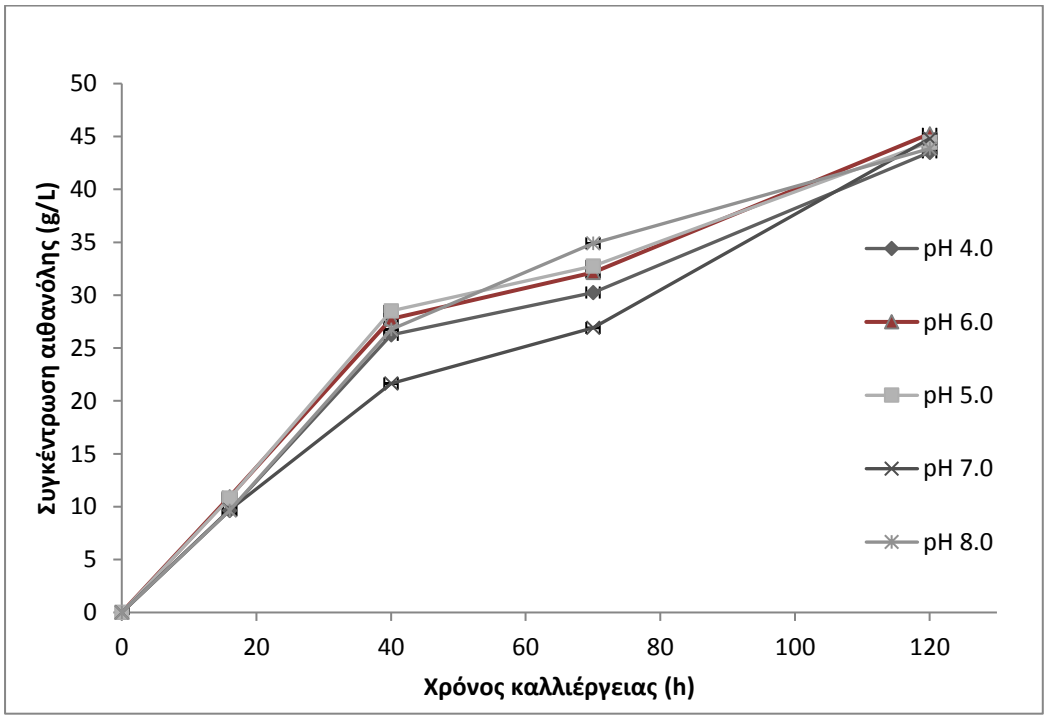
Πίνακας 7. Αποτελέσματα καλλιεργειών με μέσο άνθρακα ξυλόζη και διαφορετικές πηγές αζώτου

ξυλόζη 100 g/L	αιθανόλη (g/L)	$Y_{p/s}$ (g/g)	μέγιστη παραγωγικότητα (g/L·h)	μέση παραγωγικότητα (g/L·h)
3 g/L όξινο φωσφορικό αμμώνιο	**ίχνη**	-	-	-
5 g/L όξινο φωσφορικό αμμώνιο	1.46±0.08	0.014±0.001	0.03±0.00	0.015±0.01
3 g/L yeast extract + 3 g/L πεπτόνη	2.62±0.13	0.026±0.013	0.05±0.01	0.028±0.02
5 g/L yeast extract+ 5 g/L πεπτόνη	**2.79±0.08**	**0.028±0.005**	0.04±0.01	0.030±0.01

Η εύρεση της καταλληλότερης πηγής αζώτου είναι κρίσιμης σημασίας σε μία διεργασία ζύμωσης, καθώς το άζωτο είναι αναγκαίο για την κυτταρική ανάπτυξη, τον πολλαπλασιασμό και επηρεάζει σε μεγάλο βαθμό την τελική συγκέντρωση της παραγώμενης αιθανόλης (74). Σε αυτή τη σειρά πειραμάτων, όπως αναλύθηκε, ως καλύτερη αξιολογήθηκε η χρήση μίγματος yeast extract/πεπτόνης συγκέντρωσης 10 g/L και αναλογίας 1:1. Το αποτέλεσμα αυτό συνάδει με αποτελέσματα άλλων βιβλιογραφικών ερευνών, όπως των Laopaiboon et al. (51), οι οποίοι παρατήρησαν ότι η παραγωγή αιθανόλης από χυμό γλυκού σόργου προάγεται περισσότερο με την προσθήκη yeast extract και πεπτόνης παρά με την προσθήκη όξινου θειϊκού αμμωνίου. Σε αντίστοιχο αποτέλεσμα, σχετικά με τη χρήση yeast extract, κατέληξαν και οι Jones et all. (75) παρατηρώντας ότι η προσθήκη μόλης 1% w/w yeast extract συντόμευσε τους χρόνους ζύμωσης πολτοποιημένου σίτου και αύξησε την τελική συγκέντρωση της παραγόμενης αιθανόλης. Ωστόσο, πρέπει να σημειωθεί ότι η χρήση yeast extract είναι σχεδόν απαγορευτική για τη βιομηχανία λόγω του πολύ υψηλού κόστους του (75).

8.2 Επίδραση του pH στην παραγωγή αιθανόλης από τον *T. fermentans*

Η δεύτερη σειρά πειραμάτων αφορούσε στην επίδραση της τιμής του pH στην παραγωγή αιθανόλης από τον *T. fermentans*. Στα πρώτα στάδια της έρευνας είχε γίνει η υπόθεση ότι το βέλτιστο pH θα βρισκόταν στην περιοχή 6-7, καθώς αυτό αναφέρουν διάφορες μελέτες που έχουν γίνει για την παραγωγή ενδοκυτταρικού λίπους από τον *T. fermentans.* (48) (52). Ωστόσο, επειδή δεν υπάρχουν πηγές στη διαθέσιμη βιβλιογραφία, όπου να ερευνούνται οι συνθήκες αναερόβιας ζύμωσης για την παραγωγή αιθανόλης από το μικροοργανισμό αυτόν, εξετάστηκαν οι τιμές 4.0, 5.0, 6.0, 7.0 και 8.0 σε μέσο που περιείχε γλυκόζη ως πηγή άνθρακα και μίγμα yeast extract και πεπτόνης σε αναλογία 1:1, λόγω της ήδη εξακριβωμένης καλύτερης επίδρασης αυτής της πηγής αζώτου στην παραγωγή αιθανόλης. Στο παρακάτω διάγραμμα παρουσιάζεται η παραγωγή αιθανόλης για τις διαφορετικές τιμές pH.

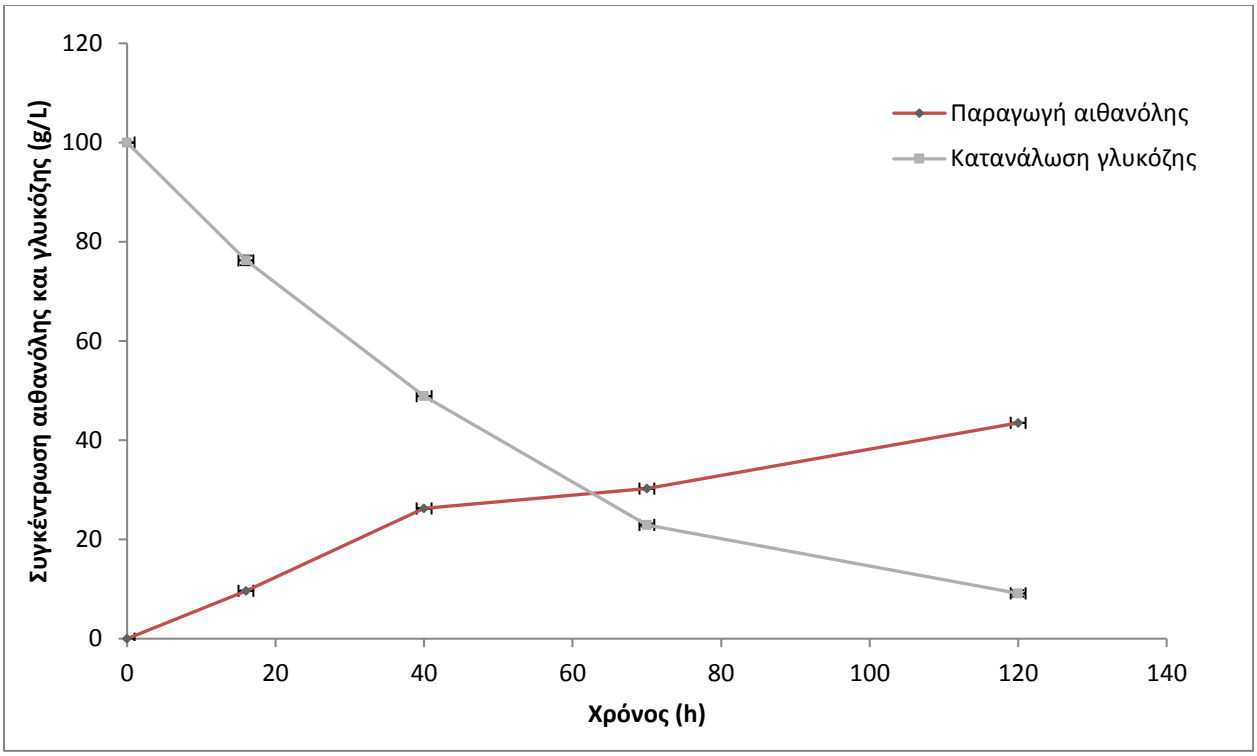


Διάγραμμα 11. Παραγωγή αιθανόλης σε διαφορετικές τιμές pH

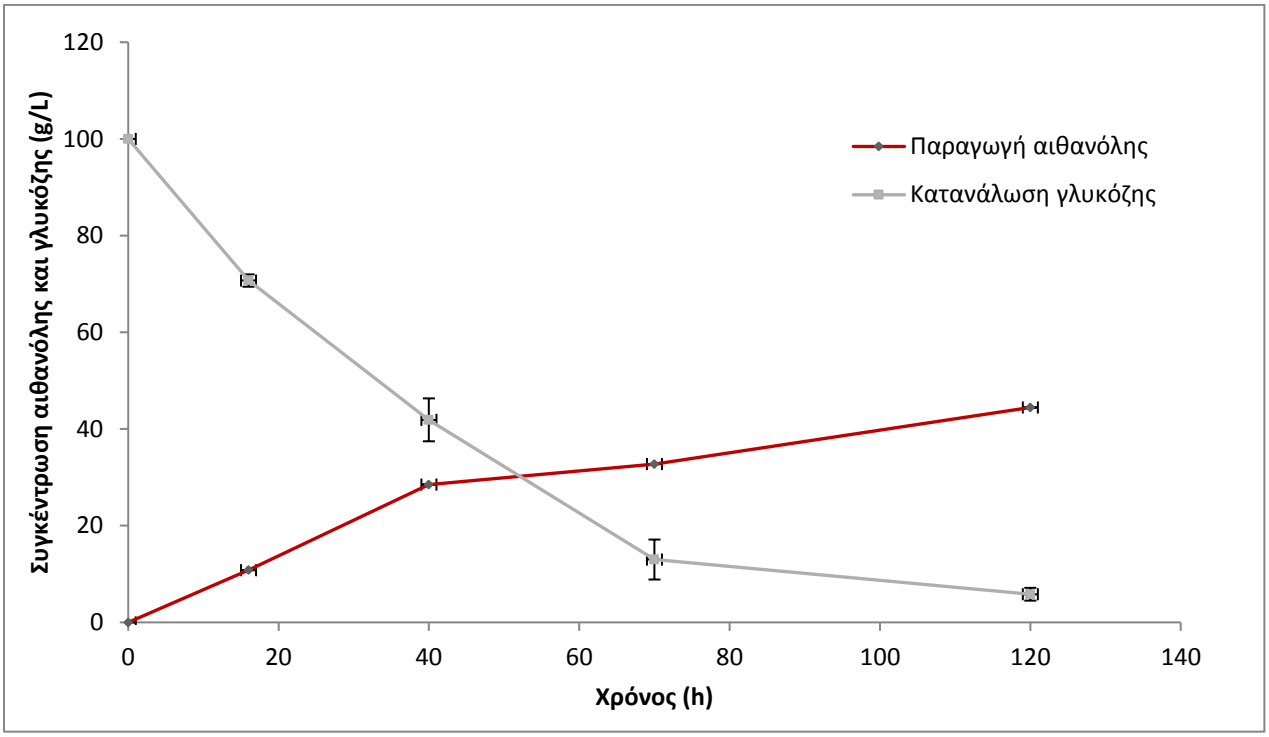
Όπως είναι εμφανές, σε όλες τις περιπτώσεις ακολουθείται παρόμοια κινητική παραγωγής αιθανόλης. Η ζύμωση για όλες τις τιμές αρχίζει αμέσως μετά τον εμβολιασμό και

ολοκληρώνεται στις 120h, ενώ δε φαίνεται να παρουσιάζεται παρεμπόδιση για κάποια συγκεκριμένη τιμή pH. Αντίθετα, αυτό που παρατηρείται για τις τιμές 4.0-7.0 είναι μία απότομη μείωση του ρυθμού παραγωγής στο διάστημα 40-70 ώρες. Μία υπόθεση είναι, κάποιο από τα προϊόντα της ζύμωσης να παρεμποδίζει τη ζύμωση ή να επηρεάζει το pH, με αποτέλεσμα ο μικροοργανισμός να χρειάζεται κάποιο χρόνο να προσαρμοστεί στο καινούριο περιβάλλον του. Η υπόθεση αυτή δείχνει να επιβεβαιώνεται από δύο παράγοντες

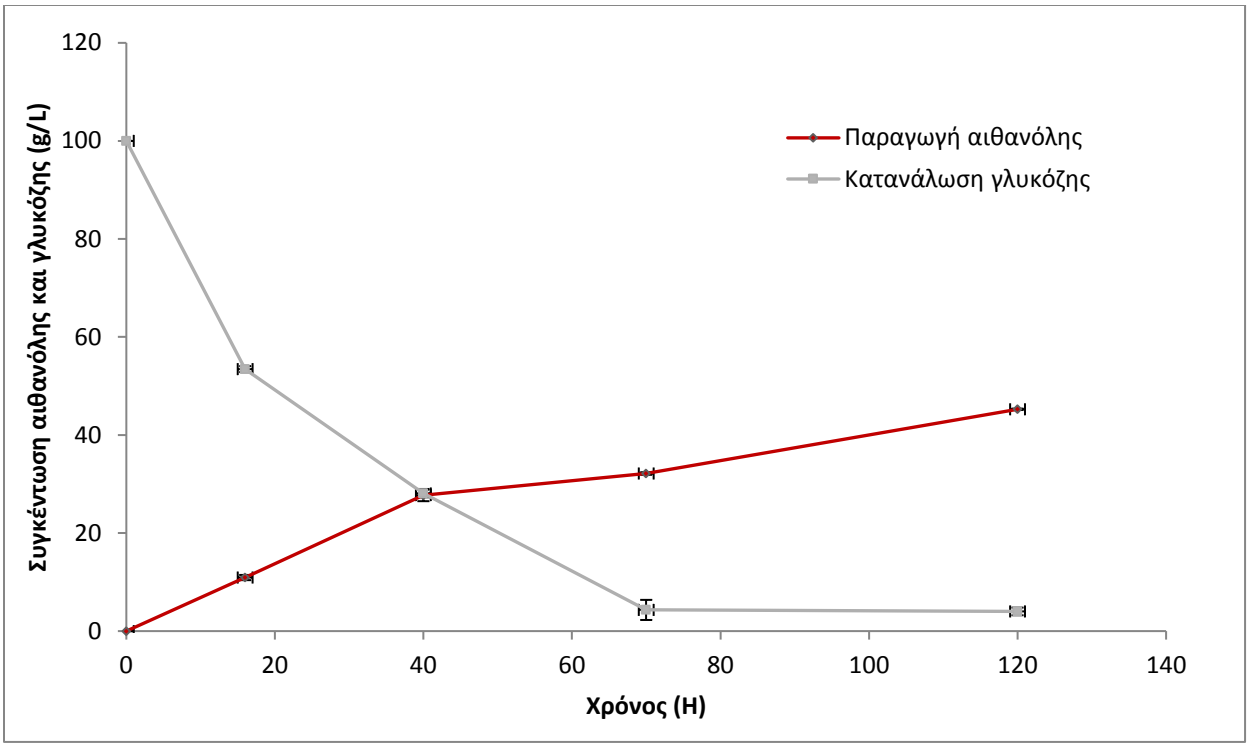
- Μετά τις 70 h παρατηρείται μία εκ νέου αύξηση του ρυθμού παραγωγής αιθανόλης. Το δεδομένο αυτό ίσως υποδεικνύει ότι ο μικροοργανισμός χρειάστηκε να επαναπροσαρμοστεί στο περιβάλλον του, περνώντας αρχικά μία λανθάνουσα φάση.
- Στην περίπτωση της καλλιέργειας με αρχική τιμή pH 8.0, δεν παρατηρείται αυτή η έντονη πτώση του ρυθμού και συνεπακόλουθη αύξησή του μετά τις 70 h. Αντίθετα, παρατηρείται μία ήπια πτώση του ρυθμού η οποία έχει να κάνει με τον περιορισμό της πηγής άνθρακα στο θρεπτικό μέσο. Αυτό τεκμηριώνεται και από το Διάγραμμα 11. Συνεπώς, λόγω της υψηλής αρχικής τιμής του το pH δεν μειώθηκε τόσο ώστε να χρειαστεί ο μικροοργανισμός χρόνο επαναπροσαρμογής στο περιβάλλον του.
- Το φαινόμενο δε φαίνεται να εξηγείται από τον περιορισμό στο υπόστρωμα της πηγής άνθρακα, καθώς στις 40 h, όπως φαίνεται από τα Διαγράμματα 12-15 αλλά και όπως έχει διαπιστωθεί σε προηγούμενο πείραμα (Διάγραμμα 7), υπάρχει ακόμα αρκετή ποσότητα γλυκόζης στο υπόστρωμα που αντιστοιχεί στο 30-50% της αρχικής συγκέντρωσης του υποστρώματος.



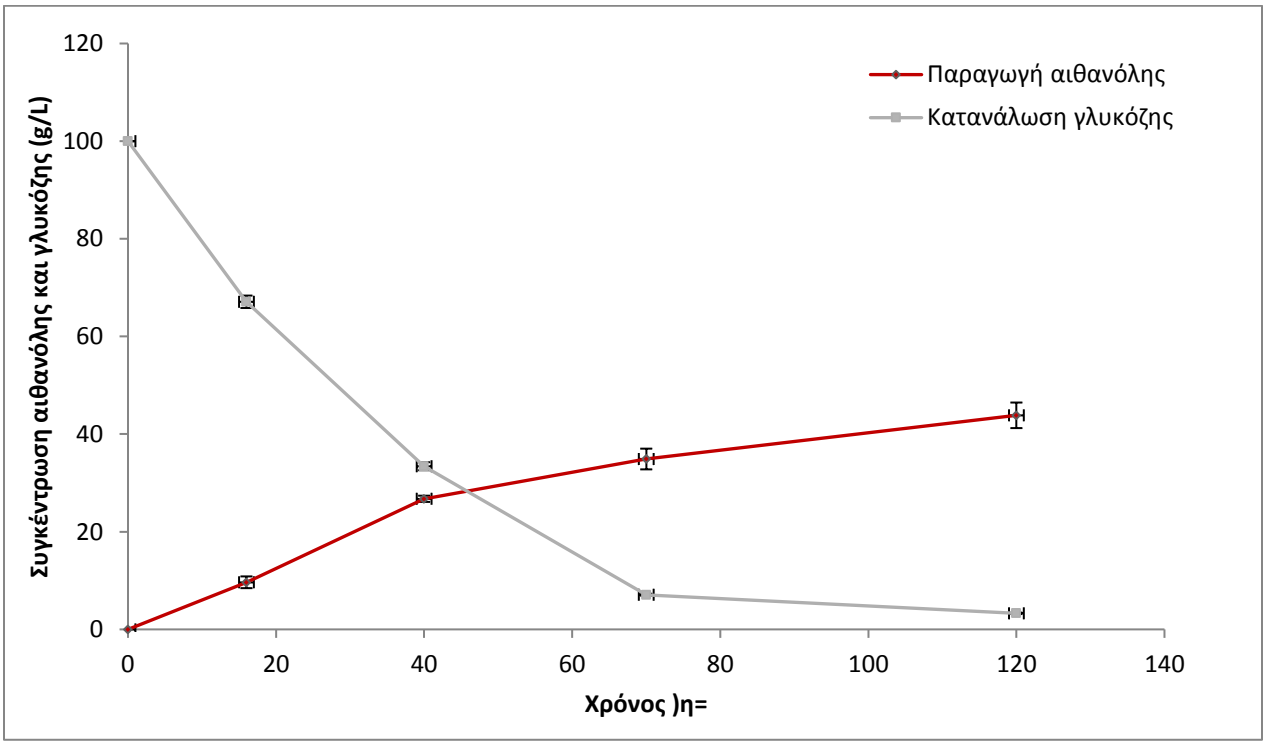
Διάγραμμα 12. Παραγωγή αιθανόλης και κατανάλωσης γλυκόζης σε καλλιέργεια με αρχικό pH 4.0



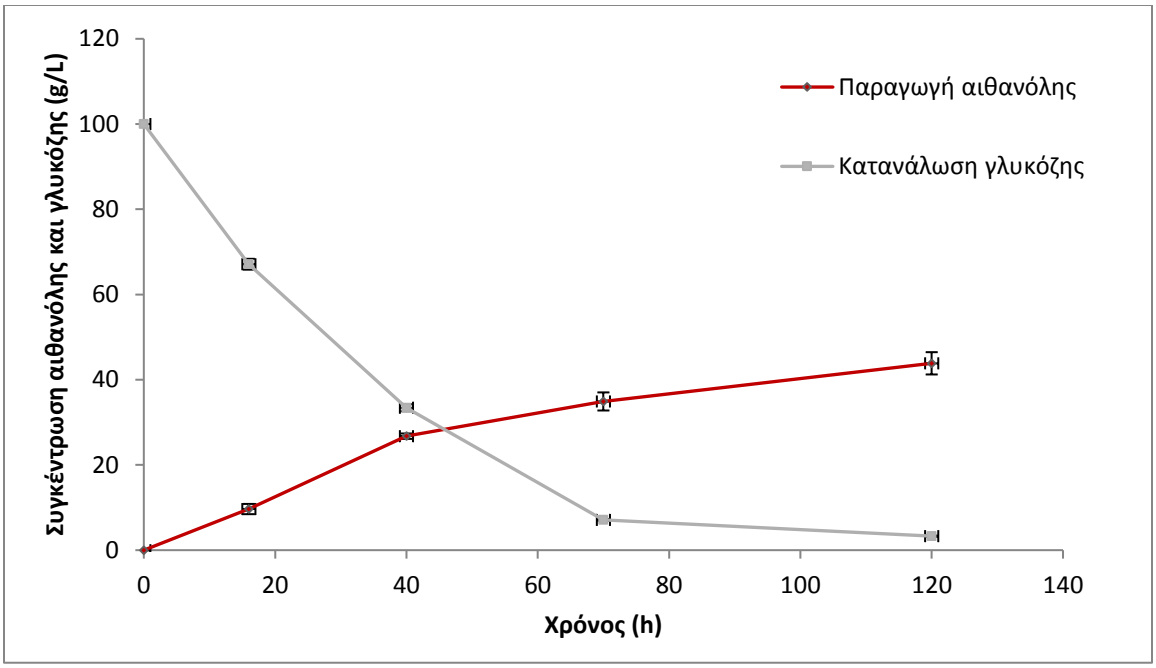
Διάγραμμα 13. Παραγωγή αιθανόλης και κατανάλωση γλυκόζης σε καλλιέργεια με αρχικό pH 5.0



Διάγραμμα 14. Παραγωγή αιθανόλης και κατανάλωση γλυκόζης σε καλλιέργεια με αρχικό pH 6.0



Διάγραμμα 15. Παραγωγή αιθανόλης και κατανάλωση γλυκόζης σε καλλιέργεια με αρχικό pH 7.0



Διάγραμμα 16. Παραγωγή αιθανόλης και κατανάλωση γλυκόζης σε καλλιέργεια με αρχικό pH 8.0

Παρά την εμφάνιση αυτής της λανθάνουσας φάσης η παραγωγή αιθανόλης φτάνει σε ικανοποιητικά επίπεδα, με την καλύτερη τελική συγκέντρωσης να εμφανίζεται στην καλλιέργεια όπου το pH είχε ρυθμιστεί αρχικά στην τιμή **6.0** φτάνοντας τα **45.45 g/L**. Οι τελικές συγκεντρώσεις των υπόλοιπων καλλιεργειών είναι παραπλήσιες δείχνοντας ότι ο *T. fermentans* μπορεί να παράξει αιθανόλη σε περιβάλλοντα από ελαφρώς όξινα έως και ελαφρώς αλκαλικά. Η μέγιστη παραγωγικότητα εμφανίζεται σε όλες τις εξεταζόμενες περιπτώσεις τη δεύτερη ημέρα καλλιέργειας, ενώ ο καλύτερος συντελεστής μετατροπής υποστρώματος εμφανίζεται για αρχικό **pH 6.0**. Στον Πίνακα 8 συνοψίζονται τα αποτελέσματα.

Πίνακας 8. Αποτελέσματα καλλιέργειας σε διαφορετικό αρχικό pH

pH	αιθανόλη (g/L)	$Y_{P/S}$ (g/g)	μέγιστη παραγωγικότητα (g/L*h)	μέση παραγωγικότητα (g/L*h)
4.0	43.50±0.42	0.435±0.004	0.65±0.05	0.36±0.01
5.0	44.45±0.35	0.444±0.004	0.71±0.05	0.37±0.01
6.0	45.25±0.78	0.453±0.008	0.69±0.02	0.38±0.01
7.0	44.80±1.27	0.448±0.013	0.61±0.05	0.36±0.00
8.0	43.85±1.05	0.438+0.009	0.67±0.02	0.36±0.01

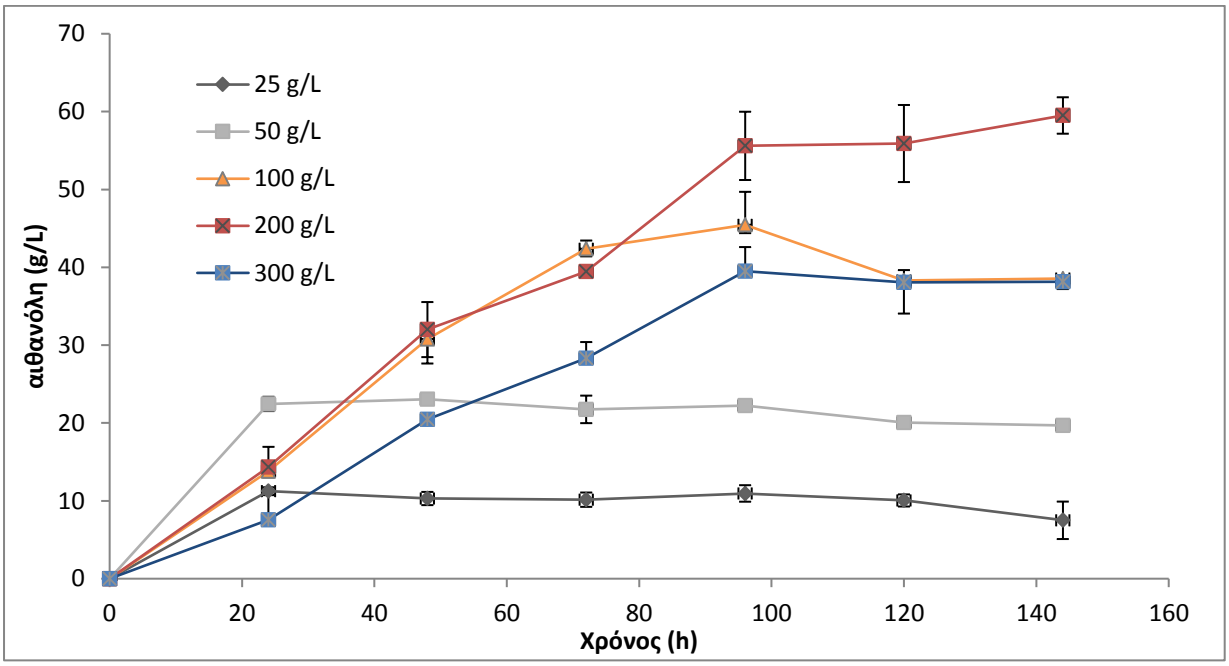
Συνοψίζοντας λοιπόν, μπορούν να διατυπωθούν τα εξής αποτελέσματα

- Δε φαίνεται να προκαλείται παρεμπόδιση στην παραγωγή αιθανόλης σε pH ήπια όξινο, ουδέτερο και ήπια αλκαλικό
- Ο *T. fermentans* φαίνεται να μπορεί να χρησιμοποιηθεί ικανοποιητικά για την παραγωγή αιθανόλης σε όλες τις εξεταζόμενες τιμές pH.
- Ως βέλτιστη τιμή προκύπτει η τιμή pH 6.0 καθώς εμφανίζει τη μεγαλύτερη τελική συγκέντρωση αιθανόλης, επιβεβαιώνοντας εν μέρη την αρχική υπόθεση που είχε γίνει ότι το βέλτιστο pH για την παραγωγή αιθανόλης θα είναι στην περιοχή 6-7.

Σε αντίστοιχα συμπεράσματα κατέληξαν και οι οι L.Y. Zhu et al. (46) αναζητώντας τις βέλτιστες συνθήκες επώασης και μέσου καλλιέργειας για την παραγωγή ενδοκυτταρικού λίπους από τον *T. fermentans*. Η καλύτερη απόδοση ενδοκυτταρικού λίπους σημειώθηκε για pH 6.5, αλλά παρατηρήθηκαν καλές παραγωγικότητες και για ήπια αλκαλικές συνθήκες. Γενικά, ο *T. fermentans* επιδεικνύει αντίστοιχη συμπεριφόρα με τις υπόλοιπες ζύμες, καθώς ανάλογα με τη θερμοκρασία, την παρουσία οξυγόνου και το στέλεχος η βέλτιστη περιοχή pH λειτουργίας τους είναι ανάμεσα στο 4.0-6.0 (77).

8.3 Επίδραση της αρχικής συγκέντρωσης γλυκόζης στην παραγωγή αιθανόλης από τον *T. fermentans*

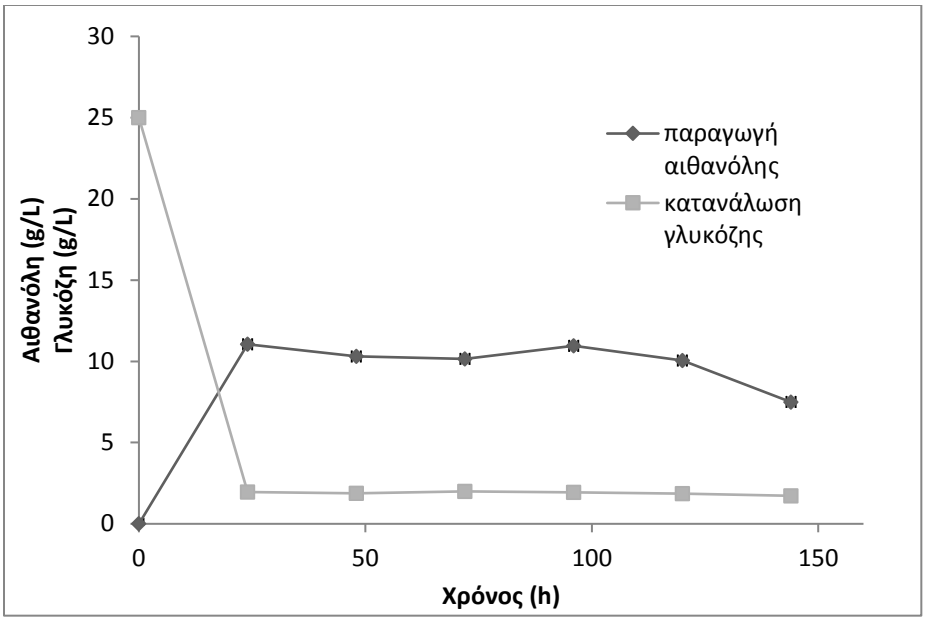
Σε αυτή τη σειρά πειραμάτων εξετάστηκε η επίδραση που έχει η αρχική συγκέντρωση γλυκόζης στην παραγωγή αιθανόλης από τον *T. fermentans.* Σκοπός ήταν να διερευνηθεί εάν παρουσιάζεται παρεμπόδιση σε υψηλές συγκεντρώσεις γλυκόζης και να βρεθεί η μέγιστη δυνατή ποσότητα αιθανόλης που μπορεί να παράξει ο μικροοργανισμός, εφαρμόζοντας και τα ευρήματα από τις προηγούμενες σειρές πειραμάτων που αφορούσαν στον υπολογισμό του βέλτιστου pH και της βέλτιστης πηγής αζώτου. Για το λόγο αυτό διεξήχθησαν πειράματα με αρχικές συγκεντρώσεις γλυκόζης 25, 50, 100, 200 και 300 g/L. Στο Διάγραμμα 16 παρουσιάζεται συνολικά η παραγωγή αιθανόλης στις παραπάνω συγκεντρώσεις.



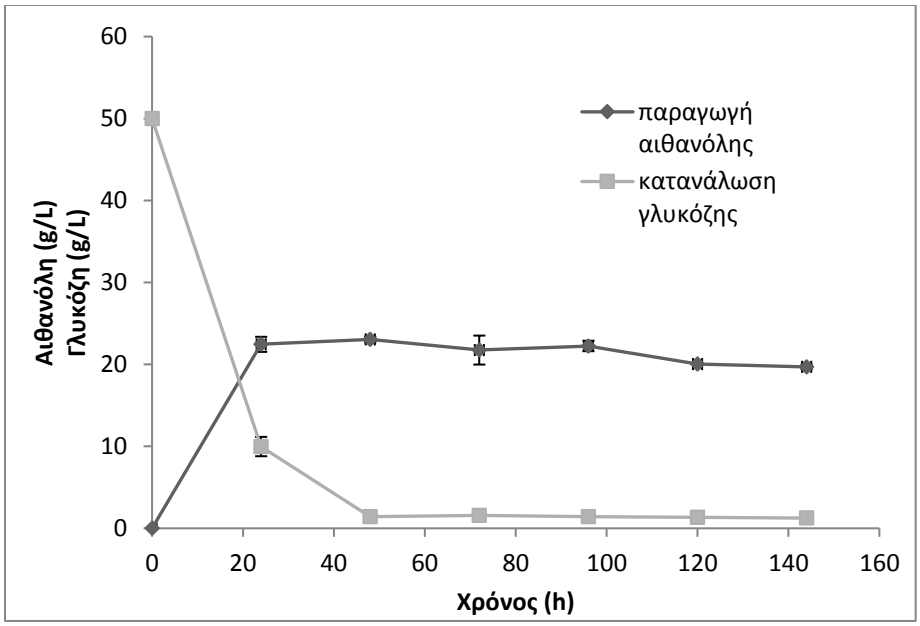
Διάγραμμα 17. Παραγωγή αιθανόλης με διαφορετικές αρχικές συγκεντώσεις γλυκόζης

Σύμφωνα με το παραπάνω διάγραμα είναι εύκολο να γίνει αντιληπτό ότι για όλες τις περιπτώσεις αρχικής συγκέντρωσης, η παραγωγή αιθανόλης αρχίζει αμέσως μετά τον εμβολιασμό και η μέγιστη τιμής της επιτυγχάνεται για αρχική συγκέντρωση 200 g/L φτάνοντας τα **59.5 g/L** στις 144h.

Στις καλλιέργειες με αρχική συγκέντρωση 25 g/L και 50 g/L η ζύμωση ολοκληρώνεται μέσα στις πρώτες εικοσιτέσσερις ώρες όπως φαίνεται στα Διαγράμματα 17 και 18 παρουσιάζοντας αρκετά καλούς συντελεστές απόδοσης που είναι **0.442 g/g** και **0.461 g/g** αντίστοιχα. Αξίζει να σημειωθεί ότι και πάλι παρουσιάζεται μικρή μείωση της συγκέντρωσης της αιθανόλης μετά την ολοκλήρωση της ζύμωσης, φαινόμενο που είχε παρατηρηθεί και στα αρχικά στάδια της έρευνας.

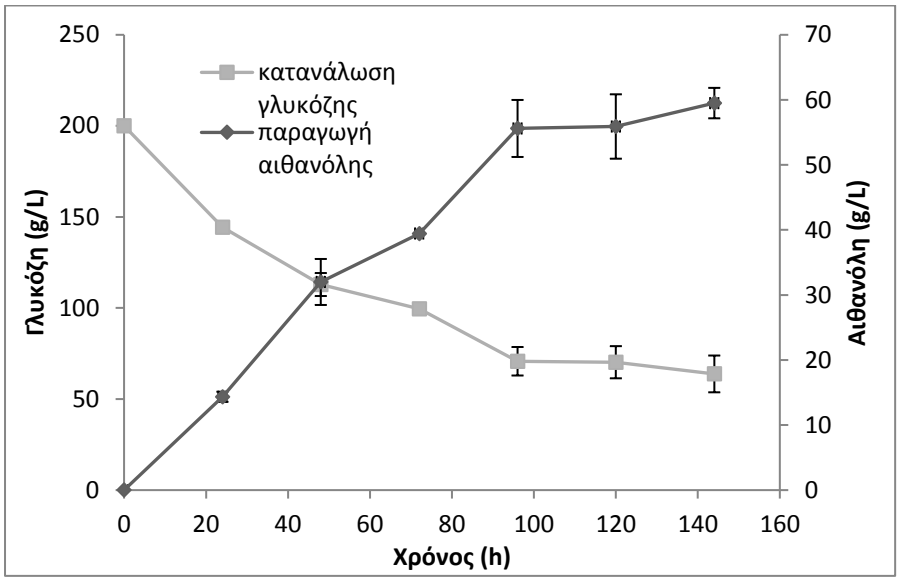


Διάγραμμα 18. Παραγωγή αιθανόλης και κατανάλωση σακχάρων σε καλλιέργεια με αρχική συγκέντρωση γλυκόζης 25 g/L

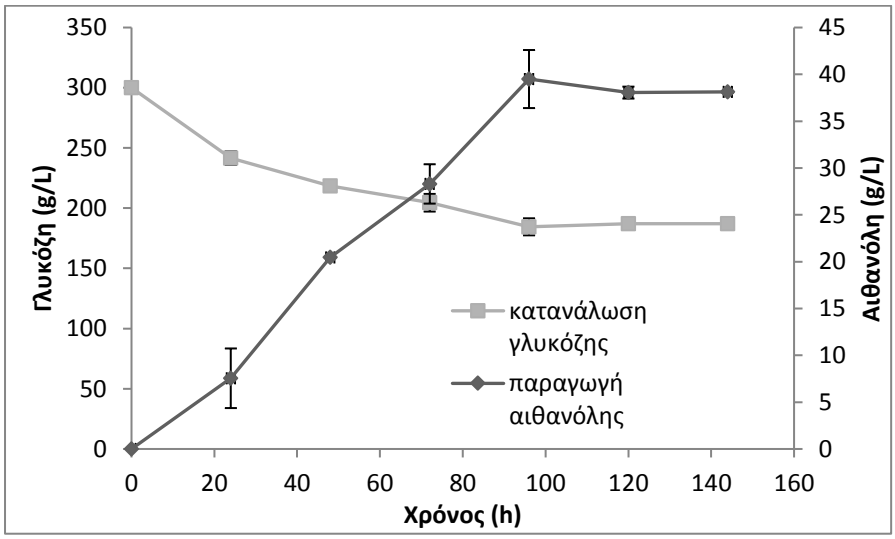


Διάγραμμα 19. Παραγωγή αιθανόλης και κατανάλωση σακχάρων σε καλλιέργεια με αρχική συγκέντρωση γλυκόζης 50 g/L

Στις καλλιέργειες με αρχική συγκέντρωση 200 και 300 g/L γλυκόζης ακολουθείται παρόμοια μεταξύ τους κινητική. Η αιθανόλη ακολουθεί μία σχεδόν εκθετική πορεία επιβραδύνοντας μετά τις 96 h, όπου και ολοκληρώνεται η ζύμωση. Σημαντικό όμως είναι το γεγονός ότι στην καλλιέργεια με αρχική συγκέντρωση 300 g/L παρατηρείται μείωση της συγκέντρωσης της αιθανόλης μετά τις 96h. Οι τελικές συγκεντρώσεις αιθανόλης είναι 59.5 g/L και 39.5 g/L αντίστοιχα.

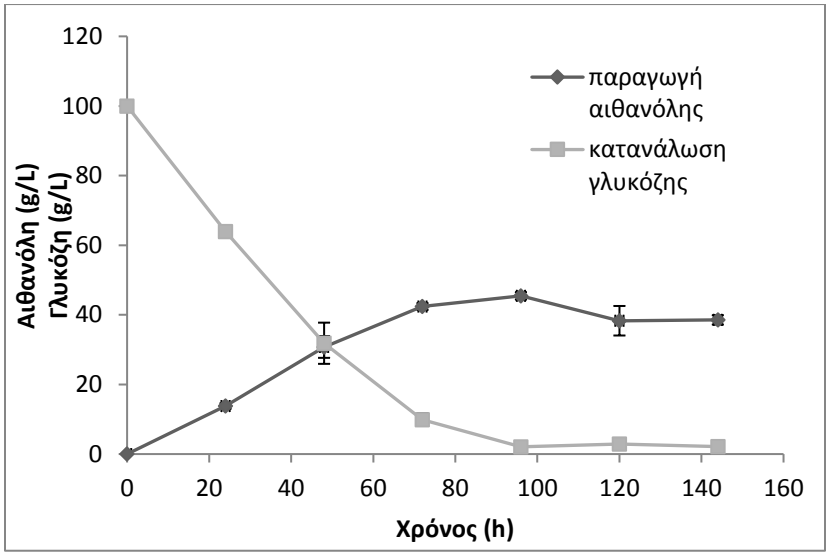


Διάγραμμα 20. Παραγωγή αιθανόλης και κατανάλωση σακχάρων σε καλλιέργεια με αρχική συγκέντρωση γλυκόζης 200 g/L



Διάγραμμα 21. Παραγωγή αιθανόλης και κατανάλωση σακχάρων σε καλλιέργεια με αρχική συγκέντρωση γλυκόζης 300 g/L

Στην καλλιέργεια με αρχική συγκέντρωση 100 g/L γλυκόζης ακολουθείται μία εκθετική πορεία παραγωγής αιθανόλης τις πρώτες 72 h επιβραδύνοντας στη συνέχεια με τη ζύμωση να ολοκληρώνεται στις 96 h. Η μέγιστη συγκέντρωση αιθανόλης φτάνει τα 45.45 g/L στι 72h. Στο Διάγραμμα 21 όπου περιγράφεται η κινητική παραγωγής αιθανόλης σε αυτή την περίπτωση, παρατηρείται μία μείωση της συγκέντρωσης της αιθανόλης τις τελευταίες 48 h της καλλιέργειας, όπως και στις περιπτώσεις με αρχικές συγκεντρώσεις 25, 50 και 300 g/L αρχικής συγκέντρωσης γλυκόζης.



Διάγραμμα 22. Παραγωγή αιθανόλης και κατανάλωση σακχάρων σε καλλιέργεια με αρχική συγκέντρωση γλυκόζης 100 g/L

Τα αποτελέσματα συνοψίζονται στον Πίνακα 9

Πίνακας 9. Αποτελέσματα επίδρασης αρχικής συγκέντωσης γλυκόζης

γλυκόζη (g/L)	αιθανόλη (g/L)	$Y_{p/s}$ (g/g)	μέγιστη παραγωγικότητα (g/L*h)	μέση παραγωγικότητα (g/L*h)
25	11.25 ± 3.32	0.442± 0.008	0.46 ± 0.14	0.46 ± 0.14
50	23.05 ± 0.35	**0.461 ± 0.007**	0.94 ± 0.04	0.48 ± 0.01
100	45.45 ± 1.06	0.455 ± 0.011	0.64 ± 0.07	0.47 ± 0.01
200	59.5 ± 2.34	0.298 ± 0.028	0.67 ± 0.07	0.41 ± 0.04
300	39.5 ± 1.23	0.132 ± 0.013	0.43 ± 0.01	0.41 ± 0.04

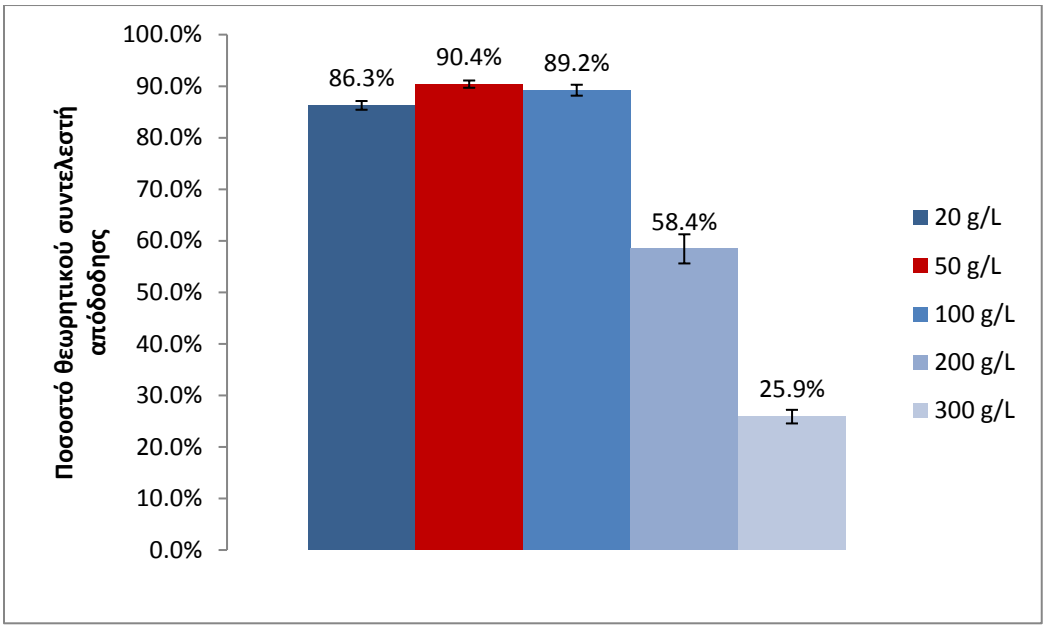
Από τη συγκεκριμένη σειρά πειραμάτων, αρκετά είναι τα συμπεράσματα που μπορούν να εξαχθούν.

1. Η μέγιστη παραγωγή αιθανόλης σημειώθηκε για αρχική συγκέντρωση γλυκόζης 200 g/L και ήταν 59.5 g/L με συντελεστή απόδοσης όμως μόλις 0.298 g/g.

2. Ο μεγαλύτερος συντελεστής απόδοσης σημειώθηκε για αρχική συγκέντρωση 50 g/L και ήταν **0.461 g/g** φτάνοντας το 90% του θεωρητικού συντελεστή. Στις καλλιέργειες με αρχικές συγκεντρώσεις 25g/L και 100 g/L παρατηρήθηκαν επίσης αρκετά καλοι συντελεστές ίσοι με το 82% και το 89% του θεωρητικού αντίστοιχα. Αντίθετα, στις καλλιέργειες με αρχικές συγκεντρώσεις 200 g/L και 300 g/L οι συντελεστές που παρατηρήθηκαν αντιστοιχούν μόλις στο 58.5% και στο 26% του θεωρητικού.

3. Οι πολυ χαμηλοί συντελεστές απόδοσης που επιτυγχάνονται για συγκεντρώσεις γλυκόζης μεγαλύτερες των 100 g/L υποδεικνύουν ότι υπάρχει κάποια παρεμπόδιση από το υπόστρωμα. Ωστόσο, αυτή είναι ήπιας μορφής καθώς όπως αποδείχτηκε υπάρχει παραγωγή αιθανόλης για συγκεντρώσεις γλυκόζης 200g/L και 300g/L. Στο ίδιο συμπέρασμα κατέληξαν και οι Ozmihci et al., (83) μελετώντας την ζύμωση ορού τυριού από τον *K.* marxianus, καθώς για συγκεντρώσεις σακχάρων μεγαλύτερες από 200 g/L, οι συντελεστές απόδοσης παρουσίασαν μείωση έως και 43%. Αυτό εξηγείται από το γεγονός ότι σε υψηλές συγκεντρώσεις σακχάρων παρατηρούνται υψηλές οσμωτικές πιέσεις και υψηλό κόστος συντήρησης των κυττάρων (83). Στην περίπτωση αρχικής συγκέντρωσης 200 g/L, μπορεί να υπάρχει και παρεμπόδιση από την παραγώμενη αιθανόλη καθώς έχει φτάσει σε συγκέντρωση 5% β/ο. Το ενδεχόμενο αυτό θα αξιολογηθεί σε επόμενη σειρά πειραμάτων. Συνεπώς, ο *T. fermentans* μπορεί παράξει αιθανόλη με ικανοποιητικούς συντελεστές απόδοσης με αρχική συγκέντρωση γλυκόζης στην περιοχή των 25-100 g/L, με ως βέλτιση να αξιολογείται η αρχική συγκέντρωση 50 g/L για τρεις λόγους 1) Παρατηρήθηκε ο καλύτερος συντελεστής απόδοσης, 2) Παρατηρήθηκαν η μέγιστη παραγωγικότητα και η καλύτερη μέση παραγωγικότητα,

3) Η ζύμωση ολοκληρώνεται τις πρώτες εικοσιτέσσερις ώρες. Είναι συνεπώς μία πολύ γρήγορη διεργασία και αποδοτική διεργασία.



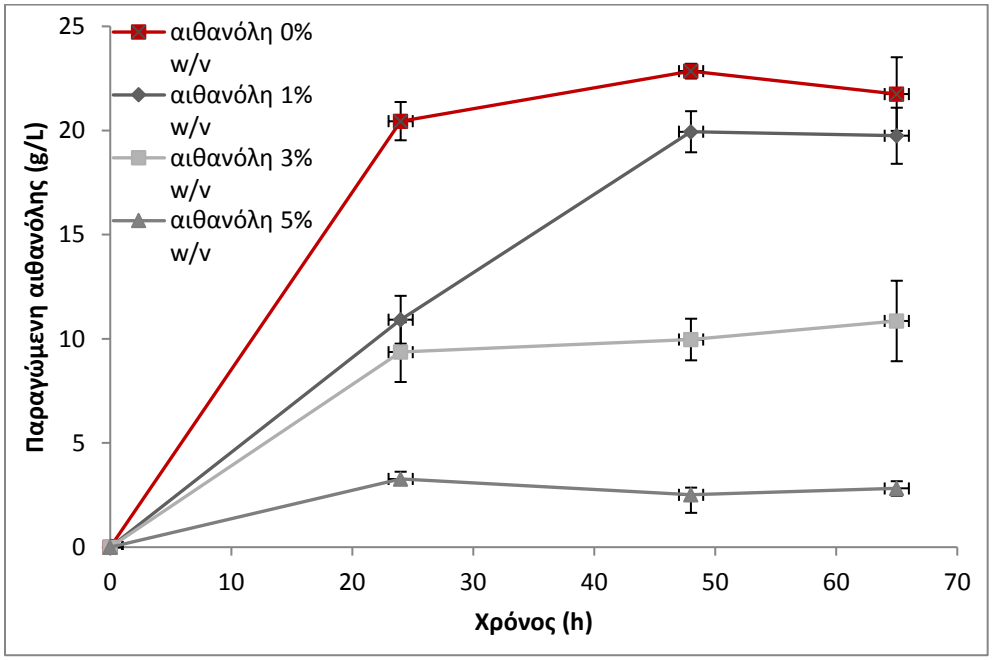
Σχήμα 3. Διακύμανση του συντελεστή απόδοσης σε καλλιέργειες με διαφορετική αρχική συγκέντρωση γλυκόζης

4. Μία τελευταία αλλά αξίσου σημαντική παρατήρηση είναι η μείωση της συγκέντρωσης της αιθανόλης που έχει παρατηρηθεί μετά το πέρας της ζύμωσης σε αρκετές από τις σειρές πειραμάτων που έχουν αναλυθεί μέχρις στιγμής. Αυτό το δεδομένο μπορεί να υποδεικνύει ότι ο *T. fermentans* ακολουθεί διαύξιμη ανάπτυξη. Το φαινόμενο αυτό παρατηρήθηκε από τον Jacques Monod και είναι η ανάπτυξη του μικροοργανισμού σε δύο φάσεις προσαρμόζοντας το φαινότυπό του, όταν προστεθεί και δεύτερο υπόστρωμα στο μέσο ανάπτυξης. Αφού εξαντληθεί η μία από τις πηγές άνθρακα, τα κύτταρα προσαρμόζουν τις μεταβολικές τους δραστηριότητες, έτσι ώστε να αξιοποιήσουν μία δεύτερη πηγή άνθρακα. Η πρώτη πηγή άνθρακα είναι πιο εύκολα αποικοδομίσιμη από τη δεύτερη και η παρουσία της καταστέλλει τη σύνθεση των ενζύμων που απαιτούνται για το μεταβολισμό του δεύτερου υποστρώματος. (59) Στη συγκεκριμένη περίπτωση πιθανότοτα ο *T. fermentans* ύστερα από τον περιορισμό της γλυκόζης στο μέσο ανάπτυξης, συντηρείται οξειδώνοντας με πολύ αργούς ρυθμούς τη

διαθέσιμη αιθανόλη. Το συγκεκριμένο πρότυπο διαύξιμης ανάπτυξης έχει παρατηρηθεί και στον *Saccharomyces cerevisiae* (60) πράγμα που ενισχύει τη θεωρία αυτή, καθώς είναι ένα φαινόμενο που παρατηρείται στη φύση. Χρειάζεται πάντως περισσότερη έρευνα προκειμένου να επιβεβαιωθεί η υπόθεση αυτή.

8.4 Μελέτη παραγωγής αιθανόλης από τον *Trichosporon fermentans* σε αυξανόμενες αρχικές συγκεντρώσεις αιθανόλης.

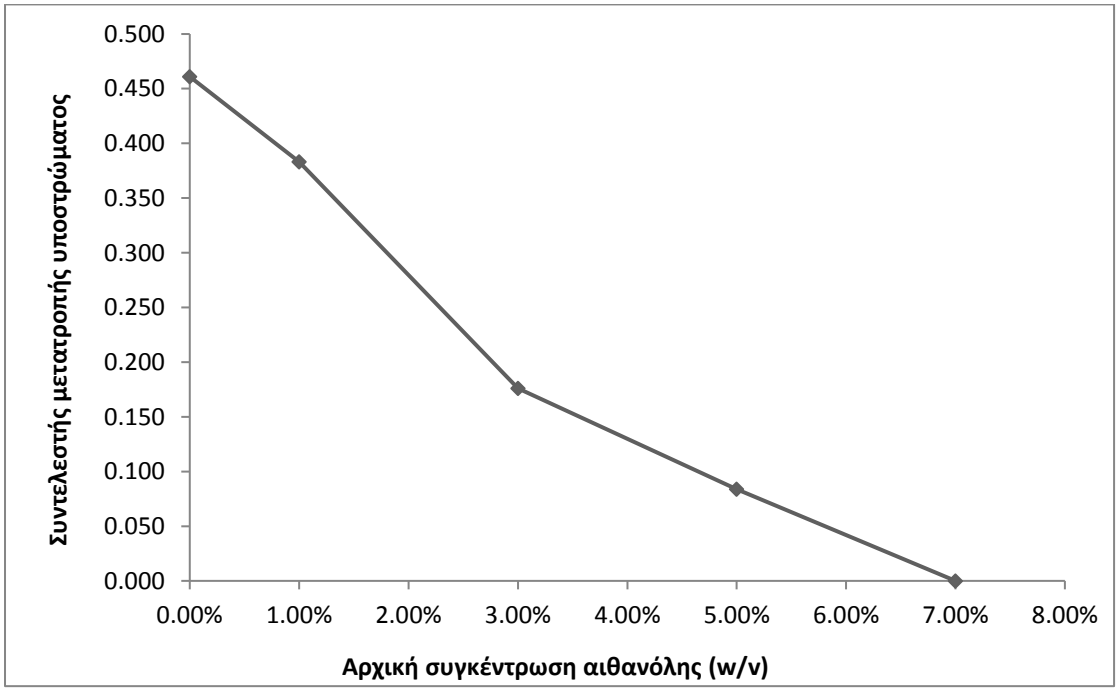
Σε αυτή τη σειρά πειραμάτων εξετάστηκε η επίδραση της αιθανόλης. Για να μελετηθεί η επίδραση της αιθανόλης στην ικανότητα του *T. fermentans* να μεταβολίζει τη γλυκόζη σε αιθανόλη , ο μικροοργανισμός αναπτύχθηκε μικροαερόβια σε βυθισμένες καλλιέργειες στις οποίες προστέθηκαν διαφορετικές συγκεντρώσεις αιθανόλης, αξιοποιώντας πάντα τα αποτελέσματα των προηγούμενων σειρών πειραμάτων. Οι αρχικές συγκεντρώσεις αιθανόλης που εξετάστηκαν ήταν 0, 1, 3, 5, 7 και 9% w/v. Στο Διάγραμμα 22 παρουσιάζεται η καθαρή παραγωγή αιθανόλης από τη ζύμη για τις διαφορετικές συγκεντρώσεις αιθανόλης που είχαν προστεθεί αρχικά.



Διάγραμμα 23. Επίδραση της αιθανόλης στη ζύμωση της γλυκόζης

Για τις συγκεντρώσεις 7% w/v και 9% w/v δεν παρατηρήθηκε παραγωγή αιθανόλης, οπότε δεν παρουσιάζονται στο γράφημα. Όπως είναι εμφανές από το παραπάνω διάγραμμα, η παρουσία αιθανόλης στο μέσο καλλιέργειας επηρεάζει σε μεγάλο βαθμό την παραγωγή αιθανόλης από το μικροοργανισμό. Η επίδραση φαίνεται να είναι ισχυρότερη από 3% w/v και πάνω, ενώ για αρχική συγκέντρωση από 1% w/v η τελική συγκέντρωση της παραχθείσας αιθανόλης είναι 19.94 g/L σε σχέση με τα 23.05 g/L που παράγονται από καλλιέργεια με μηδενική αρχική συγκέντρωση παρουσιάζοντας μία μείωση της τάξης του 11.2%. Η μείωση που εμφανίζεται για αρχικές συγκεντρώσεις 3% και 5% w/v είναι ακόμα μεγαλύτερη και φτάνει το 42% και 87.5% αντίστοιχα. Για αυξανόμενες συγκεντρώσεις αιθανόλης, η παραγωγή μειώνεται περισσότερο και μηδενίζεται τελικά για συγκεντρώσεις 7% w/v και άνω.

Εμφανής είναι και η επίδραση στην παραγωγικότητα και το συντελεστή μετατροπής. υποστρώματος καθώς για αρχικές συγκεντρώσεις 1%, 3% και 5% w/v ο τελευταίος εμφανίζει μείωση 16.9%, 61.9% και 81.8% αντίστοίχα, μείωση που παρουσιάζεται σχηματικά στο Διάγραμμα 23. Αξίζει να σημειωθεί ότι η συνολική συγκέντρωση αιθανόλης στην οποία ήταν εκτεθειμένος ο μικροοργανισμός ήταν το άθροισμα της αρχικά προστιθέμενης και της παραγόμενης αιθανόλης.



Διάγραμμα 24. Διακύμανση του συντελεστή μετατροπής υποστρώματος σε αυξανόμενες αρχικές συγκεντρώσεις αιθανόλης

Τα αποτελέσματα αυτής της σειράς πειραμάτων συνοψίζονται στον παρακάτω πίνακα

Πίνακας 10. Αποτελέσματα της επίδρασης αιθανόλης στη ζύμωση από τον *T. fermentans*

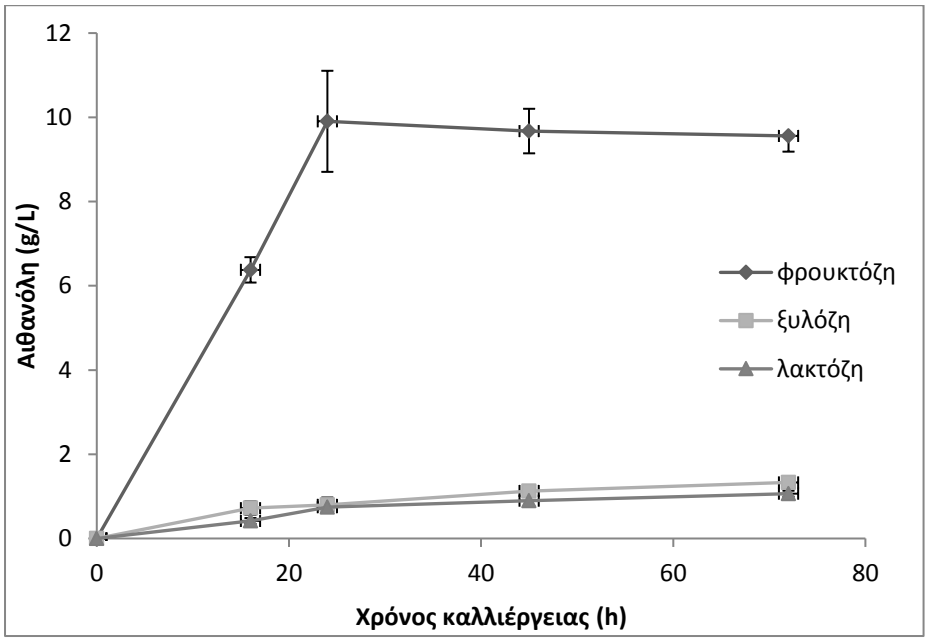
Αρχική συγκέντρωση αιθανόλης (%w/v)	αιθανόλη (g/L)	$Y_{p/s}$	μέγιστη παραγωγικότητα (g/L*h)	μέση παραγωγικότητα (g/L*h)
0	22.45±0.35	0.461±0.007	0.94	0.48
1	19.94±0.99	0.383±0.057	0.45	0.30
3	13.03±1.53	0.175±0.008	0.43	0.20
5	2.82±0.52	0.084±0.002	0.14	0.05

Σύμφωνα με όλα τα παραπάνω εξάγεται το συμπέρασμα ότι η ζύμωση από τον *T. fermentans* παρεμποδίζεται ισχυρά από την παρουσία αιθανόλης στο περιβάλλον του. Το αποτέλεσμα αυτό συμβαδίζει με μελέτες που έχουν δείξει ότι οι περισσότεροι μικροοργανισμοί παρεμποδίζονται από την παρουσία αιθανόλης στο περιβάλλον τους (63), με άλλους να επιδεικνύουν υψηλότερη αντοχή, όπως για παράδειγμα τα μη γενετικά τροποποιημένα στελέχη του *Saccharomyces cerevisiae* που αρχίζουν να παρεμποδίζονται σε συγκεντρώσεις 8-10% w/v αιθανόλης με τη μεταβολική τους δραστηριότητα να σταματάει σσε συγκέντρωση 13% (61), και άλλους να επιδεικνύουν χαμηλότερη ή παρόμοια ανοχή, όπως ο *Pichia stipitis* και ο *Fusarium oxysporum* (62) (69). Παρόλα αυτά, αξιολογείται ότι ο *T. fermentans* μπορεί να χρησιμοποιηθεί σε περιβάλλοντα με χαμηλές συγκεντρώσεις αιθανόλης, κάτω από 3% w/v.

8.5 Χρήση διαφορετικών υποστρωμάτων για την παραγωγή αιθανόλης από βυθισμένες καλλιέργειες του *T. fermentans*

Στα προηγούμενα κεφάλαια αναζητήθηκαν οι συνθήκες που μπορούν να βελτιστοποιήσουν την παραγωγή αιθανόλης από τον *T. fermentans.* Ωστόσο, η πηγή άνθρακα που εξετάστηκε ήταν σχεδόν αποκλειστικά η γλυκόζη. Σε αυτή τη σειρά πειραμάτων διερευνήθηκε η ικανότητα αφομείωσης και διαφορετικών υποστρωμάτων για την παραγωγή

αιθανόλης. Οι πηγές άνθρακα που εξετάστηκαν ήταν η φρουκτόζη, η ξυλόζη, η αραβινόζη και η λακτόζη. Η επιλογή των συγκεκριμένων υποστρωμάτων έγινε λόγω της ύπαρξής τους σε λιγνινοκυτταρινούχες ή άλλες πηγές βιομάζας, έτσι ώστε να γίνει μία πρώτη αξιολόγηση σχετικά με το κατά πόσο είναι ικανός ο *T. fermentans* να χρησιμοποιηθεί για τη ζύμωση τέτοιων υποστρωμάτων. Σε όλες τις περιπτώσεις οι αρχικές συγκεντρώσεις ήταν 25 g/L.

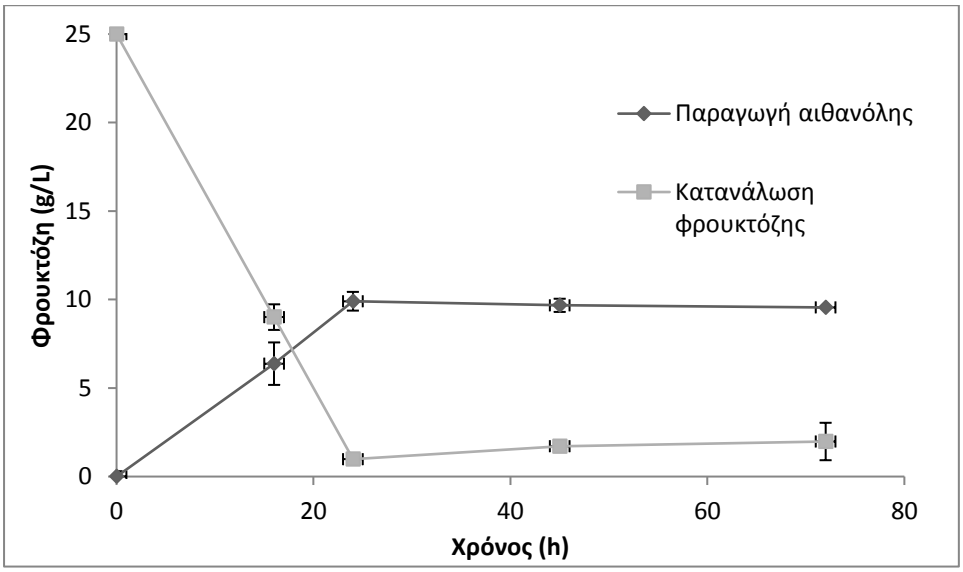


Διάγραμμα 25. Παραγωγή αιθανόλης από φρουκτόζη, ξυλόζη και λακτόζη

Όπως είναι εμφανές από το παραπάνω διάγραμμα, η μοναδική από τις τέσσερις πηγές που μπορεί να αξιοποιηθεί ικανοποιητικά είναι η φρουκτόζη. Να σημειωθεί ότι η αραβινόζη δεν παρουσιάζεται στο Διάγραμμα 24, καθώς δεν παρατηρήθηκε παραγωγή αιθανόλης από την πηγή αυτή. Η παραγωγή αιθανόλης από φρουκτόζη ακολουθεί παρόμοια κινητική με αυτή που παρατηρήθηκε για αντίστοιχη συγκέντρωση γλυκόζης σε προηγούμενη σειρά πειραμάτων.

Η ζύμωση αρχίζει αμέσως μετά τον εμβολιασμό και ολοκληρώνεται μέσα σε 24 ώρες, δηλαδή γρήγορα αλλά με μέτρια αποδοτικότητα, καθώς η τελική συγκέντρωση αιθανόλης φτάνει τα **10.05 g/L** και ο συντελεστής μετατροπής υποστρώματος υπολογίζεται στα **0.402 g/g** στο 79% του θεωρητικού. Ενδεικτικά αναφέρεται ότι στο αντίστοιχο πείραμα με 25 g/L αρχική

συγκέντρωση γλυκόζης παράχθηκαν 11.25 g/L αιθανόλη και ο συντελεστής $Y_{p/s}$ ήταν ίσος με 0.442 g/g. Η μέγιστη παραγωγικότητα έφτασε τα 0.42 g/L*h, αρκετά καλή σε σχέση με την παραγωγικότητα που παρουσίασε η γλυκόζη σε ίδια συγκέντρωση στο θρεπτικό μέσο που ήταν 0.46 g/L*h. Παρακάτω παρουσιάζεται η παραγωγή αιθανόλης με χρήση φρουκτόζης σε συνάρτηση με την πορεία κατανάλωσης σακχάρων.

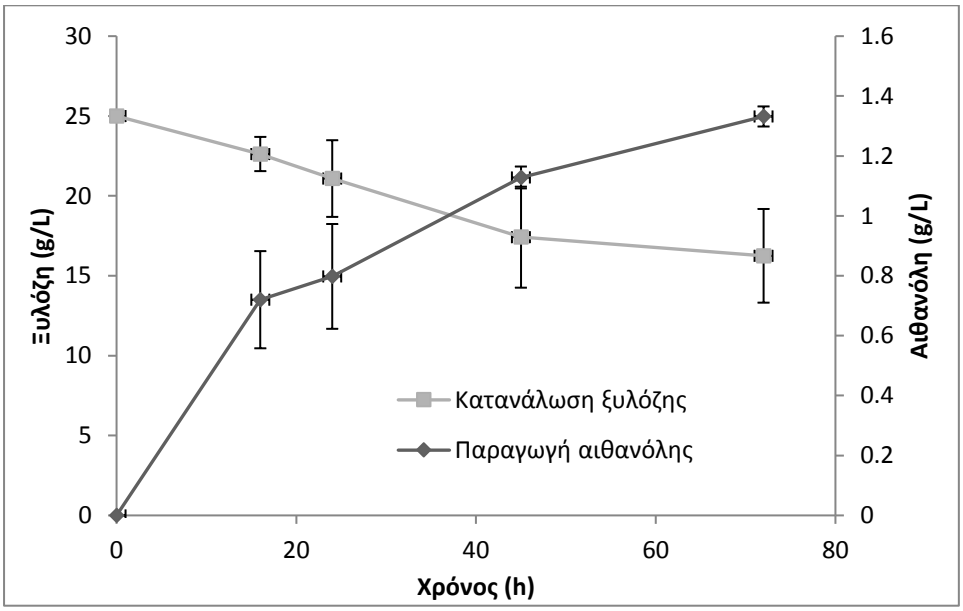


Διάγραμμα 26. Παραγωγή αιθανόλης και κατανάλωση σακχάρων σε καλλιέργεια με φρουκτόζη

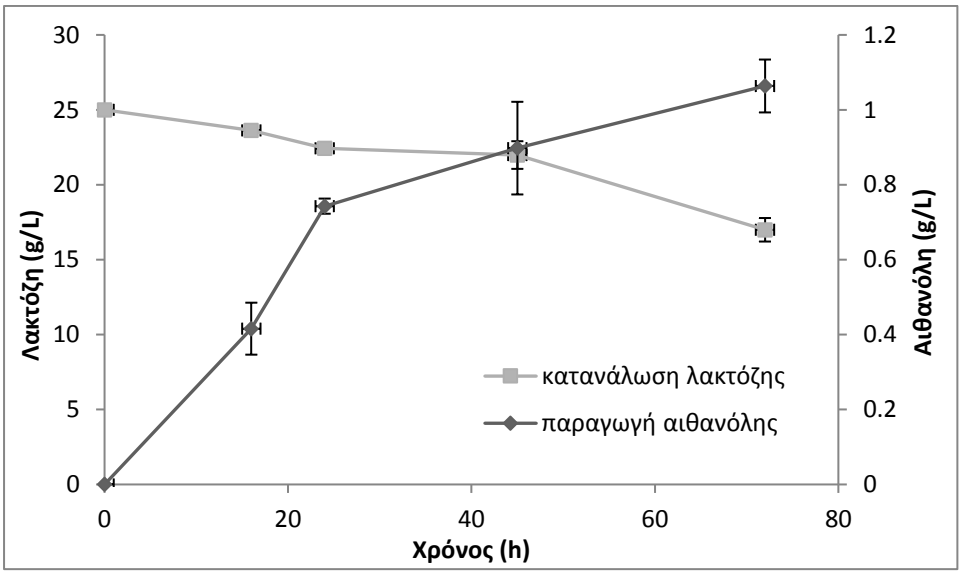
Ένα ακόμα φαινόμενο που παρατηρείται από το παραπάνω διάγραμμα, είναι ότι μετά την ολοκλήρωση της ζύμωσης παρατηρείται οριακή αλλά μείωση παρόλα αυτά της συγκέντρωσης της αιθανόλης στην καλλιέργεια. Η παρατήρηση αυτή έρχεται να προστεθεί στα ευρήματα που παρουσιάστηκαν σε προηγούμενο κεφάλαιο και είναι ένα ακόμη δεδομένο που ενισχύει την υπόθεση ότι ο *T. fermentans* ακολουθεί διαύξιμη ανάπτυξη οξειδώνοντας την αιθανόλη μετά το πέρας της ζύμωσης.

Οι άλλες τρεις πηγές άνθρακα δεν κρίνονται ως ικανοποιητικές για την παραγωγή αιθανόλης από τον *T. fermentans*. Μία προκαταρκτική έρευνα σχετικά με την αφομείωση της ξυλόζης είχε ήδη γίνει σε προηγούμενη σειρά πειραμάτων και παρουσιάστηκε σε προηγούμενο κεφάλαιο, ωστόσο κρίθηκε σκόπιμο να επανεξεταστεί η περίπτωσή της σε

συνδιασμό με τις περιπτώσεις της αραβινόζης, της λακτόζης και της ξυλόζης. Όπως αναφέρθηκε παραπάνω η χρήση της αραβινόζης παρουσίασε μηδενική παραγωγή αιθανόλης και μηδενική κατανάλωση υποστρώματος. Στα Διαγράμματα 26 και 27 παρουσιάζεται αναλυτικά η πορεία της ζύμωσης της ξυλόζης και της λακτόζης.



Διάγραμμα 27. Παραγωγή αιθανόλης από ξυλόζη



Διάγραμμα 28. Παραγωγή αιθανόλης από λακτόζη

Η κατανάλωση σακχάρων και η παραγωγή αιθανόλης αρχίζουν αμέσως μετά τον εμβολιασμό και ολοκληρώνονται στις 72h. Ωστόσο η παραγωγή αιθανόλης είναι πάρα πολύ μικρή και στις δύο περιπτώσεις φτάνοντας μόλις τα 1.34 g/L για την ξυλόζη και τα 1.05 g/L για τη λακτόζη. Οι συντελεστές μετατροπής υποστρώματος ήταν επίσης απογοητευτικοί, καθώς υπολογίστηκαν στο 5% και 4% αντίστοιχα. Αυτά τα αποτελέσματα έρχονται σε ασυμφωνία με προηγούμενες μελέτες (46)(65) σύμφωνα με τις οποίες ο *T. fermentans* μπόρεσε να αφομειώσει τόσο την ξυλόζη όσο και τη λακτόζη που βρίσκονταν στο μέσο σε ικανοποιητικό βαθμό. Οι συγκεκριμένες μελέτες, ωστόσο, εξέταζαν την ικανότητα παραγωγής ενδοκυτταρικού λίπους από τον *T. fermentans* σε συνθήκες αερόβιες και όχι μικροαερόβιες, όπως είναι η περίπτωση εδώ. Επομένως, εφόσον ο *T. fermentans* δείχνει να έχει την ίκανοτητα παραγωγής ενζύμων που να μεταβολίζουν τη λακτόζη και την ξυλόζη (76), ίσως η μεταβολική αυτή δραστηριότητα να καταπιέζεται απουσία οξυγόνου. Αντίστοιχη συμπεριφορά έχει παρατηρηθεί σε γενετικά τροποποιημένο στέλεχος του *S. cerevisiae*, στο οποίο εκφράζονταν, ετερόλογα, γονίδια που προήγαγαν το μεταβολισμό της ξυλόζης και τα οποία παρουσίαζαν πολύ μειωμένη ενεργότητα απουσία οξυγόνου (73). Το ίδιο μπορεί να υποστηριχθεί και για την αραβινόζη, η οποία δεν καταναλώθηκε καθόλου στην παρούσα έρευνα, αλλά βάσει μελέτης που διερευνούσε την παραγωγή ενδοκυτταρικού λίπους από την αερόβια ζύμωση βαγάσσης σακχαροκάλαμου, η περιεχόμενη ποσότητα αραβινόζης καταναλώθηκε σε ποσοστό 80% (66). Ωστόσο, για την επιβεβαίωση των παραπάνω πρέπει να διεξαχθεί περισσότερη εργαστηριακή έρευνα.

Τα αποτελέσματα της ζύμωσης διαφορετικών σακχάρων παρουσιάζονται συνοπτικά στον Πίνακα 11

Πίνακας 11. Αποτελέσματα χρήσης διαφορετικών σακχάρων για την παραγωγή αιθανόλης

Πηγή άνθρακα	Αιθανόλη (g/L)	$Y_{p/s}$ (g/g)	Μεγιστη παραγωγικότητα (g/L*h)
φρουκτόζη	10.04±1.20	0.402±0.003	0.42±0.01
ξυλόζη	1.34±0.03	0.053±0.001	0.03±0.01
λακτόζη	1.05±0.05	0.042±0.002	0.03±0.01
αραβινόζη	-	-	-

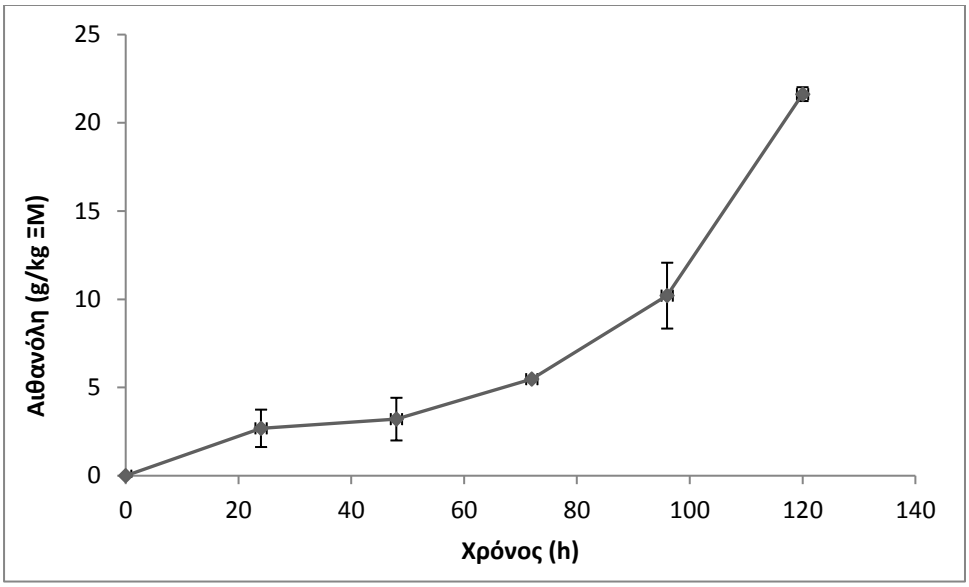
8.6 Συγκαλλιέργεια *T.fermentans* και *F. oxysporum* σε ρευστοποιημένο πλούσιο σε ημικυτταρίνη άχυρο σίτου.

Στα προηγούμενα κεφάλαια εξετάστηκε η ικανότητα παραγωγής αιθανόλης από τον *T. fermentans* και διάφοροι παράγοντες που μπορεί να επηρεάζουν την ικανότητα αυτή. Ωστόσο, όλες οι σειρές πειραμάτων πραγματοποιήθηκαν σε καθαρές πηγές άνθρακα. Προκειμένου να εξακριβωθούν οι δυνατότητες του μικροοργανισμού σε ένα πιο σύνθετο υπόστρωμα, έγιναν καλλιέργειες σε προκατεργασμένο άχυρο σίτου πλούσιο σε ημικυτταρίνη (High Hemicellulose Pretreated Wheat Straw, HHPWS). Το άχυρο είχε προκατεργαστεί και υδρολυθεί με τρόπο που περιγράφεται στο κεφάλαιο "Μέθοδοι και Υλικά" και οι τελικές συγκεντρώσεις σακχάρων που μετρήθηκαν μετά την ρευστοποίηση με θερμοένζυμα παρουσιάζονται στον Πίνακα 4

Πίνακας 4. Συγκεντρώσεις σακχάρων στο HHPWS μετά από προκατεργασία και υδρόλυση

Σάκχαρα	Άχυρο σίτου 23% DM
Συνολικα σακχαρα g/L	167.8
Υδρολυμένα σακχαρα g/L	58.6±2.6
Ποσοστό υδρολυμένων	34.9%
Υδρολυμένη γλυκόζη g/L	27.4±1.8
Υδρολυμένη ξυλόζη g/L	5.9±0.4

Στο υλικό αυτό πραγματοποιήθηκε καλλιέργεια ζύμωσης του *T.fermentans* για πέντε μέρες, η πορεία της οποίας απεικονίζεται στο Διάγραμμα 28

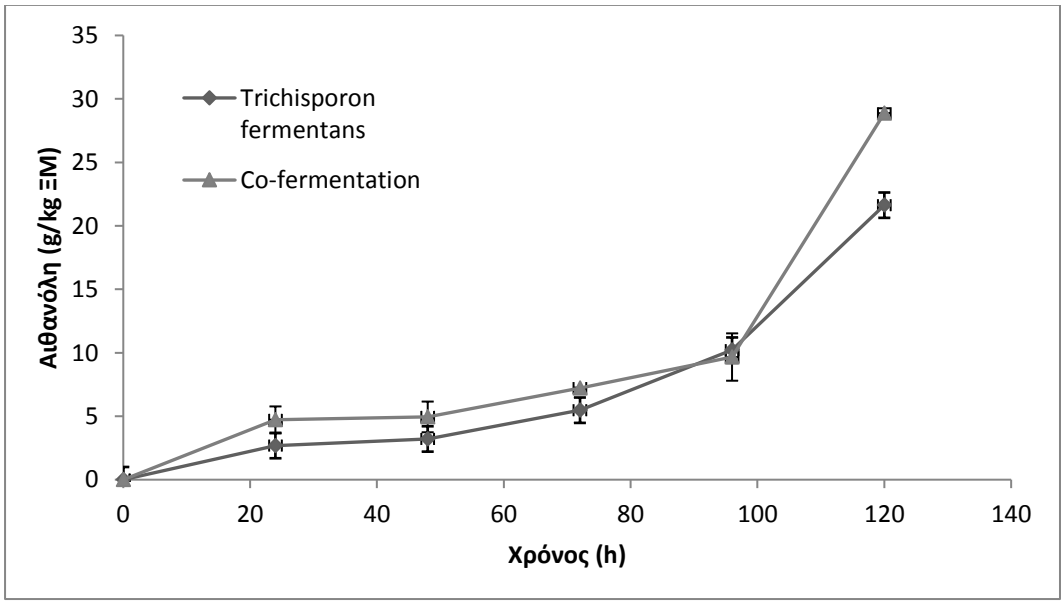


Διάγραμμα 29. Παραγωγή αιθανόλης από τον *T. fermentans* σε υδρολυμένο HHPWS

Από το διάγραμμα γίνεται εμφανές ότι η παραγωγή αιθανόλης αρχίζει αμέσως μετά τον εμβολιασμό, ωστόσο για τις πρώτες 48 ώρες υπάρχει μία λανθάνουσα φάση. Κάτι τέτοιο δεν είχε παρατηρηθεί στις καλλιέργειες του *T.fermentans* σε καθαρές πηγές άνθρακα. Δεν είναι σαφές γιατί συμβαίνει κάτι τέτοιο καθώς σε μελέτες που εξετάζουν την παραγωγή αιθανόλης από υδρολυμένα λιγνινοκυτταρινούχα υποστρώματα δεν έχει παρατηρηθεί τέτοια λανθάνουσα φάση, αντίθετα οι ζυμώσεις ήταν γρήγορες ακολουθώντας εκθετική πορεία τις πρώτες 48-72h (67) (68). Ενδέχεται ο μικροοργανισμός να χρησιμοποίησε το χρόνο αυτό για να προσαρμοστεί στο περιβάλλον του. Η παραγωγικότητα αυξάνεται με το χρόνο φτάνοντας τα **0.18 g/kg ΞΜ *h** την πέμπτη μέρα της ζύμωσης. Η τελική συγκέντρωση αιθανόλης που επιτυγχάνεται είναι **21.63 g/Kg ΞΜ αχύρου**. Αυτό οδήγησε σε μία απόδοση 29% υπολογίζοντας τη συνολική ποσότητα υδρολυμένων σακχάρων που περιέχονταν στο HHPWS, μία μέτρια προς χαμηλή απόδοση δεδομένου ότι η μέγιστη θεωρητική είναι 51.1%. Ωστόσο αυτό αυτό εξηγείται καθώς η συγκεκριμένη πρώτη ύλη ήταν πλούσια σε ημικυτταρίνη, με αποτέλεσμα μετά την υδρόλυση της να απελευθερώθηκαν αρκετές πεντόζες, τις οποίες όπως αποδείχτηκε σε προηγούμενο κεφάλαιο ο *T.fermentans* δεν μπορεί να χρησιμοποιήσει ικανοποιητικά για την παραγωγή αιθανόλης. Ένας άλλος παράγοντας που πιθανότητα επηρέασε την απόδοση της ζύμωσης ήταν η ύπαρξη γνωστών παρεμποδιστών όπως,

υδρόξυ-μέθυλο-φουρφουράλης, φαινολών και οξικού οξέος που δημουργήθηκαν κατά τη διάρκεια της προκατεργασίας του αχύρου σίτου

Για το λόγο αυτό αποφασίστηκε να εξεταστεί κατά πόσο μπορεί να βελτιωθεί η ικανότητα παραγωγής αιθανόλης από HHPWS με τη "βοήθεια" του *F. oxysporum*. Η επιλογή του συγκεκριμένου στελέχους έγινε λόγω της αποδεδειγμένης δυνατότητας που έχει να ζυμώνει την κυτταρίνη και την ημικυτταρίνη προς αιθανόλη (69) (70). Το ενζυμικό σύστημα που εκκρίνεται από αυτό τον μύκητα είναι πλούσιο σε κυτταρινάσες αλλά και ημικυτταρινάσες που μπορούν να ενισχύσουν την υδρόλυση του υλικού, ενώ ταυτόχρονα μπορεί κα χρησιμοποιεί τόσο εξόζες όσο και πεντόζες για την παραγωγή αιθανόλης (71). Για τη συγκαλλιέργεια σε HHPWS χρησιμοποιήθηκε 5% εμβόλιο από προκαλλιέργεια *T.fermentans* και 50 mg/g ΞΜ φυγοκεντρημένα κύτταρα του *F. oxysporum.* Η ζύμωση μελετήθηκε για διάστημα 120h. Η πορεία παραγωγής αιθανόλης από την συγκαλλιέργεια παρουσιάζεται στο Διάγραμμα 29 συγκριτικά με την πορεία που ακολουθήσε η παραγωγή από τον *T.fermentans* στο ίδιο μέσο.



Διάγραμμα 30. Παραγωγή αιθανόλης από καλλιέργεια *T. fermentans* και από συγκαλλιέργεια *T. fermentans* και *F. oxysporum*

Στις πρώτες 48h παρατηρείται η ίδια λανθάνουσα φάση που αναφέρθηκε για την περίπτωση του *T.fermentans* και εξηγήθηκε παραπάνω. Όσον αφορά τον *F. oxysporum* έχει ήδη αναφερθεί σε προηγούμενες μελέτες ότι ο μύκητας έχει πολύ αργούς μεταβολικούς ρυθμούς κατανάλωσης σακχάρων προς παραγωγή αιθανόλης (53). Η παραγωγικότητα αρχίζει και σε αυτή την περίπτωση να αυξάνεται μετά τις 48h φτάνοντας στις 120h τα **0.24 g/kg*h** που ήταν και η μέγιστη τιμή που παρατηρήθηκε. Η μέγιστη συγκέντρωση αιθανόλης που παρατηρήθηκε ήταν **28.87 g/kg** σημειώνοντας αύξηση κατά 33.5%. Αντίστοιχα ήταν και τα αποτελέσματα για τον συντελεστή μετατροπής υποστρώματος, καθώς με βάση τα υδρολυμένα σάκχαρα υπολογίστηκε στα **0.39 g/g** σημειώνοντας αύξηση 25% και φτάνοντας το 75% του μέγιστου θεωρητικού. Συνολικά, η επίδραση του *F. oxysporum* και του ενζυμικού του συστήματος κρίνεται ευεργετική. Η αυξημένη τελική συγκέντρωση αιθανόλης, οφείλεται μεν στην κατανάλωση της ήδη διαθέσιμης ξυλόζης από τον μύκητα, αλλά ενδεχομένως και στην απελευθέρωση και κατανάλωση ξυλόζης από την ημικυτταρίνη. Τα αποτελέσματα αυτά έρχονται σε συμφωνία με τη βιβλιογραφία, καθώς συστήματα συγκαλλιέργειας ζύμης και μυκητών οδηγούν σε καλύτερη αξιοποίηση λιγνινοκυτταρινούχων πρώτων υλών. (53) (67).

Η όλη διεργασία θα μπορούσε να χαρακτηριστεί ως Ταυτόχρονη Σακχαροποίηση και Ζύμωση με Μικτή Καλλιέργεια (Simultaneous Saccharification and Co-Fermentation, SSCF) καθώς τα θερμοένζυμα που τοποθετήθηκαν κατά τη ρευστοποίηση του HHPWS και τα παραγώμενα από τον *F. oxysporum* ένζυμα συνέχισαν να υδρολύουν τη βιομάζα κατά τη διάρκεια της ζύμωσης. Συνολικά, παρατηρήθηκε αύξηση της παραγώμενης αιθανόλης και της απόδοσης σε σχέση με τη χρήση μόνο του *T.fermentans*. Τα αποτελέσματα παρουσιάζονται στον παρακάτω πίνακα.

Πίνακας 12. Αποτελέσματα ζύμωσης σε HHPWS 23% ΞΜ

Αξιολογούμενο σύστημα	αιθανόλη (g/kg)	Y_H (g/g)*	Y_T (g/g)**	Μέγιστη παραγωγικότητα (g/kg*h)
Καλλιέργεια *T. fermentans*	21.63±0.39	0.293±0.005	0.101±0.002	0.18±0.01
Συγκαλλιέργεια/ SSCF	28.87±1.22	0.398±0.042	0.132±0.014	0.24±0.02

* υπολογισμένος βάσει των υδρολυμένων σακχάρων
** υπολογισμένος βάσει των συνολικών περιεχόμενων σακχάρων στο HHPWS

Από την παραπάνω ανάλυση προκύπτουν αρκετά συμπεράσματα. Παρά τη θετική επίδραση που είχε η προσθήκη κυττάρων *F. oxysporum*, η απόδοση της διεργασίας με βάση τα συνολικά περιεχόμενα σάκχαρα κινήθηκε πολύ χαμηλά, στο 13.2%. Σε αυτό πιθανότατα έπαιξε πολύ μεγάλο ρόλο ο χαμηλός βαθμός σακχαροποίησης που επιτεύχθηκε κατά το στάδιο της ρευστοποίησης καθώς υδρολύθηκε μόλις το 34.9% των συνολικών σακχάρων. Όπως έχει αποδειχτεί και από άλλες μελέτες, τόσο η προκατεργασία όσο και, σε πολύ μεγαλύτερο βαθμό, η υδρόλυση παίζουν πολύ καθοριστικό ρόλο στην τελική απόδοση συστημάτων παραγωγής αιθανόλης, καθώς αυξάνουν το ποσοστό διαθέσιμων προς ζύμωση σακχάρων (78) (79). Ένας ακόμη παράγοντας που μπορεί να επηρέασε την απόδοση της διεργασίας είναι, όπως αναφέρθηκε και παραπάνω, η ύπαρξη παρεμποδιστών στο υπόστρωμα. Όντως, έρευνες που πραγματοποιήθηκαν σε υποστρώματα που αφαιρέθηκαν οι παρεμποδιστές που δημιουργήθηκαν κατά το στάδιο της προκατεργασίας και της υδρόλυσης έδειξαν αύξηση της απόδοσης της διεργασίας έως και 50% (78) (82) (84).

Πίνακας 13. Παραδείγματα παραγωγής αιθανόλης από SSF διεργασίες

πρώτη ύλη	προκατεργασία/ υδρόλυση	Ποσότητα στερεών	μικροοργανισμός	αιθανόλη (g/kg)	πηγή
άχυρο σίτου	έκρηξη ατμού/ ενζυμική	9% WIS*	*S cerevisiae TMB3400*	33.2	(78)
άχυρο σίτου	έκρηξη ατμού/ ενζυμική	10% w/v	*K. Marxianus CECT 10875*	18.1	(79)
άχυρο σίτου	Αραιά οξέα / ενζυμική	7.5% w/v κυτταρίνη	*S. cerevisiae*	38.3	(80)
γλυκό σόργο	-	22.5% DM	*S. cerevisiae/ F. oxysporum*	84	(67)
βαγάση γλυκού σόργου	έκρηξη ατμού/ ενζυμική	10% w/v	*K fragilis CECT 10875*	16.2	(79)
βαγάση γλυκού σόργου	έκρηξη ατμού/ ενζυμική	10% w/v	*K marxianus CECT 10875*	22.1	(79)
Στέλεχος βαμβακιού	Υδροθερμική/ ενζυμική	15% w/v	*dry yeast*	17	(29)
άχυρο σίτου	Αλκαλική/ Όξινη	7.83 % DM	*E. coli FBR5*	22	(81)

*WIS=Water Insoluble Solids,

Από τον Πίνακα 13 επιβεβαιώνεται ότι η επιστημονική κοινότητα έχοντας αναγνωρίσει αυτήν την ανασχετική επίδραση που εμφανίζουν παρεμποδιστικές ενώσεις στρέφεται προς τη χρήση μεθόδων που παράγουν λιγότερες τέτοιες ενώσεις, όπως η υδροθερμική προκατεργασία και η ενζυμική υδρόλυση. Ωστόσο, για την επίτευξη καλύτερων αποτελεσμάτων τα υποστρώματα πρέπει να αποτοξινώνονται, διαδικάσια όμως που επιβαρύνει οικονομικά τη συνολική διεργασία. Είναι επίσης εμφανές ότι ο μικροοργανισμός που χρησιμοποιείται περισσότερο είναι ο *S. cerevisiae* και γενετικά τροποποιημένα στελέχη του καθώς παρουσιάζει πολύ μεγάλες αποδόσεις και πολύ μεγάλη ανθεκτικότητα στην αιθανόλη. Ένα ακόμα συμπέρασμα που προκύπτει από τον Πίνακα 13 είναι η επίδραση που έχει η αρχική συγκέντρωση στερεών, και άρα η αρχική συγκέντρωση ζυμώσιμων σακχάρων, στο τελικό αποτέλεσμα. Αυτό δεν σημαίνει βέβαια ότι μεγαλύτερες συγκεντρώσεις οδηγούν απαραίτητα σε καλύτερα αποτελέσματα, αφού όπως αποδείχτηκε από τη συγκεκριμένη μελέτη αλλά και από τους Saha et al., (81) πολύ μεγάλες συγκεντρώσεις σακχάρων οδηγούν σε παραμπόδιση από το υπόστρωμα. Τέλος, σε σχέση με τον *S. cerevisiae* ο *T.fermentans* φαίνεται να υστερεί, καθώς εμφανίζει μικρότερες αποδόσεις, δεν έχει κάποιο συγκριτικό πλεονέκτημα, όπως η αντοχή σε υψηλές θερμοκρασίες ή χαμηλό pH, ενώ αντίθετα ο *S. cerevisiae* παρουσιάζει πολύ μεγαλύτερη ανοχή στην αιθανόλη, φτάνοντας το 12% w/v πριν σταματήσει η μεταβολική του δραστηριότητα πλήρως, και είναι γενικά ένας πολύ ανθεκτικός μικροοργανισμός . Ωστόσο, η συγκαλλιέργεια *T.fermentans* και *F. oxysporum* σε HHPWS με βάση την τελική συγκέντρωση αιθανόλης αξιολογείται ως ένα μέτριο προς καλό σύστημα σύμφωνα με τον παραπάνω πίνακα.

9 ΓΕΝΙΚΑ ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ

Η ελαιογόνος ζύμη *Trichosporon fermentans* έχει μελετηθεί ευρέως ως προς την παραγωγή ενδοκυτταρικού λίπους για την παραγωγή βιοκαυσίμων. Ωστόσο, δεν υπάρχουν διαθέσιμα δεδομένα που να αναλύουν την παραγωγή αιθανόλης από το μικροοργανισμό αυτό. Στην παρούσα διπλωματική εργασία επιχειρήθηκε μία πρώτη διερεύνηση της δυνατότητας παραγωγής αιθανόλης από τη ζύμη *T. fermentans*, οι συνθήκες εκείνες, υπό τις οποίες μπορεί να βελτιστοποιηθεί η παραγωγή αυτή και η συμπεριφορά τη ζύμης σε λιγνινοκυτταρινούχα υλικά.

Στο πρώτο κομμάτι αυτής της εργασίας, έγιναν πειράματα προκειμένου να εξακριβωθούν οι βέλτιστες συνθήκες για την παραγωγή αιθανόλης. Αρχικά, μελετήθηκε η επίδραση της πηγής αζώτου τόσο στην κυτταρική ανάπτυξη του *T. fermentans* όσο και στη ζύμωση υποστρωμάτων γλυκόζης. Ανάμεσα στις πηγές που ερευνήθηκαν, οργανικές και ανόργανες, τα καλύτερα αποτελέσματα τόσο στην ανάπτυξη βιομάζας όσο και στην παραγωγή αιθανόλης, είχε ο συνδιασμός yeast extract και πεπτόνης σε συγκέντρωση 10 g/L και αναλογία 1:1. Αυτό το γεγονός ήταν μία πρώτη ένδειξη ότι ο μικροοργανισμός μπορεί να χρησιμοποιηθεί για τη ζύμωση φυσικών υποστρωμάτων που περιέχουν ως επί το πλείστον οργανικές πηγές αζώτου με τη μορφή αμινοξέων. Στη συνέχεια, εξετάστηκε η επίδραση που έχει η τιμή του pH στη διαδικασία της ζύμωσης. Για το λόγο αυτό δοκιμάστηκαν τιμές pH από ήπια όξινες έως ήπια αλκαλικές. Σε όλες τις περιπτώσεις η ζύμη επέδειξε καλή προσαρμοστικότητα στο περιβάλλον της με την καλύτερη παραγωγή αιθανόλης να σημειώνεται για pH 6.0, αποτέλεσμα το οποίο είχε υποπτευθεί, έπρεπε ωστόσο να αποδειχτεί. Αφού διερευνήθηκε η περιοχή pH λειτουργίας της ζύμης, ακολούθησε έλεγχος της επίδρασης της αρχικής συγκέντρωσης γλυκόζης στην παραγωγή αιθανόλης. Διαπιστώθηκε ότι σε συγκεντρώσεις 25-100 g/L οι ζυμώσεις ήταν γρήγορες και αποδοτικές με ικανοποιητικούς συντελεστές απόδοσης, με τον καλύτερο να σημειώνεται για συγκέντρωση 50 g/L φτάνοντας το 90,4% του θεωρητικού. Αντίθετα, σε συγκεντρώσεις από 200 g/L γλυκόζης και πάνω παρατηρήθηκε ήπια έως έντονη παρεμπόδιση με τους συντελεστές απόδοσης να μειώνονται έως και 63% παρά το γεγονός ότι σε συγκέντρωση 200 g/L παρατηρήθηκε η μέγιστη συγκέντρωση παραγώμενης αιθανόλης.

Μελετήθηκε επίσης η ανθεκτικότητα του μικροοργανισμού σε διαφορετικές συγκεντρώσεις αιθανόλης. Βρέθηκε ότι ο *T. fermentans* είναι ικανός να μεταβολίζει σάκχαρα σε αιθανόλη σε ήπιες συγκεντρώσεις αιθανόλης (έως και 3% β/ο) στο μέσο καλλιέργειας. Το γεγονός αυτό καθιστά τον μικροοργανισμό κατάλληλο για περαιτέρω μελέτη ως προς τη συμμετοχή του σε βιομηχανικές διεργασίες παραγωγής αιθανόλης. Σε συγκεντρώσεις από 7% β/ο η παραγωγή αιθανόλης σταματάει πλήρως. Τέλος, σε αυτό το πρώτο κομμάτι, εξετάστηκε η ικανότητα του μικροοργανισμού να αφομειώνει διαφορετικές πηγές άνθρακα, ως προστάδιο της χρήσης του σε άχυρο σίτου. Οι πηγές που εξετάστηκαν ήταν φρουκτόζη, ξυλόζη, αραβινόζη και λακτόζη. Διαπιστώθηκε ότι σε αναερόβιες συνθήκες ο *T. fermentans* είναι ικανός να ζυμώνει, εκτός από τη γλυκόζη, μόνο τη φρουκτόζη, αποτέλεσμα ιδιαίτερα αποθαρρυντικό και αντίθετο με τη βιβλιογραφία που αναφέρει την επιτυχή χρήση του σε αερόβιες ζυμώσεις για την παραγωγή ενδοκυτταρικού λίπους σε υλικά πλούσια σε πεντόζες.

Έχοντας εξετάσει την ικανότητα παραγωγής αιθανόλης της ζύμης σε απλά υποστρώματα, στο δεύτερο κομμάτι αυτής της διπλωματικής εργασίας διερευνήθηκε η χρήση ενός λιγνινοκυτταρινούχου υποστρώματος για την παραγωγή αιθανόλης και συγκεκριμένα προκατεργασμένου υδροθερμικά αχύρου σίτου πλούσιου σε ημικυτταρίνη 23% ΞΜ. (High Hemicellulose Pretreated Wheat Straw, HHPWS 23% DM). Η ρευστοποίηση και προϋδρόλυση του αχύρου έγινε σε αντιδραστήρα ανάμιξης με ελεύθερη πτώση χρησιμοποιώντας ένα σκεύασμα θερμοενζύμων ενζυμικού φορτίου 5 mg/g ΞΜ υδρολύοντας εν τέλει το 34.9% των συνολικών σακχάρων. Το ρευστοποιημένο υλικό οδηγήθηκε σε ζύμωση για 120h. Τα αποτελέσματα δεν ήταν ιδιαίτερα ικανοποιητικά, καθώς ο συντελεστής απόδοσης με βάση τα ολικά υδρολυμένα σάκχαρα υπολογίστηκε στα 0.293 g/g, δηλαδή στο 57% θεωρητικού, και η παραγώμενη αιθανόλη μετρήθηκε στα 21.63 g/kg ΞΜ. Το αποτέλεσμα αυτό αποδόθηκε στην ύπαρξη πεντοζών στο υδρόλυμμα, τις οποίες ο *T. fermentans* δεν μπορεί να ζυμώσει όπως αποδείχτηκε προηγουμένως, και στην ύπαρξη παρεμποδιστών που δημιουργήθηκαν κατά την προκατεργασία του αχύρου. Για το λόγο αυτό αποφασίστηκε να προστεθούν και κύτταρα του μύκητα *Fusarium oxysporum*, ενός στελέχους με αποδεδειγμένη δυνατότητα αφομείωσης πεντοζών και παραγωγής ενζύμων που μπορούν να υδρολύσουν την κυτταρίνη και την ημικυτταρίνη, σε μία προσπάθεια εφαρμογής ενός συστήματος Ταυτόχρονης Σακχαροποίησης

και Ζύμωσης με Συγκαλλιέργεια. Με την προσθήκη φυγοκεντρημένων κυττάρων του *F. oxysporum* η συνολική παραγωγή αιθανόλης αυξήθηκε κατά 33.5% φτάνοντας τα 28.87 g/kg ΞΜ. Η αύξηση αυτή αποδόθηκε τόσο στη συνεργιστική αφομείωση πεντοζών όσο και στην υδρόλυση δεσμευμένων σακχάρων από ένζυμα του *F. oxysporum*. Ωστόσο, λαμβάνοντας υπόψη τα συνολικά περιεχόμενα σάκχαρα ο συντελεστής απόδοσης υποστρώματος ήταν πολύ χαμηλός, μόλις στο 0.132 g/g. Το αποτέλεσμα αυτό καθιστά την όλη διεργασία πολύ μέτρια και καταδεικνύει το σημαντικό ρόλο που παίζουν τα στάδια της προκατεργασίας και της υδρόλυσης της λιγνινοκυτταρινούχου βιομάζας.

Τέλος, δύο παρατηρήσεις, βιοχημικού ενδιαφέροντος περισσότερο. Όπως αναφέρθηκε προηγουμένως, παρατηρήθηκε ότι σε μικροαερόβιες συνθήκες ο *T. fermentans* δεν μπόρεσε να μεταβολίσει την ξυλόζη και την αραβινόζη, σε αντίθεση με τη βιβλιογραφία όπου αναφέρεται ικανοποιητική αφομείωση τους σε αερόβιες συνθήκες για την παραγωγή ενδοκυτταρικού λίπους. Το φαινόμενο αυτό αποδόθηκε σε καταπίεση του μεταβολικού μονοπατιού των φωσφορυλιωμένων πεντοζών απουσία οξυγόνου, φαινόμενο που παρατηρήθηκε και σε ανασυνδιασμένο στέλεχος του *S. cerevisiae*. Μία δεύτερη παρατήρηση είναι το ενδεχόμενο ο *T. fermentans* να ακολουθεί ένα μοντέλο διαύξιμης ανάπτυξης, οξειδώνοντας την αιθανόλη μετά την ολοκλήρωση της ζύμωσης, φαινόμενο που παρατηρείται και στον *S. cerevisiae*. Κατά τη διάρκεια πολλών πειραμάτων και αφού η ζύμωση είχε ολοκληρωθεί, η συγκέντρωση της παραγώμενης αιθανόλης άρχιζε να μειώνεται, οδηγώντας στο συμπέρασμα ότι ο *T. fermentans* την οξειδώνει με πολύ αργούς ρυθμούς προκείμενου να καλύψει τις ενεργειακές του ανάγκες. Ωστόσο, και τα δύο συμπεράσματα είναι περισσότερο θεωρητικά και χρειάζεται περισσότερη εργαστηριακή έρευνα προκειμένου να επιβεβαιωθούν.

ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

1. Abdeen Mustafa Omer, *Energy, environment and sustainable development,* Renewable and Sustainable Energy Reviews (2007)
2. 2009/28/ΕΚ
3. Peter Thorne, *Climate Change 2nd Edition, Chapter 2-Global Surface Temperatures* (2016)
4. Dimitris Manolopoulos, Konstantinos Kitsopoulos, John K. Kaldellis, Aristidis Bitzenis, *The evolution of renewable energy sources in the electricity sector of Greece,* Inter. Journal Of Hydrogen Energy (2016)
5. Οδηγία Ε.Ε. 2009/28/ΕΚ
6. www.desmie.gr
7. Ilias Vouitsis, Savvas Geivanidis, Zissis Samaras, *Liquid biofuels in Greece – Current status in production and research,* Journal of Renewable and Sustainable Energy 6 (2014)
8. Χριστακόπουλος Π., Τόπακας Ε., *Βιοτεχνολογία Παραγωγής Βιοκαυσίμων* (2012)
9. Ayhan Demirbas, *Biofuels securing the planet's future energy needs,* Energy Conversion and Management (2009)
10. Mustafa Balat, Havva Balat, Cahide Oz, *Progress in bioethanol processing,* Progress in Energy and Combustion Science 34 (2008), 551-273
11. Solange I. Mussatto, Giuliano Dragone, Pedro M.R. Guimaraes, Joao Paulo A. Silva, Livia Carneiro, Ines C. Roberto, Antonio Vicente, Lucila Domingues, Jose A. Texeira, *Technological trends, global market and challenges of bio-ethanol production,* Biotechnology Advances (2010)
12. Ayhan Demirbas, *Biofuels sources, biofuel policy, biofuel economy and global biofuel projections,* Energy Conversion and Management (2008)

13. A.E. Atabani, A.S. Silitonga, I. A. Badruddin, T.M.i Mahlia, H.H. Masjuki, S. Mekhilef, *A comprehensive review on biodiesel as an alternative energy source and its characteristics,* Renewable and Sustainable Energy Reviews (2012)
14. Ilias Vouitsis, Savvas Geivanidis, Zisis Samaras, *Liquid biofuels in Greece-Current status in production and research,* Journal of Renewable and Sustainable Energy 6 (2014)
15. Cheng Chen, Wenshan Gui, Huu Hao Ngo, Duu-Jong Lee, Kuo_lun Tung, Penkang Jin, *Challenges in biogas production from anaerobic membrane bioreactors*, Renewable Energy (2016)
16. Demirbas A., *Biohydrogen – For future engine fuel demands*, Trabzon (2009)
17. Balat M., *Global bio-fuel processing and production trends,* Energy Explor Exploit 25 (2007), 198-218
18. Bastos VD., *Ethanol, alcohol chemistry and bio-refinery*, BNDES Sectorial 25 (2007), 5-38
19. Oscar J. Sanchez, Carlos A. Cardona, *Trends in biotechnological production of fuel ethanol from different feedstocks*, Bioresource Technology 99 (2008), 5270-5295
20. John McMurry, Οργανική Χημεία, Τόμος Ι, 2008
21. Lynd L.R., Weimer P.J., van Zyl W.H., Pretorious I.S., *Microbial cellulose utilization: fundamentals and biotechnology*, Microbiology and Molecular Biology Review 66 (2002), 506-577
22. Ye Sun, Jiayang Cheng, *Hydrolysis of lignocellulosic materials for ethanol production: a review*, Bioresource Technology 83 (2002), 1-11
23. Xinshu Zhuang, Wen Wang, Qiang Yu, Wei Qi, Qiong Wang, Xuesong Tan, GuixiongZhou, Zhenhing Yuan, *Liquid hot water pretreatment of lignocellulosic biomass for bioethanol production accompanying with high valuable products*, Bioresource Technology 199 (2016), 68-75
24. Wyman C.E., Dale B.E., Elander R.T., Holtzapple M., Ladisch M.R., Lee Y.Y., *Coordinated development of leading biomass pretreatment technologies*, Bioresource Technology 96 (2005), 1959-1966

25. P. Alvira, E. Tomas-Pejo, M. Ballesteros, M.J. Negro, *Pretreatment technologies for an efficient bioethanol production process base on enzymatic hydrolysis: A review*, Bioresource technology 101 (2010), 4851-4861
26. Fangrui Ma, Milford A. Hanna, *Biodiesel production: A review*, Bioresource technology 70 (1999), 1-15
27. Qiang Li, Wei Du, Dehua Liu, *Perspectives of microbial oils for biodiesel production*, Applied microbiological biotechnology 80 (2008), 749-756
28. Mustafa Vohra, Jagdish Manwar, Rahul Manmode, Satish Padgilwar, Sanjay Patil, *Bioethanol production: Feedstock and current technologies*, Journal of Environmental Chemical Engineering 2 (2014), 573-584
29. Διπλωματική εργασία Κ. Δήμου, *Παραγωγή βιοαιθανόλης από στελέχη βαμβακιού,* ΕΜΠ 2105
30. B. Alberts, D. Bray, K. Hopkin, A. Johnson, J. Lewis, M. Raff, K. Roberts, P. Walter, *Essential cell biology volume 2, 528-553*
31. Δόγαρης Ι. *Σχεδιασμός ολοκληρωμένης διεργασίας παραγωγής βιοαιθανόλης από λιγνινοκυτταρινούχα υλικά*, Διδακτορική Διατριβή, Αθήνα (2009)
32. Lisbeth Olsson, Barbel Hahn-Hagerdal, *Fermentation of lignocellulosic hydrolysates for ethanol production*, Enzyme and Microbial Technology 18 (1996), 312-331
33. P.L. Rogers, K.J. Lee, M.L. Skotnicki, D.E. Tribe, *Ethanol production by Zymomonas mobilis*, Advances in Biochemical Engineering 23 (2005), 37-84
34. Palmqvist E, Hahn-Hagerdal B., *Fermentation of lignocellulosic hydrolysates II: Inhibitors and mechanisms of inhibition*, Bioresource technology 74 (2000), 25-33
35. Klinke HE, Thomsen AB, Ahring BK, *Inhibition of ethanol producing yeast and bacteria by degradation products produced by pre-treatment of biomass*, Applied microbiological biotechnology 66 (2004), 10-26
36. Πετρουλά Στεφανία, *Βιοτεχνολογική Παραγωγή Βιοντίζελ*, Διπλωματική Εργασία (2012), Αθήνα
37. C. Ratledge, J.P. Wynn, *The Biochemistry and Molecular Biology of Lipid Accumulation in Oleaginous Microorganisms*, Advances in Applied Microbiology 51 (2002), 1-46

38. K. Hunter, A.H. Rose, *Lipid composition of saccharomyces cerevisiae as influenced by growth temperature*, Biochimica et Biophysica Acta – Lipids and Lipid Metabolism 1394 (1998), 127-266
39. Στεριώτη Αικατερίνη, *Μελέτη της ζύμης Lipomyces starkeyi ως προς την ικανότητα βιοσύνθεσης ενδοκυτταρικού λίπους σε συνθετικά υποστρώματα και ρευστοποιημένα στελέχη γλυκού σόργου*, Διπλωματική Εργασία, Αθήνα 2013
40. http://www.namrata.co/category/chemistry-of-carbohydrates/
41. Carlo N Hamelinck, Geertje van Hooijdonk, Andre PC Faaj, *Ethanol from lignocellulosic biomass: techno-economic performance in short-, middle- and long-term*, Biomass and bioenergy 228 (2005), 384-410
42. Carlos A. Cardona, Oscar J. Sanchez, *Fuel ethanol production: Process design trends and integration opportunities*, Bioresource technology 98 (2007), 2415-2457
43. Hongzhang Chen, Xiaoguo Fu, *Industrial technologies for bioethanol production from lignocellulosic biomass*, Renewable and sustainable energy reviews 57 (2016), 468-478
44. Xin Meng, Jianming Yang, Xin Xu, Lei Zhang, Qingjuan Nie, Mo Xian, *Biodiesel production from oleaginous microorganisms*, Renewable energy 34 (2009), 1-5
46. L.Y.Zhu, M.H. Zong, H. Wu, *Efficient lipid production with Trichosporon fermentans and its use for biodiesel preparation*, Bioresource technology 99 (2008), 7881-7885
47. Chao Huang, Min-hua Zong, Hong Wu, Qiu-ping Liu, *Microbial oil production from rice straw hydrolysate by Trichosporon fermentans*, Bioresource technology 100 (2009), 4513-4538
48. Jumei Zhan, Hui Lin, Qi Shen, Qifa Zhou, Yuhua Zhao, *Potential utilization of waste sweetpotato vines hydrolysate as new source for single cell oils production by Trichosporon fermentans*, Bioresource technology 135 (2013), 622-629
49. Chen J., Ishiii T., Shimura S., Kirimura K., Usami S., *Lipase production by Trichosporon fermentans WU-C12, a newly isolated yeast*, Fermentable Bioenergy 5 (1992), 412-414
50. Γιαννακοπούλου Θεοδώρα, *Παραγωγή βιοαιθανόλης από διατροφικά απορρίματα*, Διπλωματική εργασία, Αθήνα 2015

51. Lakkana Laopaiboon, Sunan Nuanpeng, Penjit Srinophakun, Preekamol Klanrit, Pattana Laopaiboon, *Ethanol production from sweet sorghum juice using very high gravity technology: Effects of carbon and nitrogen supplementations*, Bioresource Technology 100 (2009), 4176-4182
52. Matsakas L., *Production of high added value products from sweet sorghum using high efficiency bioprocesses*, Doctoral Thesis, Athens 2015
53. Πάσχος Θωμάς, *Ανάπτυξη ολοκληρωμένης διεργασίας παραγωγής βιοαιθανόλης από υδροθερμικά προκατεργασμένη λιγνινοκυτταρινούχο βιομάζα*, Διδακτορική Διατριβή, Αθήνα 2016
54. Mette Hedegaard Thomsen, Anders Thygesen, Anne Belinda Thomsen, *Hydrothermal treatment of wheat straw at pilot plant scale using a three-step reactor system aiming at high hemicelluloses recovery, high cellulose digestibility and low lignin hydrolysis*, Bioresource Technology 99 (2008), 4221-4228
55. Jorgensen H., Vibe Jakob Vibe-Pedersen, Jan Larsen, Claus Felby, *Liquefaction of lignocelluloses at high-solids concentrations*, 2007, 862-870
56. Mille G.L., *Use of Dinitro-salicylic as reagent for the determination of reducing sugars*, Analytical Chemistry 31 (1959), 426-428
57. Orawan Deesuth, Pattana Laopaiboon, Prasit Jaisil, Lakkana Laopaiboon, *Optimization of Nitrogen and Metal ions supplementation for very high gravity bioethanol fermentation from sweet sorghum juice using and orthogonal array design*, Energies 5 (2012), 3178-3197
58. Najah M. Mohammed A l-mhanna, *Observation of Crabtree effect and Diauxic behavior of yeast by using absorption*, Chemical engineering transactions 21 (2010), 1465-1470
59. Michael L. Shuler, Fikret Kargi, *Bioprocess engineering, basic concepts 2nd Edition*, 209-220
60. Blazena Lavova, Dana Urminska, Silvia Sillerova, *Diauxic growth of Saccharomyces cerevisiae*, Journal of Microbiology, Biotechnology and Food Sciences 3 (2014), 122-123

61. Helle N. Carlsen, Hans Degn, David Lloyd, *Effects of alcohols on the respiration and fermentation of aerated suspensions of baker's yeast*, Journal of general microbiology 137 (1991), 2879-2883
62. Meyrial, V., Delgenes, J.P., Romieu, C., Moletta, R., Gounot, A.M., *Ethanol tolerance and activity of plasma membrane ATPase in Pichia stipitis grown on D-xylose or on D-glucose*, Enzym. Microb. Technol. 17 (1995), 535-540
63. D.M. Diaz-Montano, E. Favela-Torres, J. Cordova, *Improvement of growth, fermentative efficiency and ethanol tolerance of Kloeckera Africana during the fermentation of Agavetequilana juice by addition of yeast extract,* Journal of Science Food and Agriculture 90:2 (2010), 321-328
64. M.H. Thomsen, A. Thygesen, H. Jorgensen, J. Larsen, B.H. Christensen, A.B. Thomsen, *Preliminary results on optimization of pilot scale pretreatment of wheat straw used in coproduction of bioethanol and electricity*, Applied biochemistry and biotechnology 130 (2006), 448-460
65. Chao Huang, Hong Wu, Zong jun Liu, Jun Cai, Wen-yong Lou, Min-hua Zong, *Effect of organic acids on the growth and lipid accumulation of oleaginous yeast Trichosporon fermentans*, Biotechnology for biofuels (2012)
66. Chao Huang, Hong Wu, Ri-feng Li, Min-lua Zong, *Impoving lipid production from bagasse hydrolysate with Trichosporon fermentans by response surface technology*, New biotechnology 29 (2012), 373-378
67. D. Mamma, D. Koullas, G. Fountoukidis, D. Kekos, B.J. Macris, E. Koukios, *BioethanoL from sweet sorgum: Simultaneous saccharification and fermentation of carbohydrates by a mixed microbial culture*, Process Biochemistry 31 (1996), 337-381
68. Miroslav Sedlak, Nancy W.Y.Ho, *Production of ethanol from cellulosic biomass and hydrolysates using genetically engineered Saccharomyces yeast capable of cofermenting glucose and xylose*, Applied biochemistry and biotechnology 114 (2004), 403-416
69. P. Christakopoulos, D. Kekos, B.J Macris, *Direct fermentation of cellulose to ethanol using Fusarium oxysporum*, Enzyme and microbial technology 11 (1989), 236-239

70. P. Christakopoulos, D.P. Koullas, D. Kekos, B.J. Macris, *Direct ethanol conversion of pretreated straw by Fusarium oxysporum*, Bioresource technology 35:3 (1991), 297-300
71. P. Christakopoulos, D. Kekos, F.N. Kolisis, B.J. Macris, *Controling simultaneous production of endoglucanase and beta-glucosidase by Fusarium oxysporum in submerged culture*, Biotechnology Letters 17:8 (1995), 838-888
72. P. Christakopoulos, D Mamma, D. Kekos, B.J. Macris, M. Claeyssens, *Production and partial characterization of xylanase from Fusarium oxysporum*, Bioresource technology 58:2 (1996), 115-119
73. Thomas W. Jeffries, *Engineering yeasts for xylose metabolism*, Current opinion in biotechnology 17 (2006), 320-326
74. Petra Bafrncova, Daniela Smogrovicova, Iveta Slavikova, Jaroslava Patkova, Zoltan Domeny, *Improvement of very high gravity ethanol fermentation by media supplementation using Saccharomyces cerevisiae*, Biotechnology Letters 21 (1999), 337-341
75. Alison M. Jones, W.M Ingledew, *Fuel alcohol production: Appraisal of nitrogenous yeast foods for very high gravity wheat mash fermentation*, Process Biochemistry 29 (1999), 483-488
76. Qi Shen, Yue Chen, Danfen Jin, Hui Lin, Qun Wang, Yu-Hua Zhao, *Comparative genome analysis of the oleaginous yeast Trichosporon fermentans reveals its potential applications in lipid accumulation*, Microbiological Reasearch 192 (2016), 203-210
77. Neelekantam V. Narendranth, Ronan Power, *Relationship between pH and medium dissolved solids in terms of growth and metabolism of Lactobacilli and Saccharomyces cerevisiae during ethano production*, Applied Environmental Microbiology 71:5 (2005), 2239-2243
78. Kim Olofsson, Magnus Bertilsson, Gunnar Liden, *A short review on SSF – an interesting option for ethanol production from lignocellulosic feedstocks*, Biotechnology for Biofuels 1:7 (2008), 1-14

79. M. Ballesteros, J.M. Oliva, M.J. Negro, P. Manzanares, I. Ballesteros, *Ethanol from lignocellulosic materials by a simultaneous saccharification and fermentation process (SFS) with Klyveromyces marxianus CECT 10874*, Process Biochemistry 39 (2004), 1843-1848
80. C.E. Wyman, D.D. Spindler, K. Grohmann, *Simultaneous saccharification and fermentation of several lignocellulosic feedstocks to fuel ethanol*, Biomass Energy 3:5 (1992), 301-307
81. Badal C. Saha, Loren B. Iten, Michael A. Cotta, Y Victor Wu, *Dilute acid pretreatment, enzymatic saccharification and fermentation of wheat straw to ethanol*, Process Biochemistry 40 (2005), 3693-3700
82. J.N Nigam, *Ethanol production from wheat straw henicellulose hydrolysate by Pichia stipitis*, Journal of biotechnology 87 (2001), 17-27
83. Serpil Ozmihci, Fikret Kargi, *Ethanol fermentation of cheese whey powder solution by repeated fed – batch operation*, Enzyme and Microbial Technology 41 (2007), 169-174
84. M. Cantarella, L. Cantarella, A. Gallifuoco, A. Spera, F. Alfani, *Comparison of different detoxification methods for steam-exploded poplar wood as a substrate for bioproduction of ethanol in SHF and SSF*, Process Biochemistry 39 (2004), 1533-1542