

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

Διπλωματική Εργασία

**Αξιοποίηση στελεχών αραβοσίτου για την παραγωγή
βιοαιθανόλης και βιοενεργών ουσιών**

Δέδες Γρηγόριος

Επιβλέπων Καθηγητής:
Τόπακας Ευάγγελος, Επίκουρος καθηγητής Ε.Μ.Π.

ΑΘΗΝΑ 2017

Ευχαριστίες

Η παρούσα διπλωματική εκπονήθηκε στο Εργαστήριο Βιοτεχνολογίας, της Σχολής Χημικών Μηχανικών, του Εθνικού Μετσόβιο Πολυτεχνείου στα πλαίσια της ολοκλήρωσης του κύκλου σπουδών μου στη σχολή.

Αρχικά, θα ήθελα να ευχαριστήσω τον επίκουρο καθηγητή του Ε.Μ.Π. κ. Ευάγγελο Τόπακα για την ανάθεση του συγκεκριμένου θέματος και την εμπιστοσύνη που μου έδειξε για την εκπόνηση αυτής της εργασίας. Η καθοδήγηση του ήταν πάντα παρούσα και η επιστημονική του υποστήριξη και συμβουλές πολύτιμες σε κάθε στάδιο της διαδικασίας.

Στη συνέχεια, θα ήθελα να ευχαριστήσω θερμά τον υποψήφιο διδάκτορα του Ε.Μ.Π. Κωνσταντίνο Κατσιμπουρα για τη συνεχή βοήθεια του όλο το διάστημα που ήμουν διπλωματικός στο εργαστήριο. Οι γνώσεις του και η μεταδοτικότητά του έκαναν την πραγματοποίηση και τη συγγραφή αυτής της διπλωματικής ένα πολύ ευκολότερο έργο. Ακόμα, θα ήθελα να τον ευχαριστήσω για την προθυμία να επιλύσει οποιαδήποτε απορία είχα και τη διαρκή στήριξή του. Το ενδιαφέρον του για το αντικείμενο, η υπευθυνότητα και η μεθοδικότητά του με έκαναν να αγαπήσω την έρευνα περισσότερο.

Στη συνέχεια, θα ήθελα να ευχαριστήσω όλα τα μέλη του εργαστηρίου για την επιπλέον βοήθεια που μου παρείχαν πάνω σε πάσης φύσεως θέματα. Το φιλικό κλίμα που δημιούργησαν βοήθησε σημαντικά στην πραγματοποίηση των πειραμάτων και έκανε τη διπλωματική εργασία, πέρα από παραγωγική, και ευχάριστη διαδικασία.

Κλείνοντας τον κύκλο των σπουδών θα ήθελα να ευχαριστήσω όλους τους φίλους μου και ιδιαίτερα την Κατερίνα, την Έλενα και τον Ανδρέα, που μου χάρισαν όμορφες στιγμές και που έκαναν τη φοιτητική μου ζωή μια από τις ωραιότερες περιόδους της ζωής μου.

Τέλος, θα ήθελα να ευχαριστήσω του γονείς μου Βασίλη και Βάσω και τους αδερφούς μου Μιχάλη και Δημήτρη για τη στήριξη που μου παρείχαν σε όλη τη διάρκεια των σπουδών μου.

Γρηγόρης Δέδες,

Αθήνα 2017

Περίληψη

Σκοπός της παρούσας διπλωματικής εργασίας είναι η μελέτη της παραγωγής βιοαιθανόλης από προκατεργασμένα με υγρή οξείδωση στελέχη αραβόσιτου, καθώς και της δράσης μιας ξυλανάσης της οικογένειας GH11, για την παραγωγή ξυλοολιγοσακχαριτών.

Αρχικά, στο πρώτο μέρος μελετήθηκε η παραγωγή βιοαιθανόλης από στελέχη αραβόσιτου, τα οποία υπέστησαν προκατεργασία υγρής οξείδωσης με τη χρήση μείγματος ακετόνης/νερού. Σε αυτό το πλαίσιο πραγματοποιήθηκαν πειράματα ανάλυσης σύστασης της βιομάζας και πειράματα υδρόλυσης και ζύμωσης με σκοπό την παραγωγή αιθανόλης και τη βελτιστοποίηση των επιμέρους σταδίων.

Τα πειράματα ανάλυσης σύστασης έδειξαν απομάκρυνση μεγάλου μέρους της λιγνίνης και της ημικυτταρίνης και μικρού μέρους της κυτταρίνης, ενώ η τελική περιεκτικότητα της προκατεργασμένης βιομάζας σε κυτταρίνη, ημικυτταρίνη και λιγνίνη βρέθηκε ίση με 79,8%, 9,7% και 7,7% αντίστοιχα.

Ακολούθησαν σειρές πειραμάτων ενζυμικής υδρόλυσης της βιομάζας σε μικρή κλίμακα. Η πρώτη σειρά πειραμάτων περιλάμβανε υδρόλυση σε διαφορετικές συγκεντρώσεις ενζύμου (mg/g ξηρής βιομάζας) για συγκεκριμένη συγκέντρωση στερεών (10% w/w), ενώ η δεύτερη σειρά πειραμάτων περιλάμβανε υδρόλυση σε διαφορετικές συγκεντρώσεις στερεών (% w/w) για συγκεκριμένη συγκέντρωση ενζύμου (9 mg ενζύμου/g ξ. β.). Και οι δυο σειρές πειραμάτων πραγματοποιήθηκαν σε κωνικές φιάλες στις ίδιες συνθήκες θερμοκρασίας και pH. Η πρώτη σειρά πειραμάτων πραγματοποιήθηκε σε συγκεντρώσεις ενζύμου από 3 έως 18 mg ενζύμου/g ξηρής βιομάζας και η μέγιστη συγκέντρωση γλυκόζης που παρατηρήθηκε ήταν 88,1 g/L για συγκέντρωση ενζύμου 18 mg/g ξ. β.. Βάσει των αποδόσεων επιλέχθηκε η συγκέντρωση των 9 mg ενζύμου/g ξ. β. ως η καταλληλότερη για τη διεξαγωγή της υδρόλυσης. Η δεύτερη σειρά πειραμάτων πραγματοποιήθηκε για συγκεντρώσεις στερεών από 8% έως 16% w/w και η μέγιστη συγκέντρωση γλυκόζης που παρατηρήθηκε ήταν 118,5 g/L για συγκέντρωση στερεών 16% w/w, με τις αποδόσεις των υδρολύσεων να κυμαίνονται στο διάστημα 70-86%.

Στη συνέχεια, πραγματοποιήθηκαν πειράματα ζύμωσης για την παραγωγή αιθανόλης σε μικρή κλίμακα. Σε πρώτο στάδιο πραγματοποιήθηκαν δύο ζυμώσεις σε σύστημα διαλείποντος έργου έπειτα από ένα στάδιο προϋδρόλυσης διάρκειας 12 h. Η πρώτη ζύμωση εκτελέστηκε σε συγκεντρώσεις στερεών 10% έως 14% για 120 h, ενώ η δεύτερη ζύμωση σε συγκεντρώσεις στερεών 16% έως 20% για 24 h. Σε δεύτερο στάδιο πραγματοποιήθηκε ζύμωση σε σύστημα ημιδιαλείποντος έργου σε συγκεντρώσεις στερεών από 16% έως 20% w/w, όπου στο στάδιο της προϋδρόλυσης πραγματοποιήθηκε η τροφοδοσία της βιομάζας ανά τακτά χρονικά διαστήματα. Για τις ζυμώσεις σε σύστημα διαλείποντος έργου η μέγιστη

συγκέντρωση αιθανόλης για την πρώτη ζύμωση βρέθηκε ίση με 39,7 g/L και η μέγιστη απόδοση αιθανόλης ίση με 63,2% για το δείγμα συγκέντρωσης στερεών 14% w/w, ενώ για τη δεύτερη ζύμωση η μέγιστη συγκέντρωση αιθανόλης βρέθηκε ίση με 38,8 g/L για συγκέντρωση στερεών 20% με μέγιστη απόδοση αιθανόλης ίση με 36,6%. Για τη ζύμωση σε σύστημα ημιδιαλείποντος έργου η μέγιστη συγκέντρωση αιθανόλης βρέθηκε ίση με 57,1 g/L και η μέγιστη απόδοση αιθανόλης ίση με 71,7% για το δείγμα συγκέντρωσης στερεών 20% w/w.

Στο δεύτερο μέρος της εργασίας πραγματοποιήθηκε παραγωγή μιας ξυλανάσης της οικογένειας 11 των γλυκοζιδικών υδρολασών από το μύκητα *Fusarium oxysporum* με σκοπό να χρησιμοποιηθεί για την παραγωγή ξυλοολιγοσακχαριτών από προκατεργασμένη βιομάζα. Η παραγωγή του ενζύμου πραγματοποιήθηκε μέσω ετερόλογης έκφρασης στη μεθυλότροφη ζύμη *Pichia pastoris* και στη συνέχεια χρησιμοποιήθηκε για την υδρόλυση της εναπομείνουσας ημικυτταρίνης των προκατεργασμένων στελεχών αραβοσίτου. Το στερεό κλάσμα της αντίδρασης οδηγήθηκε για περαιτέρω υδρόλυση με χρήση κυτταρινολυτικού σκευάσματος σε αρχικές συγκεντρώσεις στερεών 10% και 16% και μετά το τέλος της διεργασίας οι συγκεντρώσεις γλυκόζης υπολογίστηκαν σε 73,2 g/L και 83,6 g/L αντίστοιχα. Τέλος, το υγρό κλάσμα της αντίδρασης οδηγήθηκε σε σύστημα χρωματογραφίας εναλλαγής ανιόντων, όπου και επαληθεύτηκε ποιοτικά η ύπαρξη ξυλοολιγοσακχαριτών ως προϊόντα της αντίδρασης της βιομάζας με την ξυλανάση.

Abstract

The purpose of this diploma thesis is to examine the production of bioethanol from corn stover pretreated with acetone/water oxidation and the action of a GH11 xylanase for the production of xylooligosaccharides.

The first part of the thesis includes the production of bioethanol from corn stover, which was pretreated with the method of the acetone/water liquid oxidation (AWO). In this context experiments of biomass composition analysis and biomass hydrolysis and fermentation were carried out with the purpose of producing bioethanol and improving the stages of the whole process.

The biomass composition analysis experiments showed significant removal of the lignin and hemicellulose and smaller removal of cellulose from the material. The final composition of the pretreated material in cellulose, hemicellulose and lignin was 79,8%, 9,7% and 7,7% respectively.

Furthermore, small scale enzymatic hydrolysis of the biomass was performed in two series of experiments. The first series included hydrolysis in different enzyme concentrations for a specific solids concentration (10% w/w), while the second series included hydrolysis in different solids concentrations for a specific enzyme concentration (9 mg/g dry biomass). Both series were carried out in a conventional stirring system (shaking flasks) the same conditions of temperature and pH. For the first series the hydrolysis was performed at enzyme concentrations from 3 to 18 mg enzyme/g dry biomass and the maximum glucose concentration was 88,1 g/L for the 18 mg enzyme/g dry biomass concentration. Based on the hydrolysis yields and the cost of the added enzyme, the 9 mg/g DM enzyme concentration was chosen as the optimal for the hydrolysis step. For the second series the hydrolysis was performed at solids concentrations from 8 to 16% w/w and the maximum glucose concentration was 118,5 g/L for solids concentration 16% w/w, while the glucose yield values were between 70 and 86%.

Moreover, the production of ethanol was performed by means of small scale fermentation experiments. In the first stage, two fermentation experiments were carried out. The first experiment included fermentation in a batch system from 10% to 14% solids concentration for 120 h, while the second experiment included fermentation in a batch system from 16% to 20% for 24 h. In the second stage, the fermentation was performed in a fed batch feeding system for 16% w/w, 18% w/w and 20% w/w solids concentrations, where the addition of the biomass was periodic. The maximum batch system ethanol concentration after the end of the fermentation in the first experiment was 39,7 g/L for the 14% w/w solids concentration with a maximum of 63,2% ethanol yield for the same solids concentration, while for the second experiment the maximum ethanol concentration was 38,8 g/L for the 20%

solids concentration with a maximum ethanol yield of 36,6%. The maximum fed batch ethanol concentration after the end of the fermentation was 57,1 g/L for the 20% w/w solids concentration with a maximum of 71,7% ethanol yield for the same solids concentration.

The second part of the thesis includes the production of a xylanase from the 11 family of the glycoside hydrolases (GH) from the fungus *Fusarium oxysporum* with the purpose of producing xylooligosaccharides from the pretreated biomass. The xylanase was produced in *Pichia pastoris* cells using liquid cell cultures and was then used for the hydrolysis of the remaining hemicellulose of the pretreated corn stover. The solid fraction of the reaction was further hydrolyzed with a commercial-cellulolytic cocktail in 10% w/w and 16% w/w solids concentrations for 12 h and the glucose concentrations were 73,2 g/L and 83,6 g/L respectively. Finally, the liquid fraction was removed and was examined using high performance anion exchange chromatography equipped with pulsed amperometric detector (HPAEC-PAD), where the presence of xylooligosaccharides was confirmed as products of the reaction between the biomass and the xylanase.

Πίνακας περιεχομένων

ΘΕΩΡΗΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ

Κεφάλαιο 1: Λιγνινοκυτταρινούχος Βιομάζα	3
1.1 Βιοκαύσιμα.....	3
1.2 Η βιοαιθανόλη ως βιοκαύσιμο	4
1.3 Πηγές Λιγνινοκυτταρινούχου Βιομάζας.....	5
1.4 Σύσταση του κυτταρικού τοιχώματος της λιγνινοκυτταρινούχου Βιομάζας.....	6
1.4.1 Κυτταρίνη	8
1.4.2 Ημικυτταρίνη	8
1.4.3 Λιγνίνη	10
1.5 Συστάσεις Διάφορων Πηγών Βιομάζας.....	10
Κεφάλαιο 2: Μετατροπή βιομάζας σε βιοαιθανόλη	13
2.1 Προκατεργασία Βιομάζας	14
2.1.1 Μηχανικές Μέθοδοι.....	16
2.1.2 Όξινες Μέθοδοι.....	16
2.1.3 Αλκαλικές μέθοδοι	18
2.1.4 Οξειδωτικές Μέθοδοι.....	20
2.1.5 Κλασματικές Μέθοδοι.....	23
2.1.6 Βιολογικές Μέθοδοι.....	24
2.2 Υδρόλυση της βιομάζας	27
2.2.1 Όξινη Υδρόλυση	28
2.2.2 Ενζυμική Υδρόλυση	29
2.3 Ζύμωση.....	33
2.3.1 Διακριτή υδρόλυση και ζύμωση (SHF)	34
2.3.2 Ταυτόχρονη σακχαροποίηση και ζύμωση (SSF).....	34
2.3.3 Ενοποιημένη διεργασία	34
2.3.4 Μικροοργανισμοί που χρησιμοποιούνται στη ζύμωση.....	35
2.3.5 Χρήση υψηλών συγκεντρώσεων στερεών (High Gravity)	36
Κεφάλαιο 3: Ξυλοολιγοσακχαρίτες ως πρεβιοτικά	39
3.1 Πρεβιοτικά.....	39
3.2 Ξυλοολιγοσακχαρίτες.....	40
3.3 Οφέλη των ολιγοσακχαριτών.....	42
Κεφάλαιο 4: Υλικά και Μέθοδοι	47

4.1 Υλικά	47
4.1.1 Στέλεχος αραβοσίτου	47
4.1.2 Μικροοργανισμοί	47
4.1.3 Χημικά Αντιδραστήρια	48
4.1.4 Υλικά και στήλες Χρωματογραφίας	49
4.1.5 Εμπορικά Ένζυμα.....	49
4.1.6 Ρυθμιστικά διαλύματα	49
4.1.7 Θρεπτικά μέσα	49
4.1.8 Συσκευές και όργανα	50
4.2 Μέθοδοι	51
4.2.1 Ανάλυση σύστασης στελέχους αραβοσίτου	51
4.2.2 Μέτρηση ολικών αναγωγικών σακχάρων με τη μέθοδο DNS	52
4.2.3 Μέτρηση Γλυκόζης	53
4.2.4 Υπολογισμός της συγκέντρωσης πρωτεϊνών με τη μέθοδο Bradford	53
4.2.5 Υδρόλυση στελεχών αραβοσίτου.....	54
4.2.6 Ζύμωση στελεχών αραβοσίτου	56
4.2.7 Προσδιορισμός αιθανόλης με υγρή χρωματογραφία – HPLC	59
4.2.8 Παραγωγή ξυλανάσης της οικογένειας GH-11 του μικροοργανισμού <i>Fusarium oxysporum</i> (FoXyn)	61
4.2.9 Παραγωγή και ταυτοποίηση ολιγοσακχαριτών με χρήση της ξυλανάσης FoXyn .	63
Κεφάλαιο 5: Ανάλυση σύστασης αραβοσίτου	67
Κεφάλαιο 6: Ενζυμική Υδρόλυση	71
6.1 Προσδιορισμός ενεργότητας κυτταρινολυτικού σκευάσματος.....	71
6.2 Υδρόλυση σε διαφορετικές συγκεντρώσεις ενζύμου	71
6.3 Μελέτη της υδρόλυσης για διαφορετικές συγκεντρώσεις ξηρής βιομάζας	75
6.4 Υδρόλυση υλικού μετά από επεξεργασία με FoXyn	79
Κεφάλαιο 7: Ζυμώσεις και παραγωγή αιθανόλης.....	81
7.1 Ζύμωση βιομάζας σε σύστημα διαλείποντος έργου	81
7.2 Ζύμωση βιομάζας σε σύστημα ημιδιαλείποντος έργου	85
Κεφάλαιο 8: Παραγωγή ξυλοολιγοσακχαριτών	91
Κεφάλαιο 9: Συμπεράσματα και συζήτηση.....	95
9.1 Σύνοψη αποτελεσμάτων – βιβλιογραφική επισκόπηση	95
9.2 Μελλοντικές προκλήσεις.....	100

ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

ΘΕΩΡΗΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ

Κεφάλαιο 1: Λιγνινοκυτταρινούχος Βιομάζα

Στη σημερινή εποχή η πλειοψηφία των ενεργειακών απαιτήσεων καλύπτεται κυρίως από ορυκτά καύσιμα αφού το 80% σχεδόν της απαραίτητης ενέργειας παράγεται από την καύση αυτών, από το οποίο το 58% χρησιμοποιείται στον τομέα των μεταφορών (Escobar et al. 2009). Ωστόσο, σε αυτό το πλαίσιο εγείρονται δύο βασικά προβλήματα που πρέπει να αντιμετωπιστούν. Το πρώτο αφορά τη διαρκώς αυξανόμενη εξάντληση των ορυκτών καυσίμων με αποτέλεσμα τον περιορισμό και εν τέλει την εξάντλησή τους (Agarwal 2007) και το δεύτερο έχει να κάνει με την περιβαλλοντική επιβάρυνση που προκαλείται από την καύση των ορυκτών καυσίμων με αποτέλεσμα την παραγωγή των αερίων του θερμοκηπίου και κατ' επέκταση την αύξηση της θερμοκρασίας, της στάθμης της θάλασσας, της ρύπανσης και τη μείωση της βιοποικιλότητας (Singh et al. 2010). Έτσι, ανακύπτει η ανάγκη εύρεσης μιας πηγής ενέργειας για τη βιομηχανία, η οποία θα εκμεταλλεύεται ανανεώσιμη και οικονομικά αποτελεσματική πρώτη ύλη η οποία θα είναι παράλληλα φιλική προς το περιβάλλον και κατά την επεξεργασία της θα παράγει μειωμένα αέρια του θερμοκηπίου. Σε αυτό το πλαίσιο, η βιοαιθανόλη αποτελεί μια ενδιαφέρουσα εναλλακτική κυρίως λόγω της ευκολίας παραγωγής και της απώλειας τοξικότητας (Zabed et al. 2016).

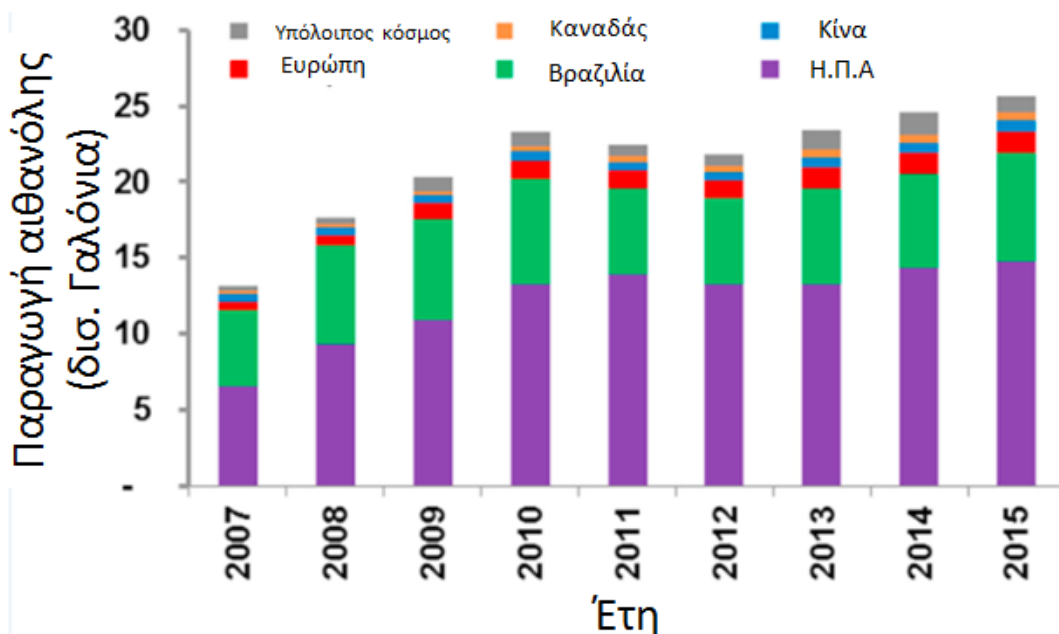
1.1 Βιοκαύσιμα

Βιοκαύσιμα ονομάζονται τα καύσιμα των οποίων η πρώτη ύλη, που ονομάζεται βιομάζα, περιλαμβάνει οτιδήποτε υλικό προέρχεται από ζωντανούς οργανισμούς. Τα κυριότερα είδη βιοκαυσίμων στα οποία έχει επικεντρωθεί η τεχνολογία είναι η βιοαιθανόλη και το βιοντήζελ (Χριστακόπουλος 2015). Τα βιοκαύσιμα χωρίζονται σε τρεις κατηγορίες γνωστές και ως γενιές βιοκαυσίμων. Η πρώτη γενιά βιοκαυσίμων περιλαμβάνει βιοκαύσιμα που παράγονται απευθείας από τις καλλιέργειες τροφίμων, είτε πρόκειται για απομόνωση ελαίων από λαχανικά για την παραγωγή βιοντήζελ είτε για την παραγωγή βιοαιθανόλης μέσω της ζύμωσης του σιταριού ή της ζάχαρης. Ωστόσο, αυτές οι μέθοδοι εγείρουν ένα βασικό πρόβλημα. Το λεγόμενο “fuel vs food” ζήτημα περιγράφει πως η παραγωγή βιοκαυσίμων πρώτης γενιάς θα προκαλέσει μια αύξηση στην τιμή των τροφίμων λόγω της αύξησης της ζήτησης των τροφίμων αφού αυτά θα χρησιμοποιούνται για περισσότερες χρήσεις πέρα από την απλή κατανάλωση. Κατά συνέπεια, ανακύπτει η δεύτερη γενιά βιοκαυσίμων η οποία στοχεύει στην καταπολέμηση των αστοχιών των βιοκαυσίμων πρώτης γενιάς. Τα βιοκαύσιμα δεύτερης γενιάς προέρχονται από την επεξεργασία

αγροτικών παραπροϊόντων όπως ξύλου, οργανικών αποβλήτων, αποβλήτων της βιομηχανίας τροφίμων ή και ειδικών ενεργειακών φυτών που δεν αποσκοπούν στην κατανάλωση ως τρόφιμα και είναι μη εκμεταλλεύσιμα, δίνοντας λύση στο πρόβλημα που προκύπτει από τα βιοκαύσιμα πρώτης γενιάς. Η τρίτη γενιά βιοκαυσίμων περιλαμβάνει θαλάσσιους πόρους, μικροφύκη και άλγη σαν πλήρως ανανεώσιμες πηγές χαμηλού κόστους και υψηλού ενεργειακού περιεχομένου για την παραγωγή βιοαερίου, βιοαιθανόλης και βιοβουτανόλης (Gaurav et al. 2017).

1.2 Η βιοαιθανόλη ως βιοκαύσιμο

Η βιοαιθανόλη ως καύσιμο από την παραγωγή μέχρι την καύση της είναι φιλική προς το περιβάλλον διότι δεν αυξάνει τις εκπομπές αερίων του θερμοκηπίου, αφού το διοξείδιο του άνθρακα που παράγεται κατά την καύση της επιστρέφει κατά το μεγαλύτερο ποσοστό του στα φυτά (συγκεκριμένα βοηθά στη μείωση του διοξειδίου του άνθρακα κατά 80%). Έχει καλύτερη αναλογία άνθρακα προς υδρογόνο συγκριτικά με τη βενζίνη (1:3 σε σχέση με το 1:1,8 της βενζίνης), υψηλό αριθμό οκτανίου ίσο με 108 βοηθώντας έτσι την καταπολέμηση του φαινομένου του “χτυπήματος” του κινητήρα και της πρόωρης ανάφλεξης και το ενεργειακό της περιεχόμενο υπολογίζεται στο 68% του ενεργειακού περιεχομένου της βενζίνης (Aditiya et al. 2016; Balat 2007).



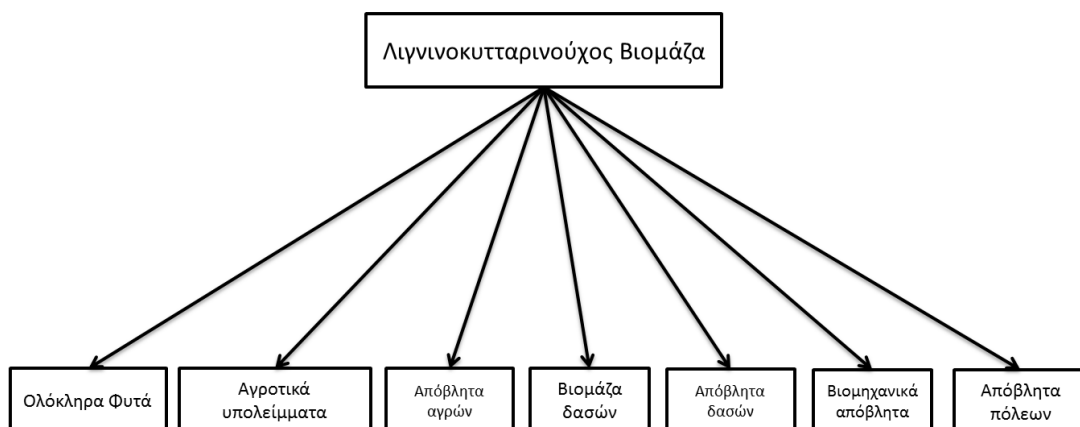
Διάγραμμα 1.1: Παγκόσμια παραγωγή βιοαιθανόλης (δισεκατομμύρια γαλιόνια) ανά χώρα ανά έτος (Zabed et al. 2017)

1.3 Πηγές Λιγνινοκυτταρινούχου Βιομάζας

Οι πρώτες ύλες για την παραγωγή της βιοαιθανόλης χωρίζονται σε τρεις κατηγορίες: σακχαρούχος βιομάζα, αμυλούχος βιομάζα και λιγνινοκυτταρινούχος βιομάζα. Οι δύο πρώτες κατηγορίες αφορούν την παραγωγή βιοκαυσίμων πρώτης γενιάς και περιλαμβάνουν παραγωγή της βιοαιθανόλης από ζύμωση των σακχάρων. Στη σακχαρούχο βιομάζα η ζύμωση γίνεται απευθείας από τα σάκχαρα των πρώτων υλών ενώ στη δεύτερη περίπτωση είναι απαραίτητη η διάσπαση της αλυσίδας του αμύλου για την παραγωγή μονομερών D-γλυκόζης προκειμένου να ξεκινήσει η ζύμωση. Έτσι, οι βασικότερες πηγές βιομάζας για τα σακχαρούχα υλικά είναι το σακχαροκάλαμο και το σακχαρότευτλο και για τα αμυλούχα υλικά είναι το καλαμπόκι και ο σίτος (Balat et al. 2008). Από την άλλη πλευρά η λιγνινοκυτταρινούχος βιομάζα απευθύνεται στην παραγωγή δεύτερης γενιάς βιοκαυσίμων και περιλαμβάνει τις εξής πηγές: ενεργειακές καλλιέργειες, υδατικά φυτά, δασικά υλικά αγροτικά υπολείμματα και οργανικά κλάσματα στερεών αστικών αποβλήτων.

Η πλειονότητα των αγροτικών υπολειμμάτων προέρχεται κυρίως από τέσσερα είδη καλλιεργειών τα οποία είναι το καλαμπόκι, το στάχυ, το ρύζι και το σακχαροκάλαμο ενώ οι υπόλοιπες αγροτικές καλλιέργειες συνεισφέρουν σε πολύ μικρό βαθμό στη συνολική παγκόσμια βιομάζα. Έτσι, η βιομάζα αποτελείται κυρίως από στελέχη αραβόσιτου (το οποίο θεωρείται το πιο υποσχόμενο υπόλειμμα αγροτικών καλλιεργειών), καλάμια ρυζιού και σταχίου και τη βαγάση η οποία προκύπτει από την επεξεργασία του σακχαροκάλαμου (Saini, Saini, and Tewari 2015).

Τα δασικά υπολείμματα περιλαμβάνουν κυρίως υλικά που περιέχουν ξύλο όπως σκληρό ξύλο, που συλλέγεται από ιτιές και βελανιδιές, μαλακό ξύλο, που συλλέγεται από έλατα, κυπαρίσσια και κέδρους, καθώς και απόβλητα του δάσους όπως πριονίδι και νεκρά κλαδιά και δέντρα (Limayem and Ricke 2012).



Σχήμα 1.1: Σύνοψη πηγών λιγνινοκυτταρινούχου βιομάζας (Zabed et al. 2016)

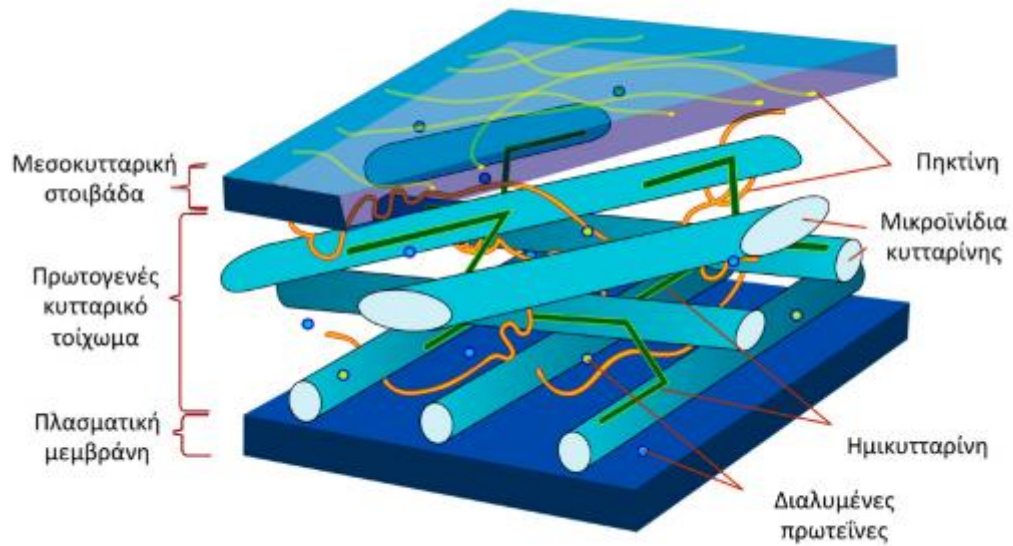
1.4 Σύσταση του κυτταρικού τοιχώματος της λιγνινοκυτταρινούχου Βιομάζας

Το φυτικό κυτταρικό τοίχωμα αποτελεί μια εξωκυτταρική μήτρα στην οποία εμπερικλείεται το κύτταρο σε ένα φυτό, στην οποία οφείλονται πολλά από τα μοναδικά χαρακτηριστικά ενός φυτού. Τα διαφορετικά τοιχώματα των γειτονικών κυττάρων που συνδέονται μεταξύ τους για να σχηματιστεί το φυτό είναι εν γένει πιο παχιά, δυνατά και κυρίως άκαμπτα από την πλασματική μεμβράνη των ζωικών κυττάρων. (Alberts et al. 2002).

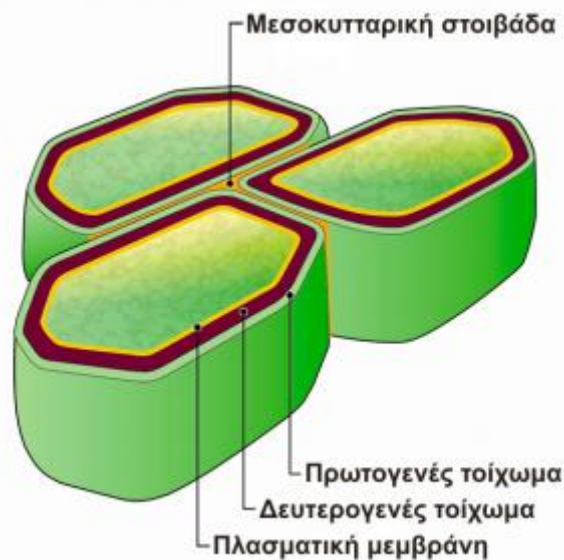
Όπως προαναφέρθηκε, από τα κυριότερα χαρακτηριστικά που προσδίδει το κυτταρικό τοίχωμα στο φυτό, είναι η ακαμψία, η σκληρότητα και γενικά οι ενισχυμένες μηχανικές ιδιότητες. Ωστόσο, το κυτταρικό τοίχωμα παίζει ένα πολύ σημαντικό ρόλο στην προστασία του φυτού καθώς παρέχει προστασία από την εισβολή μικροοργανισμών. Το μέγεθος των πόρων του κυτταρικού τοιχώματος είναι τόσο μικρό που δεν επιτρέπει την είσοδο ούτε καν σε ιούς, οπότε τα μικρόβια προσβάλλουν το φυτό διεισδύοντας είτε εκμεταλλευόμενα ευκαιριακά κενά στο κυτταρικό τοίχωμα είτε με ενζυμική αποικοδόμηση (Χριστακόπουλος 2015).

Το κυτταρικό τοίχωμα είναι πολύ πιο παχύ από την κυτταρική μεμβράνη και η σύστασή του διαφέρει στα διάφορα είδη φυτών και στα διάφορα κύτταρα του ίδιου φυτού ανάλογα και με το στάδιο ανάπτυξης του φυτού. Τα κύρια συστατικά του κυτταρικού τοιχώματος είναι η κυτταρίνη (38-50%), η ημικυτταρίνη (23-32%), η λιγνίνη (15-25%), η πηκτίνη καθώς και διάφορες διαλυμένες πρωτεΐνες. Το κυτταρικό τοίχωμα αποτελείται από δύο υπομονάδες: το πρωτογενές και το δευτερογενές κυτταρικό τοίχωμα. Τα συστατικά του κυτταρικού τοιχώματος βρίσκονται μέσα σε αυτό στη μορφή ινιδίων παρέχοντας δύναμη και αντοχή στον εφελκυσμό. Το βασικό συστατικό του πρωτογενούς κυτταρικού τοιχώματος είναι ο πολυσακχαρίτης κυτταρίνη ο οποίος είναι στενά συνδεδεμένος σε ένα δίκτυο συνδετικών γλυκανών. Η μήτρα στην οποία είναι προσκολλημένο το δίκτυο της κυτταρίνης αποτελείται κυρίως από πηκτίνη, ένα δίκτυο από πολυσακχαρίτες πλούσιους σε γαλακτουρονικό οξύ. Τα μόρια κυτταρίνης αποτελούνται από τουλάχιστον 500 μονομερή γλυκόζης τα οποία συνδέονται μεταξύ τους με ομοιοπολικό δεσμό για να σχηματίσουν μια αλυσίδα η οποία σταθεροποιείται με δεσμούς υδρογόνου. Αυτές οι αλυσίδες ονομάζονται μικροϊνίδια κυτταρίνης και παρέχουν αντοχή στον εφελκυσμό παρόμοια με αυτή του ατσαλιού. Το δευτερογενές τοίχωμα αποτελείται από επιπλέον συστατικά όπως η λιγνίνη η οποία καταλαμβάνει τα 'κενά' ανάμεσα στα άλλα συστατικά κάνοντας τα τοιχώματα άκαμπτα. Όλα τα παραπάνω συστατικά συνδέονται μεταξύ τους με ομοιοπολικούς και μη ομοιοπολικούς δεσμούς και σχηματίζοντας μια σύνθετη δομή της οποίας η

σύσταση και η αρχιτεκτονική εξαρτάται από τον τύπο του κυττάρου (Alberts et al. 2002).



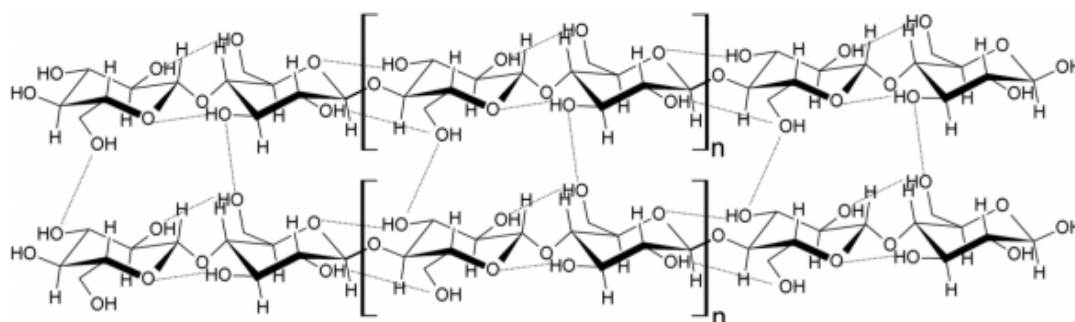
Σχήμα 1.2: Δομή πρωτογενούς κυτταρικού τοιχώματος (Χριστακόπουλος 2015)



Σχήμα 1.3: Δομή Φυτικών κυττάρων (Χριστακόπουλος 2015)

1.4.1 Κυτταρίνη

Η κυτταρίνη είναι ένα άφθονα διαθέσιμο υλικό στη φύση. Είναι ένας πολυσακχαρίτης που αποτελείται από μονομερή D-γλυκόζης τα οποία συνδέονται μεταξύ τους με β(1-4) γλυκοζιδικό δεσμό. Λόγω του δεσμού αυτού, ο δισακχαρίτης κελλοβιόζη αποτελεί την επαναλαμβανόμενη δομική μονάδα στην αλυσίδα της κυτταρίνης. Ο βαθμός πολυμερισμού της κυτταρίνης έχει ένα εύρος από 7000 έως 15000 μονάδες γλυκόζης. Η κυτταρίνη έχει μια περίπλοκη δομή στην οποία εσω- και εξωκυτταρικοί δεσμοί υδρογόνου συνεισφέρουν στη σύνδεση μεταξύ των μορίων της. Οι εσωμοριακοί δεσμοί υδρογόνου πιστεύεται ότι προσδίδουν ακαμψία στις αλυσίδες, ενώ οι έξωμοριακοί την ιδιότητα να οργανώνεται σε μορφές παράλληλων φύλων. Η κυτταρίνη μπορεί να θεωρηθεί ως ένα ημικρυσταλλικό πολυμερές όπου άμορφες περιοχές συνυπάρχουν υψηλά κρυσταλλικές. Η πηγή και η προκατεργασία της κυτταρίνης καθορίζουν το βαθμό κρυσταλλικότητας ο οποίος συνήθως κυμαίνεται από 40% σε 60%. Η κυτταρίνη είναι άτηκτη και αδιάλυτη στους περισσότερους υδατικούς και οργανικούς διαλύτες, ενώ παρουσιάζει υγροσκοπικές ιδιότητες και είναι ευπρόσβλητο σε ενζυμική υδρόλυση (Medronho and Lindman 2015; Mohamed et al. 2017).



Σχήμα 1.4: Δομική μονάδα κυτταρίνης. Εντός των αγκυλών απεικονίζεται ο δισακχαρίτης κελλοβιόζη (Χριστακόπουλος 2015)

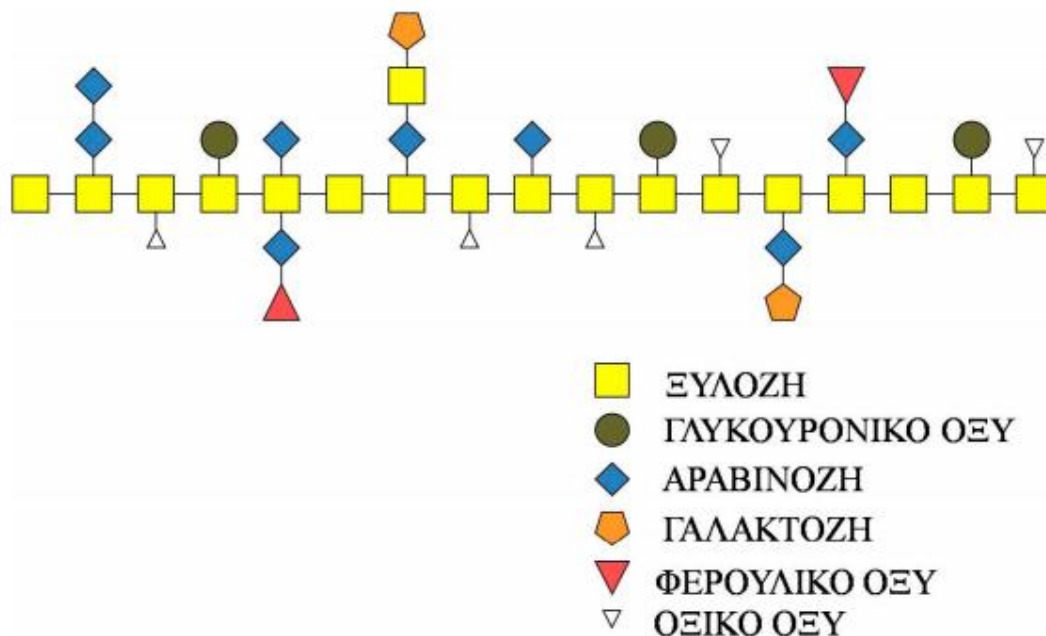
1.4.2 Ημικυτταρίνη

Μετά την κυτταρίνη ο αμέσως επόμενος ποσοτικά πολυσακχαρίτης είναι η ημικυτταρίνη, η οποία συναντάται σε ποσοστό από 23-32%. Υπάρχουν πολλοί τύποι ημικυτταρινών τους οποίους μπορούμε να ορίσουμε ως μίγμα συμπολυμερών ουσιών που μαζί με την κυτταρίνη και τη λιγνίνη αποτελούν το κυτταρικό τοίχωμα των φυτών.

Οι ημικυτταρίνες αποτελούνται από διάφορους διασταυρωμένους πολυσακχαρίτες, οι οποίοι αποτελούνται κυρίως από πεντόζες, όπως D-ξυλόζη, L-αραβινόζη, L-

ραμνόζη, L-φουκόζη, από εξόζες, όπως D-μανόζη, D-γλυκόζη, D-γαλακτόζη και από ουρονικά οξέα όπως D-γλυκουρονικό οξύ, D-4-O-μεθυλ-γλυκουρονικό οξύ και D-γαλακτουρονικό οξύ. Το ποσοστό των ημικυτταρινών στα φυτικά κύτταρα μπορεί να διαφέρει σημαντικά ανάλογα με το είδος του κυττάρου, ενώ είναι άμορφες με βαθμό πολυμερισμού 150-300, έντονα υγροσκοπικές με υψηλή χημική δραστηριότητα. Ακόμα, εξ' αιτίας της μεγάλης ποικιλίας των σακχάρων που περιέχει, οι ημικυτταρίνες χρειάζονται μια μεγάλη ποικιλία ενζύμων προκειμένου να υδρολυθούν σε ελεύθερα μονομερή. Έτσι, ανάλογα με τους πιθανούς συνδυασμούς πολυσακχαριτών σε γλυκάνες, μαννάνες, αραβινάνες, γαλακτάνες, και ξυλάνες με τις τελευταίες να αποτελούν το βασικότερο συστατικό της ημικυτταρίνης (Deutschmann and Dekker 2012; Ren and Sun 2010).

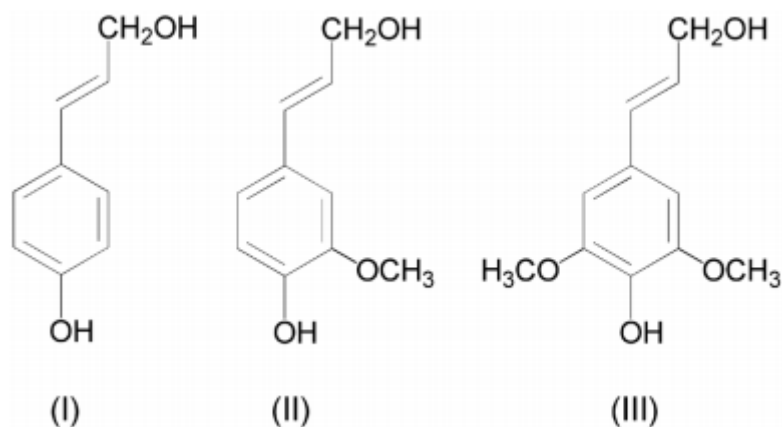
Η ξυλάνη αποτελεί το δεύτερο πιο άφθονο πολυσακχαρίτη στη φύση μετά την κυτταρίνη και ανάλογα με το είδος του κυτταρικού τοιχώματος στο οποίο βρίσκεται αλληλεπιδρά με διαφορετικά δομικά συστατικά του. Ωστόσο, οι ξυλάνες κατά κύριο λόγο λειτουργούν σαν συνδετικός δεσμός ανάμεσα στην κυτταρίνη και τη λιγνίνη ώστε να εξασφαλιστεί η συνεκτικότητα και η ακεραιότητα των κυτταρικών τοιχωμάτων. Η δομή της αποτελείται από μία κεντρική αλυσίδα μορίων D-ξυλοπυρανόζης ενωμένων μεταξύ τους με β -1,4-γλυκοζιδικούς δεσμούς. Ωστόσο, η συνολική δομή της διαφέρει σε πολυπλοκότητα ανάλογα με την προέλευση του κυττάρου (Χριστακόπουλος 2015).



Σχήμα 1.5: Δομή της ξυλάνης των ημικυτταρινών (Χριστακόπουλος 2015)

1.4.3 Λιγνίνη

Η λιγνίνη αποτελεί και αυτή ένα πολύ σημαντικό κομμάτι της φυτικής βιομάζας και η παρουσία της είναι έντονα συνδεδεμένη με την κυτταρίνη. Η λιγνίνη είναι άμορφη και έχει πολύ μεγάλο βαθμό πολυμερισμού (100000-300000). Αποτελείται από τρία διαφορετικά φαινυλοπροπάνια τα οποία συνδέονται μεταξύ τους με C-O-C αιθερικό δεσμό και το ποσοστό του κάθε μονομερούς φαινυλοπροπανίου διαφέρει ανάλογα με το είδος του φυτικού κυττάρου (Yang et al. 2016).



Σχήμα 1.6: Τα τρία φαινυλοπροπάνια της λιγνίνης

Η λιγνίνη ενώνεται με χημικούς δεσμούς και με τις ημικυτταρίνες και την κυτταρίνη, έχει χαμηλή διόγκωση και είναι αδιάλυτη στο νερό. Υδρολύεται δύσκολα κυρίως με αλκαλικά διαλύματα σε υψηλές θερμοκρασίες (150-180° C) και προσδίδει υψηλή αντοχή σε κάμψη, θλίψη και κρούση. Παράγεται σε μεγάλες ποσότητες σαν απόβλητο σε διαδικασίες παραγωγής πολτού και χαρτιού καθώς παραγωγής βιοκαυσίμων. Ωστόσο, η χρησιμότητάς της προς στιγμήν είναι ως χαμηλή πηγή ενέργειας μέσω της καύσης. Οι λόγοι για τους οποίους η λιγνίνη δε μπορεί να χρησιμοποιηθεί περαιτέρω είναι δύο: αφενός η άμορφη πολυφαινυλική δομή είναι πολύ δύσκολο να διασπαστεί σε προϊόντα υψηλότερης αξίας και αφετέρου παράγονται συχνά ανεπιθύμητα προϊόντα καύσης στις διαδικασίες μετατροπής. Παρ' όλα αυτά η λιγνίνη μπορεί να χρησιμεύσει ως πηγή υποκατεστημένων φαινολών οι οποίες βρίσκουν εφαρμογή στην παραγωγή φαρμάκων (Yang et al. 2016).

1.5 Συστάσεις Διάφορων Πηγών Βιομάζας

Στην παρούσα διπλωματική εξετάστηκαν στελέχη αραβόσιτου για τη συλλογή αποτελεσμάτων, τα οποία αποτελούν το αναξιποίητο κλάσμα αραβόσιτου που προκύπτει από την επεξεργασία της βιομηχανίας τροφίμων (κορμός, φύλλα,

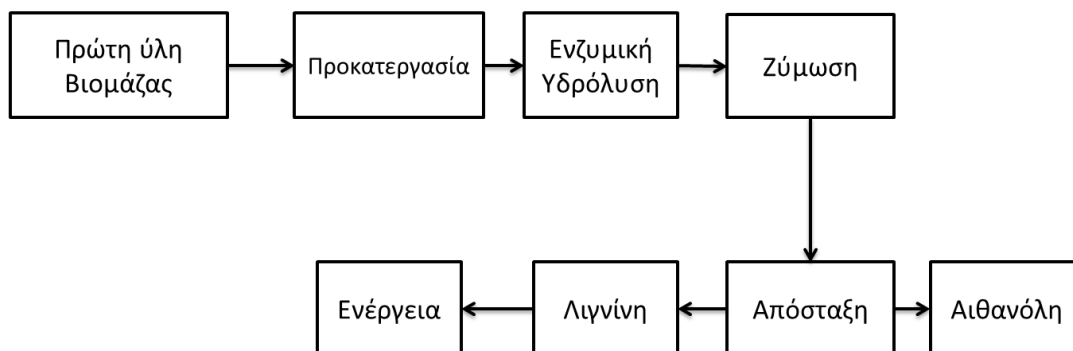
άχρηστα υπολείμματα). Ο αραβόσιτος αποτελεί τη βασική πηγή παραγωγής βιοαιθανόλης στις Η.Π.Α, των οποίων η συνολική παραγωγή αιθανόλης για καύσιμα έφτασε το 2017 τα 1,06 εκατομμύρια βαρέλια τη μέρα. Στον παρακάτω πίνακα συνοψίζονται οι συστάσεις για διάφορες πηγές βιομάζας:

Πίνακας 1.1: Ποσοστιαία Σύσταση Πηγών Βιομάζας (Zabed et al. 2016)

Βιομάζα	Κυτταρίνη	Ημικυτταρίνη	Λιγνίνη
Ενεργειακές Καλλιέργειες			
Switch Grass	5-20	30-50	10-40
Σακχαροκάλαμο	25	17	12
Αστικά και βιομηχανικά απόβλητα			
Απόβλητα τροφίμων	55,4	7,2	11,4
Χαρτιά Γραφείου	68,6	12,4	11,3
Αγροτικά Απόβλητα			
Στέλεχος Αραβόσιτου	38-40	24-26	7-19
Καλάμι Ρυζιού	28-36	23-28	12-14
Καλάμια Σταχίου	33-38	26-32	17-19
Bamboo	26-43	15-26	21-31
Ξύλα			
Softwood	27-30	35-40	25-30
Hardwood	20-25	45-50	20-25
Κουκουνάρι	44-46,4	8.8-26	29-29,4

Κεφάλαιο 2: Μετατροπή βιομάζας σε βιοαιθανόλη

Οι αυξανόμενες απαιτήσεις για ενέργεια καθώς, η συνεχώς αυξανόμενη ανησυχία για την εξάντληση των ορυκτών καυσίμων και η τάση για μείωση των εκπομπών αερίων του θερμοκηπίου οδήγησαν το Τμήμα Ενέργειας των Η.Π.Α να θέσουν στόχο την αντικατάσταση του 30% των καυσίμων τους από βιοκαύσιμα ως το 2030, ενώ η Ευρωπαϊκή Ένωση να θέσει στόχο την αντικατάσταση του 10% των καυσίμων μεταφοράς από βιοκαύσιμα ως το 2020 (Viikari et al. 2012). Κατά συνέπεια, είναι αναγκαία η βελτιστοποίηση των μεθόδων μετατροπής της βιομάζας σε βιοαιθανόλη προκειμένου να μεγιστοποιηθεί η παραγωγή της. Ωστόσο, η μετατροπή της βιομάζας αποτελεί μια σύνθετη διαδικασία η οποία αποτελείται από αρκετά στάδια. Τα βασικότερα εξ' αυτών είναι η προκατεργασία, η υδρόλυση της βιομάζας, η ζύμωση και η απόσταξη ή ο καθαρισμός του τελικού προϊόντος.



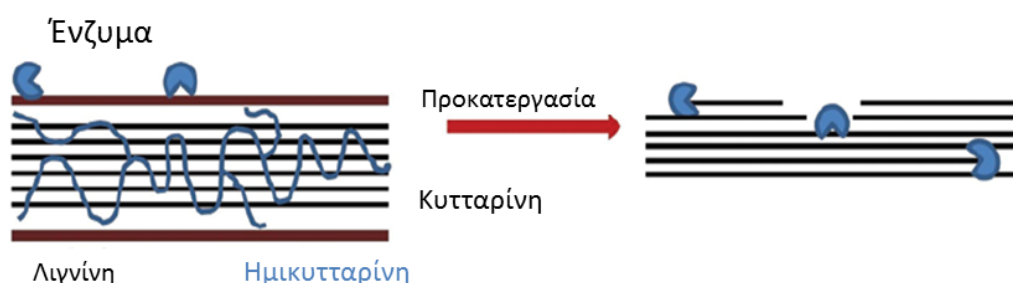
Σχήμα 2.1: Διάγραμμα ροής παραγωγής βιοαιθανόλης (Volynets, Ein-Mozaffari, and Dahman 2017)

Η προκατεργασία μερικές φορές περιλαμβάνει μηχανικές διαδικασίες μείωσης του μεγέθους οι οποίες ακολουθούνται από έντονη θερμοχημική προκατεργασία με σκοπό το σπάσιμο της δομής της βιομάζας και τη διαλυτοποίηση της ημικυτταρίνης και της λιγνίνης ώστε να είναι πιο εύκολα προσβάσιμη η κυτταρίνη στα ένζυμα της υδρόλυσης. Στην υδρόλυση παράγεται γλυκόζη από την κυτταρίνη για τη ζύμωση της αιθανόλης. Αυτά τα δύο στάδια μπορούν να συνδυαστούν σε ένα (SSF). Εδώ θα πρέπει να αναφέρουμε ότι η λιγνίνη αποτελεί αξιοποιήσιμο παραπροϊόν στη διαδικασία το οποίο μπορεί να αποτελέσει τροφοδοσία για την παραγωγή του ατμού και του ηλεκτρισμού που απαιτούνται για την παραγωγή της αιθανόλης. Ορισμένες φορές η ζήτηση σε αιθανόλη μπορεί να απαιτεί μεγάλες συγκεντρώσεις

στερεών στη βιομάζα (μεγαλύτερες του 15% w/w), οι οποίες λόγω των ρεολογικών χαρακτηριστικών προκαλούν απώλειες ενέργειας. Τότε είναι αναγκαία η βελτιστοποίηση της διεργασίας με παραλλαγή των βημάτων παραγωγής ή την κατασκευή δεξαμενών με συγκεκριμένες προδιαγραφές και διαστάσεις ώστε να επιτευχθεί ο στόχος σε παραγωγή βιοαιθανόλης.

2.1 Προκατεργασία Βιομάζας

Το πιο περίπλοκο και ακριβό κομμάτι της μετατροπής της βιομάζας σε βιοαιθανόλη είναι η προκατεργασία. Όπως προαναφέρθηκε, η κυτταρίνη της βιομάζας περικλείεται σε ένα δίκτυο από ημικυτταρίνη και λιγνίνη. Έτσι, είναι αναγκαία η διάσπαση αυτής της δομής (με αλλαγές σε μακροσκοπικό, μικροσκοπικό και υπομικροσκοπικό επίπεδο) με σκοπό την απελευθέρωση της κυτταρίνης ώστε να μπορέσουν τα υδρολυτικά ένζυμα να ξεκινήσουν την υδρόλυση της κυτταρίνης σε ζυμώσιμα σάκχαρα (Taha et al. 2016). Ακόμα, η προκατεργασία της βιομάζας περιλαμβάνει απομόνωση της λιγνίνης, μείωση της κρυσταλλικότητας της κυτταρίνης και αύξηση της επιφάνειας και του πορώδους της επιφάνειας (Wyman et al. 2005). Τέλος, μερικές μέθοδοι προκατεργασίας μπορεί να απελευθερώσουν ζυμώσιμα σάκχαρα από την υδρόλυση της ημικυτταρίνης.



Σχήμα 2.2: Ο ρόλος της προκατεργασίας στη βιομάζα (Volynets, Ein-Mozaffari, and Dahman 2017)

Η προκατεργασία δεδομένων των πόρων που χρησιμοποιεί για να επιτύχει το επιθυμητό αποτέλεσμα είναι μια διαδικασία που πρέπει να σχεδιαστεί και να βελτιστοποιηθεί και σε οικονομικό επίπεδο. Οι βασικότεροι στόχοι για μια χαμηλού κόστους προκατεργασία είναι οι εξής (Axelsson et al. 2012):

- Η ανάγκη για χημικά στην προκατεργασία και την επακόλουθη εξουδετέρωση και κατάσταση προ-ζύμωσης θα πρέπει να είναι η ελάχιστη δυνατή και χαμηλού κόστους

- Επειδή η άλεση της βιομάζας σε μικρά σωματίδια απαιτεί πολύ ενέργεια και κοστίζει, προτιμώνται τεχνολογίες προκατεργασίας που χρειάζονται ελάχιστη μείωση μεγέθους
- Θα πρέπει να επιτυγχάνονται υψηλές αποδόσεις σακχάρων ημικυτταρίνης κοντά στο 100% μέσω της προκατεργασίας
- Η συγκέντρωση των σακχάρων από την προκατεργασία και την ενζυμική υδρόλυση θα πρέπει να είναι τουλάχιστον πάνω από 10% ώστε η συγκέντρωση της παραγόμενης αιθανόλης να είναι αρκετή για τη βιωσιμότητα της διεργασίας σε κόστος
- Το κόστος των αντιδραστηρίων της προκατεργασίας θα πρέπει να κρατηθεί σε χαμηλά επίπεδα μέσω της μείωσης του όγκου τους. Ακόμα, δε θα πρέπει να υπάρχουν εξωτικά υλικά κατασκευής εξ' αιτίας του περιβάλλοντος υψηλής διαβρωτικότητας και της ανάγκης διατήρησης της πίεσης σε λογικά επίπεδα
- Το υγρό υδρόλυμα που προκύπτει από την προκατεργασία θα πρέπει να υπόκειται σε ένα στάδιο προετοιμασίας για ζύμωση το οποίο θα είναι χαμηλού κόστους και υψηλής παραγωγικότητας
- Οι χημικές ενώσεις που βρίσκονται στο υδρόλυμα (όπως ο γύψος) δε θα πρέπει να αποτελούν απειλή για άλλα στάδια της διεργασίας
- Η κυτταρίνη που προκύπτει από την προκατεργασία θα πρέπει να είναι εύκολα ζυμώσιμη με παραγωγή μεγαλύτερη του 90% σε λιγότερο από πέντε ημέρες και κατά προτίμηση τρεις ημέρες με ενζυμικό φορτίο κυτταρινασών λιγότερο των 10 FPU/γραμμάριο κυτταρίνης
- Η λιγνίνη και άλλα συστατικά θα πρέπει να ανακτηθούν για μετατροπή σε αξιοποιήσιμα παραπροϊόντα και την απλούστευση της διεργασίας
- Η κατανομή της ανάκτησης σακχάρων ανάμεσα στη προκατεργασία και την επακόλουθη υδρόλυση θα πρέπει να είναι συμβατή με την επιλογή μικροοργανισμών οι οποίοι θα ζυμώσουν τα σάκχαρα
- Οι απαιτήσεις σε θερμότητα και ισχύ για την προκατεργασία θα πρέπει να είναι χαμηλές και να μπορούν να βελτιστοποιηθούν στο πλαίσιο όλης της διεργασίας

Τεχνικές Προκατεργασίας

Η ανάγκη για προκατεργασία είναι ύψιστης σημασίας για τη μετατροπή της βιομάζας σε αιθανόλη. Για παράδειγμα, βρέθηκε ότι η μετατροπή της κυτταρίνης σε γλυκόζη από ενζυμική υδρόλυση που ακολούθησε προκατεργασία με έκρηξη ατμού ήταν τέσσερις φορές μεγαλύτερη από αυτήν του ακατέργαστου υλικού (Varga, Reczey, and Zacchi 2004). Χωρίς την προκατεργασία η ποσότητα του ενζύμου που πρέπει να χρησιμοποιηθεί για να σακχαροποιηθεί η βιομάζα είναι πολύ μεγάλη

κάνοντας τη διεργασία ανέφικτη. Οι μέθοδοι προκατεργασίας κατηγοριοποιούνται σε μηχανικές και θερμοχημικές, με τις δεύτερες να χωρίζονται περαιτέρω σε όξινες, αλκαλικές, οξειδωτικές, κλασματικές και βιολογικές. Ωστόσο, διαφορετικές μέθοδοι προκατεργασίας μπορεί να δώσουν διαφορετικά αποτελέσματα για διαφορετικά δείγματα βιομάζας αναλόγως με τη σύστασή της. Για παράδειγμα, μέθοδοι όπως η έκρηξη αμμωνίας και η υγρή οξείδωση είναι πιο αποτελεσματικές σε αγροτικά κατάλοιπα, ενώ η έκρηξη ατμού έχει δώσει υψηλές αποδόσεις σακχάρων τόσο σε αγροτικά όσο και σε δασικά απόβλητα (Hahn-Hagerdal et al. 2006).

2.1.1 Μηχανικές Μέθοδοι

Οι μηχανικές μέθοδοι περιλαμβάνουν κατά κύριο λόγο τη μέθοδο της άλεσης για τη μείωση του μεγέθους και της κοκκομετρίας της βιομάζας. Σε αυτό το πλαίσιο έχει μελετηθεί η άλεση (με ή χωρίς άλλες μεθόδους που δεν περιλαμβάνουν θεϊκό οξύ) σε ξυλώδη βιομάζα και καλάμια ρυζιού. Εναλλακτικά, μηχανική πολτοποίηση της βιομάζας με άλεση με χρήση σφαιρόμυλου έχει βρεθεί ότι παράγει προϊόντα με κυτταρίνη μειωμένης κρυσταλλικότητας κάτι που βοηθάει την παραγωγικότητα των ενζύμων. Παρόλο που οι προκατεργασίες με άλεση συχνά περιγράφονται ως τεχνικές υψηλής ενέργειας, η μέθοδος της άλεσης με υγρό δίσκο φαίνεται ότι μπορεί να αποτελέσει μια πιθανή μηχανική μέθοδο για την επεξεργασία καλάμιου ρυζιού, αφού βρέθηκε ότι με αυτό τον τρόπο δεν παράγονται παρεμποδιστές της ζύμωσης, όπως η φουρφουράλη (Da Silva et al. 2010).

2.1.2 Όξινες Μέθοδοι

Αραιό Οξύ

Το βασικότερο αντικείμενο των όξινων προκατεργασιών είναι η διαλυτοποίηση του ημικυτταρινικού κλάσματος ώστε να γίνει η κυτταρίνη πιο προσβάσιμη στα ένζυμα της υδρόλυσης. Αυτού του τύπου οι προκατεργασίες μπορούν να πραγματοποιηθούν με πυκνό ή αραιό οξύ. Ωστόσο, προτιμάται η χρήση αραιού οξέος διότι η χρήση πυκνού οδηγεί στην παραγωγή παρεμποδιστών, στη διάβρωση του εξοπλισμού και δυσκολίες στην ανάκτηση του οξέος και μειώνει το ενδιαφέρον για τη βιομηχανική του χρήση.

Αντίθετα, οι μέθοδοι προκατεργασίας με αραιά οξέα έχουν περισσότερο ενδιαφέρον για βιομηχανική εφαρμογή και έχουν μελετηθεί σε ένα μεγάλο εύρος αντιδραστήρων και δειγμάτων λιγνινοκυτταρινούχου βιομάζας. Μπορούν να πραγματοποιηθούν σε υψηλή θερμοκρασία (180 °C) για μικρό χρονικό διάστημα ή

σε χαμηλότερη θερμοκρασία (120 °C) για μεγαλύτερο χρόνο ανάκτησης (30-90 min). Αυτές οι μέθοδοι βοηθούν στην υδρόλυση της ημικυτταρίνης και κυρίως της ξυλάνης, αλλά και της μετατροπής της υδρολυμένης ημικυτταρίνης σε ζυμώσιμα σάκχαρα. Παρόλα αυτά έχει διαπιστωθεί και η παραγωγή παρεμποδιστών, ανάλογα με τη θερμοκρασία της μεθόδου που χρησιμοποιείται, όπως η φουρφουράλη, οι οποίοι επηρεάζουν το στάδιο της ζύμωσης (P. Alvira et al. 2010; Saha et al. 2005).

Το βασικότερο οξύ που χρησιμοποιείται για τις όξινες προκατεργασίες είναι το θειικό οξύ το οποίο έχει μελετηθεί διεξοδικά. Ενδεικτικά, στελέχη ρυζιού υπέστησαν προκατεργασία με 1% w/w θειικό οξύ για χρόνο από 1-5 min και παρουσιάστηκε παραγωγή σακχάρων 83% (Matthews 2016). Σε δείγμα καλαμιού με προκατεργασία με 0,75% w/w θειικό οξύ στους 120 °C για μια ώρα η παραγωγή σακχάρων ήταν ίση με 74% (Saha et al. 2005), ενώ σε δείγματα ελιάς με διάλυμα θειικού οξέος 1,4% στους 210 °C η παραγωγή σακχάρων ήταν ίση με 76,5% (Cara et al. 2008). Εναλλακτικά, μπορεί να χρησιμοποιηθεί και φωσφορικό οξύ, υδροχλωρικό οξύ και νιτρικό οξύ τα οποία έχουν δοκιμαστεί (Mosier, Hendrickson, et al. 2005), αλλά και οργανικά οξέα όπως το φουμαρικό ή το μαλεϊκό οξύ, τα οποία φαίνεται να δίνουν ικανοποιητικά αποτελέσματα σε ότι αφορά στην υδρόλυση και μάλιστα να εμφανίζουν χαμηλότερη παραγωγή φουρφουράλης σε σχέση με το θειικό οξύ (Kootstra et al. 2009).

Μέθοδος έκρηξης ατμού

Η μέθοδος έκρηξης ατμού είναι μια φυσικοχημική μέθοδος για την προκατεργασία της λιγνιοκυτταρινούχου βιομάζας και είναι η πιο διαδεδομένη και βιομηχανικά ενδιαφέρουσα μέθοδος προκατεργασίας. Είναι μια υδροθερμική διαδικασία στην οποία η βιομάζα υπόκειται σε ατμό υψηλής πίεσης για χρόνο μερικών δευτερολέπτων έως και λεπτών, με μια απότομη εκτόνωση. Αυτή η μέθοδος συνδυάζει μηχανικές δυνάμεις με χημικές επιδράσεις εξ' αιτίας της υδρόλυσης (αυτοϋδρόλυσης) των ακετυλομάδων που βρίσκονται στην ημικυτταρίνη. Η αυτοϋδρόλυση λαμβάνει χώρα όταν η υψηλή θερμοκρασία ευνοεί τη δημιουργία οξικού οξέος από ακετυλομάδες. Σε υψηλές θερμοκρασίες ακόμα και το νερό μπορεί να θεωρηθεί ως οξύ. Τα μηχανικά φαινόμενα συμβαίνουν λόγω της απότομης πτώσης πίεσης και οι ίνες διαχωρίζονται λόγω της εκρηκτικής εκτόνωσης. Σε συνδυασμό με τη μερική διαλυτοποίηση και υδρόλυση της ημικυτταρίνης, η λιγνίνη ανακατανέμεται και σε κάποιο βαθμό διαχωρίζεται από το υλικό δίνοντας έτσι στα υδρολυτικά ένζυμα πρόσβαση στα μικροϊνίδια κυτταρίνης (P. Alvira et al. 2010).

Οι πιο σημαντικοί παράγοντες που επηρεάζουν την αποτελεσματικότητα της έκρηξης ατμού είναι το μέγεθος των σωματιδίων, η θερμοκρασία, ο χρόνος

παραμονής και ο συνδυασμένη επίδραση θερμοκρασίας και χρόνου. Τα πλεονεκτήματα που προσφέρει η μέθοδος είναι σημαντικά μικρότερος περιβαλλοντικός αντίκτυπος, μικρότερες οικονομικές και ενεργειακές ανάγκες, χημικές ενώσεις χαμηλής επικινδυνότητας και πλήρη ανάκτηση σακχάρων (Avellar and Glasser 1998). Ακόμα, σημαντικά πλεονεκτήματα αποτελούν η προαιρετική χρήση όξινου καταλύτη (με εξαίρεση το μαλακό ξύλο), υψηλή ανάκτηση σακχάρων, καλή απόδοση υδρόλυσης και δυνατότητα μεταφοράς σε βιομηχανική κλίμακα. Μάλιστα, παρόλο που η αποφυγή όξινου καταλύτη αναφέρθηκε σαν πλεονέκτημα, η μέθοδος έκρηξης ατμού αναφέρεται σαν όξινη μέθοδος διότι έχει αποδειχθεί ότι η χρήση οξέων συμβάλει στην επιδεκτικότητα των σακχάρων σε ενζυμική υδρόλυση, στην υδρόλυση της ημικυτταρίνης και, ανάλογα με τη θερμοκρασία, τη μείωση παραγωγής παρεμποδιστικών ουσιών (Y. Sun and Cheng 2002). Παρόλο που υποστηρίζεται η παρουσία μειονεκτημάτων στη χρήση οξέων, αυτά περιορίζονται κυρίως σε ότι αφορά στις προδιαγραφές του εξοπλισμού και την παραγωγή παρεμποδιστικών ουσιών. Πέρα από αυτά, η χρήση οξέος βοηθάει σημαντικά στη διαλυτοποίηση της κυτταρίνης, τη μείωση της θερμοκρασίας της διεργασίας και τη μερική υδρόλυση της κυτταρίνης και μάλιστα, θεωρείται ότι συγκεκριμένα η έκρηξη ατμού με καταλύτη SO_2 είναι η πιο αποτελεσματική μέθοδος για υλικά μαλακού ξύλου (Brownell et al. 1986; Galbe and Zacchi 2002).

Τα βασικότερα μειονεκτήματα που διέπουν την έκρηξη ατμού έχουν να κάνουν με την υποβάθμιση της ημικυτταρίνης και την παραγωγή τοξικών ουσιών που παρεμποδίζουν τα στάδια της υδρόλυσης και της ζύμωσης. Τα τοξικά αυτά προϊόντα αυτά είναι κυρίως φουρανοπαράγωγα, ασθενή οξέα και φαινολικές ουσίες των οποίων η ποσότητα που παράγεται εξαρτάται από την προέλευση της βιομάζας. Τα φουρανοπαράγωγα που παράγονται είναι κυρίως η φουρφουράλη και η 5-υδροξυμεθυλοφουρφουράλη (HMF). Τα ασθενή οξέα που παράγονται είναι κυρίως οξικό οξύ, που παράγεται από τις οξικές ομάδες της ημικυτταρίνης, φορμικό οξύ και λεβουλινικό οξύ που παράγονται από περαιτέρω υποβάθμιση της φουρφουράλης. Για αυτό έχει προταθεί και η αποτοξικοποίηση του κλάσματος της βιομάζας, αλλά εξ' αιτίας του επιπλέον κόστους της μεθόδου, καλό θα ήταν να αποφευχθεί (Liu et al. 2005).

2.1.3 Αλκαλικές μέθοδοι

Η βάση για της αλκαλικές μεθόδους είναι η επίδραση που έχουν μερικές βάσεις στη λιγνινοκυτταρινούχο βιομάζα. Οι αλκαλικές προκατεργασίες αυξάνουν την επιδεκτικότητα της κυτταρίνης σε ενζυμική υδρόλυση, είναι πιο αποτελεσματικές στη διαλυτοποίηση της λιγνίνης και παρουσιάζουν μικρή διαλυτοποίηση κυτταρίνης και ημικυτταρίνης (μικρότερη από τις όξινες μεθόδους). Μπορούν να

πραγματοποιηθούν σε θερμοκρασία δωματίου για χρόνους από μερικά δευτερόλεπτα έως και μέρες και προκαλούν μικρότερη υποβάθμιση των σακχάρων απ' ότι οι όξινες μέθοδοι (Carvalho et al. 2009).

Τα βασικότερα αντιδραστήρια που χρησιμοποιούνται είναι τα υδροξείδια του νατρίου, καλίου, ασβεστίου και αμμωνίου. Εξ' αυτών, το υδροξείδιο του νατρίου (NaOH), προκαλεί διόγκωση, αυξάνοντας την εσωτερική επιφάνεια της κυτταρίνης και μειώνοντας το βαθμό πολυμερισμού και την κρυσταλλικότητα της, γεγονός που προκαλεί καταστροφή της δομής της λιγνίνης (Taherzadeh and Karimi 2008). Το υδροξείδιο του ασβεστίου ($\text{Ca}(\text{OH})_2$), γνωστό και ως lime, βοηθά στην αφαίρεση άμορφων συστατικών όπως η λιγνίνη. Με αυτόν τον τρόπο μειώνονται οι μη παραγωγικές θέσεις πρόσδεσης των ενζύμων και κατά συνέπεια αυξάνεται η ενζυμική αποτελεσματικότητα. Το Lime αφαιρεί επίσης τις ακετυλομάδες από την ημικυτταρίνη μειώνοντας την παρεμπόδιση των ενζύμων και αυξάνοντας την επιδεκτικότητα της κυτταρίνης σε ενζυμική υδρόλυση (S. Kim and Holtzapfle 2005; Mosier, Wyman, et al. 2005). Το lime επίσης είναι χαμηλότερου κόστους και υψηλότερης ασφάλειας σε σχέση με το NaOH ή το KOH και μπορεί να απομονωθεί από το υδρόλυμα με αντίδραση με CO_2 . Τέλος, η προσθήκη υπεροξειδίου το οξυγόνου σε αλκαλικές μεθόδους προκατεργασίας βοηθά στην απομάκρυνση της λιγνίνης και δεν παράγει φουρφουράλη ή HMF, γεγονός που βοηθά το στάδιο της ζύμωσης (Taherzadeh and Karimi 2008).

Προκατεργασία με έκρηξη αμμωνίας (AFEX)

Η προκατεργασία της έκρηξης αμμωνίας (AFEX), είναι μια φυσικοχημική μέθοδος στην οποία η βιομάζα υπόκειται σε υψηλές πιέσεις, σε θερμοκρασίες από 60-100 °C για χρόνους παραμονής που ποικίλουν. Αμέσως μετά οι πιέσεις παύουν με αποτέλεσμα τη γρήγορη εκτόνωση της αέριας αμμωνίας, η οποία με τη σειρά της προκαλεί διόγκωση και σπάσιμο της δομής των ινών της βιομάζας και μερική αποκρυστάλλωση της κυτταρίνης. Η AFEX σε αντίθεση με άλλες μεθόδους έκρηξης, οι οποίες παράγουν προϊόν που έχει μορφή λάσπης, παράγει μόνο στερεό προκατεργασμένο προϊόν (Alvira et al. 2010).

Τα πλεονεκτήματα της AFEX είναι πολλά. Η συγκεκριμένη μέθοδος μειώνει τη κρυσταλλικότητα της κυτταρίνης και σπάει τους δεσμούς της λιγνίνης και των υδρογονανθράκων. Κατά την προκατεργασία, μόνο ένα μικρό κομμάτι του στερεού δείγματος διαλυτοποιείται και λίγη ημικυτταρίνη και λιγνίνη αφαιρούνται, ενώ παρατηρείται και αποακετυλοποίηση της ημικυτταρίνης. Η AFEX απομακρύνει τις λιγότερο ακετυλικές ομάδες από συγκεκριμένα λιγνινοκυτταρινούχα υλικά και η επιδεκτικότητα της βιομάζας σε ενζυμική υδρόλυση αυξάνεται, οδηγώντας έτσι σε ενζυμική υδρόλυση με μεγάλη απόδοση. Παρόλα αυτά, στο προκατεργασμένο

υλικό θα πρέπει να χορηγηθούν και κυτταρινάσες και ημικυτταρινάσες διότι υπάρχει ακόμα σημαντική ποσότητα ημικυτταρίνης. Ένα άλλο πλεονέκτημα της μεθόδου είναι ότι δεν έχει παραγωγή παρεμποδιστών για τη συνολική διεργασία, παρόλο που μπορεί ενίοτε να μείνουν μερικά κομμάτια λιγνίνης και άλλα συστατικά του κυτταρικού τοιχώματος στην επιφάνεια της κυτταρίνης (Galbe and Zacchi 2002; Kumar et al. 2009; Wyman et al. 2005).

Η μέθοδος AFEX είναι πιο αποτελεσματική σε αγροτικά κατάλοιπα και βοτανικές καλλιέργειες και λιγότερο αποτελεσματική σε ξύλινη βιομάζα και στις άλλες πηγές λιγνινοκυτταρινούχου βιομάζας. Στις βέλτιστες συνθήκες η μέθοδος AFEX μπορεί να πετύχει μετατροπή κυτταρίνης και ημικυτταρίνης σε ζυμώσιμα σάκχαρα μεγαλύτερη του 90% για μια ποικιλία λιγνινοκυτταρινούχων υλικών. Μάλιστα, παρά τη μικρή αφαίρεση της λιγνίνης, η ενζυμική σακχαροποίηση σε υλικό που υπέστη προκατεργασία AFEX με χαμηλό ενζυμικό φορτίο έδωσε πολύ καλά αποτελέσματα συγκριτικά με άλλες μεθόδους προκατεργασίας (Wyman et al. 2005), το οποίο μπορεί να σημαίνει ότι η αμμωνία επιδρά στη λιγνίνη και την ημικυτταρίνη διαφορετικά απ' ότι άλλες χημικές ουσίες, μειώνοντας την ικανότητα της λιγνίνης να απορροφήσει ένζυμο κάνοντας δύσκολη την προσβασιμότητα στην κυτταρίνη.

Εναλλακτικές μέθοδοι που προκύπτουν από την AFEX είναι οι: α) Διήθηση με ανακύκλωση αμμωνίας, όπου υγρή αμμωνία (5-15% w/w) περνά μέσα από αντιδραστήρα γεμάτο βιομάζα. Η θερμοκρασία είναι σταθερά στους 140-210 °C, ο χρόνος αντίδρασης έως 90 min και ο ρυθμός διήθησης περίπου στα 5 mL/min (Y. Sun and Cheng 2002) β) Εμποτισμός με υγρή αμμωνία (SAA), η οποία αποτελεί εναλλακτική της ARP και η θερμοκρασία είναι μεταξύ 30 °C και 75 °C. Αυτή είναι μια από τις λίγες μεθόδους όπου η γλυκάνη και η ξυλάνη διατηρούνται στερεές (Kim et al. 2008).

2.1.4 Οξειδωτικές Μέθοδοι

Υγρή Οξείδωση

Η υγρή οξείδωση είναι μια οξειδωτική μέθοδος στην οποία χρησιμοποιείται οξυγόνο ή αέρας σαν καταλύτης. Επιτρέπει λειτουργία αντιδραστήρα σε σχετικά χαμηλές θερμοκρασίες και μικρούς χρόνους αντίδρασης. Η οξείδωση πραγματοποιείται για 10-15 min στους 170-200 °C και σε πιέσεις από 10 έως 12 bar O₂. Η πρόσθεση οξυγόνου σε θερμοκρασίες μεγαλύτερες των 170 °C κάνει τη διεργασία εξώθερμη μειώνοντας τη συνολική ενέργεια που απαιτείται, ενώ οι βασικές αντιδράσεις που πραγματοποιούνται στην υγρή οξείδωση είναι ο σχηματισμός οξέων από διεργασίες υδρόλυσης και οξειδωτικές αντιδράσεις (Alvira et al. 2010).

Η υγρή οξείδωση αποτελεί μια αποτελεσματική μέθοδο για τη διαλυτοποίηση της ημικυτταρίνης και της λιγνίνης καθώς και για την αύξηση της επιδεκτικότητας της κυτταρίνης σε ενζυμική υδρόλυση, ενώ χρησιμοποιείται ευρέως για την παραγωγή βιοαιθανόλης μέσω ταυτόχρονης σακχαροποίησης και ζύμωσης (SSF, Simultaneous Saccharification and Fermentation) (Martín et al. 2008). Στην υγρή οξείδωση δεν παράγονται φαινολικά παράγωγα αφού αυτά υποβαθμίζονται περαιτέρω σε καρβοξυλικά οξέα. Ωστόσο, η παραγωγή φουρφουράλης και HMF είναι μικρότερη στην υγρή οξείδωση συγκριτικά με τις μεθόδους έκρηξης ατμού. Ακόμα, το Na_2CO_3 μειώνει το σχηματισμό παρεμποδιστικών ουσιών διατηρώντας το pH κοντά στην ουδέτερη-ελαφρώς αλκαλική περιοχή. Σύμφωνα με τους Klinke et al. (2002) η προκατεργασία σιταριού με Na_2CO_3 είχε ως αποτέλεσμα την ανάκτηση του 96% της κυτταρίνης (εκ του οποίου το 65% μετατράπηκε σε γλυκόζη) και του 70% της ημικυτταρίνης, ενώ υψηλές παραγωγές επιτεύχθηκαν με υγρή οξείδωση σε αραβόσιτο και έλατο (Palonen et al. 2004).

Σε γενικές γραμμές η μέθοδος της υγρής οξείδωσης είναι επιθυμητή κυρίως λόγω της χαμηλής παραγωγής παρεμποδιστών και της αποτελεσματικής αφαίρεσης της λιγνίνης. Παρόλα αυτά, το κόστος του οξυγόνου και των καταλυτών αποτελούν σημαντικά μειονεκτήματα της μεθόδου.

Οζονόλυση

Το όζον είναι ένα πολύ ισχυρό οξειδωτικό το οποίο παρουσιάζει μεγάλη αποτελεσματικότητα στην αφαίρεση της λιγνίνης, δίνοντας έτσι καλές αποδόσεις στην ενζυμική υδρόλυση. Η προκατεργασία πραγματοποιείται συνήθως σε θερμοκρασία δωματίου και κανονική πίεση και δεν οδηγεί στο σχηματισμό παρεμποδιστικών ουσιών που να επηρεάζουν την υδρόλυση και τη ζύμωση. Η οζονόλυση έχει εφαρμοστεί σε διάφορα αγροτικά υπολείμματα όπως το σιτάρι και το ρύζι, αυξάνοντας και στις δύο περιπτώσεις την αποτελεσματικότητα της ενζυμικής υδρόλυσης. Ένα βασικό μειονέκτημα είναι η υπερβολική ποσότητα όζοντος που απαιτείται, η οποία κάνει τη διεργασία οικονομικά ανέφικτη. Ωστόσο, τα αισιόδοξα αποτελέσματα που παρουσιάζει, ωθούν στην περαιτέρω μελέτη της (Y. Sun and Cheng 2002).

Οξείδωση με ακετόνη και νερό – Acetone/Water Oxidation (AWO)

Όπως προαναφέρθηκε, οι μέθοδοι υγρής οξείδωσης αποτελούν σημαντικές τεχνικές σε ότι αφορά στην προκατεργασία της λιγνινοκυτταρινούχου βιομάζας κυρίως λόγω της μικρής παραγωγής φουρφουράλης και HMF οι οποίες αποτελούν

παρεμποδιστές της μικροβιακής ανάπτυξης. Πρόσφατα, σαν περαιτέρω ανάπτυξη, προέκυψε μια καινούργια μέθοδος της οξειδωσης με ακετόνη και νερό (AWO), στην οποία χρησιμοποιείται ένα μίγμα ακετόνης/νερού στη θέση απλά του νερού, χωρίς τη χρήση κάποιας βάσης.

Παρόλο που ελάχιστες πηγές αναφέρουν αποτελέσματα για τη συγκεκριμένη μέθοδο, φαίνεται πως συνδυάζει τα αποτελέσματα της υγρής οξειδωσης όπως χαμηλή θερμοκρασία και παραγωγή ουσιών παρεμποδιστών σε ένα στάδιο, με παράλληλη επίτευξη υψηλού διαχωρισμού της λιγνίνης (Katsimpouras et al. 2017). Η διαλυτότητα της λιγνίνης στην ακετόνη είναι σημαντικά υψηλότερη απ' ότι σε άλλους οργανικούς διαλύτες με χαμηλό σημείο βρασμού, όπως για παράδειγμα η αιθανόλη. Με αυτό τον τρόπο, η ακετόνη βοηθά στην απομάκρυνση της λιγνίνης από το κλάσμα της βιομάζας και στην αύξηση της επιδεκτικότητας του κλάσματος της κυτταρίνης σε ζύμωση (Huijgen et al. 2010). Ακόμα, η ακετόνη μπορεί εύκολα να ανακτηθεί μετά την προκατεργασία, σε σύγκριση με άλλους διαλύτες, αφού είναι εξαιρετικά πτητική (σημείο βρασμού 56 °C), δε σχηματίζει αζεότροπα με το νερό και μπορεί να καθαριστεί κατά 99% με απλή απόσταξη. Ωστόσο, η πλήρης ανάκτηση του διαλύτη είναι γενικά απίθανη, με αποτέλεσμα να απαιτείται ένα ρεύμα επαναφοράς το οποίο θα μας αποζημιώνει για την απώλεια διαλύτη.

Οι Gong et al. (2012) έδειξαν ότι η AWO είναι η πιο επιλεκτική μέθοδος στην απομάκρυνση της λιγνίνης για σάκχαρα σφενδάμου τα οποία έχουν συλλεχθεί κανονικά ή με καυτό νερό. Οι ίδιοι πέτυχαν ακόμα απομάκρυνση λιγνίνης (delignification) σε ξυλώδη μάζα από *Paulownia spp.* της τάξης του 93,6% σε ένα στάδιο και βρήκαν ότι η λιγνίνη που παράγεται είναι υψηλής ποιότητας, αφού δεν περιείχε θειικό ή ανόργανα συστατικά, όπως συμβαίνει με άλλες μεθόδους. Οι Jafari, et al. (2016) χρησιμοποίησαν ένα μίγμα 50% v/v ακετόνης-νερού το οποίο περιείχε 0,1% w/w θειικό οξύ αντί για οξυγόνο και η απόδοση της ενζυμικής υδρόλυσης αυξήθηκε στο 94,2%.

Συνοπτικά, η μέθοδος AWO αν και έχει μελετηθεί σε μικρό βαθμό, φαίνεται α παρουσιάζει ενθαρρυντικά αποτελέσματα και σημαντικά πλεονεκτήματα, κυρίως λόγω της ευκολίας διαχωρισμού των διαλυτών, του χαμηλού κόστους και του φιλικού προς το περιβάλλον χαρακτήρα. Ωστόσο, για να μειωθούν οι ενεργειακές απαιτήσεις (όπως για παράδειγμα η ενεργειακή απαίτηση της απόσταξης), είναι απαραίτητο να υπάρχει μεγάλη παραγωγή αιθανόλης από τη ζύμωση η οποία μπορεί να επιτευχθεί με τη χρήση μεγάλων συγκεντρώσεων στερεών (Katsimpouras, et al. 2017).

2.1.5 Κλασματικές Μέθοδοι

Organosolv

Η μέθοδος βασίζεται στην κατεργασία της βιομάζας με οργανικό διαλύτη ή μίγμα οργανικού και υδατικού διαλύτη παρουσία ανόργανων οξέων που δρουν ως καταλύτες σε υψηλές θερμοκρασίες. Μπορούν να χρησιμοποιηθούν διάφοροι διαλύτες όπως η μεθανόλη, η αιθανόλη, η ακετόνη, η αιθυλενογλυκόλη και η τετραϋδροφουρφουρική αλκοόλη με σκοπό τη διαλυτοποίηση της λιγνίνης. Το πλεονέκτημα που παρέχει αυτή η μέθοδος είναι η ανάκτηση καθαρής λιγνίνης ως παραπροϊόν (Zhao et al. 2009).

Η προσθήκη οξέων σαν καταλύτες στη διεργασία (κυρίως HCl, H₂SO₄, οξαλικού ή σαλικυλικού οξέος) έχει ως σκοπό το σπάσιμο των δεσμών της ημικυτταρίνης. Έτσι, συχνά παρατηρείται υψηλή παραγωγή ξυλόζης. Ωστόσο, η προσθήκη οξέων συχνά αποφεύγεται καθώς αυξάνει τη θερμοκρασία της διεργασίας (πάνω από 185 °C). Οι διεργασίες organosolv έχουν προταθεί σε συνδυασμό με όξινες μεθόδους για το διαχωρισμό ημικυτταρίνης και λιγνίνης σε διεργασίες δύο σταδίων, με απομάκρυνση 70% στη λιγνίνη και απώλεια κυτταρίνης μικρότερη του 2% (Paratheofanous et al. 1995).

Στις διεργασίες όπου γίνεται χρήση οργανικών διαλυτών είναι απαραίτητος ο διαχωρισμός τους από το κλάσμα της βιομάζας μετά την προκατεργασία, αφού οι παραπάνω μπορούν να αποτελέσουν παρεμποδιστές στη δράση των μικροοργανισμών στα επόμενα στάδια για την παραγωγή της αιθανόλης. Τέλος, το κόστος των διαλυτών είναι και αυτό ένας υπολογίσιμος παράγοντας που πρέπει να ληφθεί υπ' όψιν για την πραγμάτωση των διεργασιών αυτών. Για αυτό, προτιμώνται κυρίως αλκοόλες μικρού μοριακού βάρους και σημείου βρασμού όπως η αιθανόλη και η μεθανόλη.

Ιοντικά Υγρά-Ionic Liquids (ILs)

Ιοντικά υγρά ονομάζονται τα άλατα, που αποτελούνται από μεγάλα οργανικά κατιόντα ή μικρά ανόργανα ανιόντα και είναι υγρά σε θερμοκρασία δωματίου. Οι ιδιότητές τους, οι οποίες κυμαίνονται ανάλογα με το ανιόν ή τα συστατικά των αλκυλίων των κατιόντων, περιλαμβάνουν χημική και θερμική σταθερότητα, χαμηλή αναφλεξιμότητα, χαμηλές τάσεις ατμών και τη τάση να παραμένουν υγρά σε ένα μεγάλο εύρος θερμοκρασιών (Hayes 2009).

Οι υδρογονάνθρακες και η λιγνίνη διαλύονται ταυτόχρονα με τα ILs, διότι σχηματίζονται δεσμοί υδρογόνου ανάμεσα στα άνυδρα ιόντα χλωρίου των ILs με τα

πρωτόνια των υδροξυλίων των σακχάρων σε στοιχειομετρία 1:1. Σαν αποτέλεσμα, το περίπλοκο δίκτυο μη ομοιοπολικών δεσμών ανάμεσα στην κυτταρίνη, την ημικυτταρίνη και τη λιγνίνη σπάει και παράλληλα ελαχιστοποιείται ο σχηματισμός υποβαθμιστικών προϊόντων. Παρόλα αυτά, οι περισσότερες πληροφορίες που αναφέρθηκαν έχουν απορρεύσει από δοκιμές σε καθαρή κρυσταλλική κυτταρίνη, με αποτέλεσμα να είναι απαραίτητη η περαιτέρω μελέτη για την εξαγωγή ασφαλών συμπερασμάτων.

Προκειμένου να εισαχθούν τα ILs σε εφαρμογή μεγάλης κλίμακας, είναι προαπαιτούμενα η μελέτη για μεθόδους ενεργειακά συμφέρουσες, καθώς και η μελέτη για την τοξικότητα των ουσιών αυτών στους μικροοργανισμούς της ζύμωσης και στα ένζυμα. Ωστόσο, σε εφαρμογή προκατεργασίας στελεχών σίτου με IL (1-ethyl-3-methyl imidazolium diethyl phosphate) στους 130 °C για 30 min, η παραγωγή αναγωγικών σακχάρων ήταν 54,8% και σε ότι αφορά στην ικανότητα ζύμωσης του μικροοργανισμού, βρέθηκε ότι το συγκεκριμένο IL δεν παρουσίασε κάποια αρνητική επίδραση στην ανάπτυξη του *Saccharomyces cerevisiae* (Q. Li et al. 2009).

Τα ILs παρουσιάζουν ενδιαφέρον σαν μέθοδος για την προκατεργασία της λιγνινοκυτταρινούχου βιομάζας, αλλά είναι ακόμα σε πολύ πρώιμο στάδιο και χρειάζεται αρκετή μελέτη ακόμα για την κατανόηση της λειτουργίας τους και την εισαγωγή τους σε βιομηχανική κλίμακα (Hayes 2009).

2.1.6 Βιολογικές Μέθοδοι

Οι βιολογικές μέθοδοι προκατεργασίας περιλαμβάνουν κατεργασία του υλικού με μικροοργανισμούς και κυρίως με μύκητες καφέ και λευκής σήψης οι οποίοι διασπούν τη λιγνίνη και την ημικυτταρίνη, αλλά μικρό μέρος της κυτταρίνης η οποία είναι πιο ανθεκτική. Από τους παραπάνω μύκητες πιο αποτελεσματικοί είναι οι λευκής σήψης μύκητες από τους οποίους ενδεικτικά παραδείγματα μικροοργανισμών με υψηλή αποτελεσματικότητα απομάκρυνσης της λιγνίνης αποτελούν οι *Phanerochaete chrysosporium*, *Ceriporia lacerata*, *Cyanthus stercolerus*, *Ceriporiopsis subvermispora*, *Pycnoporus cinnabarinus*, *Pleurotus ostreatus* (P. Kumar et al. 2009).

Η διάσπαση της λιγνίνης από αυτούς του μύκητες γίνεται μέσω ειδικών ενζύμων όπως οι υπεροξειδάσες και οι λακκάσες. Ακόμα, οι βιολογικές μέθοδοι προκατεργασίας με τους συγκεκριμένους μύκητες έχουν χρησιμοποιηθεί σε συνδυασμό με διαδικασίες organosolv για την προκατεργασία δείγματος από ξύλο οξιάς (Itoh et al. 2003).

Σε γενικές γραμμές, αυτές οι διεργασίες προσφέρουν σαν πλεονεκτήματα το χαμηλό κόστος και ενέργεια, την απουσία χημικών και τις ήπιες περιβαλλοντικές συνθήκες. Ωστόσο, προκειμένου να γίνουν βιώσιμες, οι βιολογικές μέθοδοι προκατεργασίας συνήθως συνδυάζονται και με άλλου τύπου μεθόδους.

Πίνακας 2.1: Σύγκριση μεθόδων προκατεργασίας (Zabed et al. 2016)

Μέθοδος	Περιγραφή	Μειονεκτήματα
Μηχανικές	<ul style="list-style-type: none"> • Συνδυασμός άλεσης και λιωσίματος για μείωση μεγέθους σωματιδίων 	<ul style="list-style-type: none"> • Υψηλή απαίτηση σε ενέργεια και παραμονή της λιγνίνης στο μίγμα
Αραιού Οξέος	<ul style="list-style-type: none"> • Συγκέντρωση οξέων <4% • Υψηλή θερμοκρασία (180° C) για μικρό χρόνο ή χαμηλή θερμοκρασία (120° C) για 30-90 λεπτά • Χρήση οργανικών και ανόργανων οξέων 	<ul style="list-style-type: none"> • Μικρή απομάκρυνση λιγνίνης • Σχηματισμός Παρεμποδιστών • Απαίτηση εξουδετέρωσης • Απαίτηση απομάκρυνσης αλάτων εξουδετέρωσης
Πυκνού Οξέος	<ul style="list-style-type: none"> • Συγκέντρωση οξέος 70-77% και θερμοκρασίες 40-100° C • Κυρίως ανόργανα οξέα (θειικό και φωσφορικό) 	<ul style="list-style-type: none"> • Σχηματισμός παρεμποδιστών • Διάβρωση εξοπλισμού • Ανάγκη για απομόνωση του οξέος • Υψηλό Κόστος
Αλκαλικές	<ul style="list-style-type: none"> • Βάσεις NaOH, KOH, NH₄OH και Ca(OH)₂ • Θερμοκρασία δωματίου • Χρόνος αντίδρασης από δευτερόλεπτα σε μέρες 	<ul style="list-style-type: none"> • Σχηματισμός μη ανακτήσιμων αλάτων • Ανάγκη ρύθμισης του pH για επακόλουθες διεργασίες
Οζονόλυση	<ul style="list-style-type: none"> • Κατεργασία με αέριο όζον σε θερμοκρασία δωματίου σε κανονική πίεση • Χρόνος αντίδρασης μερικές ώρες 	<ul style="list-style-type: none"> • Επικινδυνότητα λόγω των ιδιοτήτων του όζοντος (έντονα αντιδραστικό, εύφλεκτο, τοξικό) • Υψηλό κόστος • Εξώθερμες αντιδράσεις ίσως χρειάζεται σύστημα ψύξης
Ιοντικά υγρά (ILs)	<ul style="list-style-type: none"> • Άλατα που αποτελούνται από μεγάλα οργανικά κατιόντα και μικρά ανόργανα ιόντα • Διατήρηση IL σε θερμοκρασία δωματίου και τάση για παραμονή στην υγρή κατάσταση για εύρος θερμοκρασιών 	<ul style="list-style-type: none"> • Ακριβή • Ανάγκη για πλύσιμο πριν την χρησιμοποιηθούν ξανά • Έλλειψη ώριμων μεθόδων

Organosolv	<ul style="list-style-type: none"> • Κατεργασία με οργανικούς ή υδατικούς διαλύτες όπως μεθανόλη, αιθανόλη, ακετόνη • Μπορούν να αναμειχθούν με όξινους καταλύτες για να σπάσουν τους δεσμούς της ημικυτταρίνης 	<ul style="list-style-type: none"> • Ανάγκη απομόνωσης του διαλύτη • Υψηλό κόστος διαλυτών • Σχηματισμός παρεμποδιστών
Έκρηξη ατμού χωρίς καταλύτη	<ul style="list-style-type: none"> • Κατεργασία σε θερμοκρασία 160-260° C και πίεση 0,69-4,83 MPa • Χρόνος αντίδρασης μερικά δευτερόλεπτα • Απουσία χημικών 	<ul style="list-style-type: none"> • Χαμηλή αφαίρεση λιγνίνης • Αποδόμηση σακχάρων • Υψηλές απαιτήσεις σε ενέργεια
Έκρηξη ατμού με καταλύτη	<ul style="list-style-type: none"> • Κατάλυση αντίδρασης από H₂SO₄ ή SO₂ • Θερμοκρασιακό εύρος 120-220° C 	<ul style="list-style-type: none"> • Σχηματισμός παρεμποδιστών • Μερική υδρόλυση της ημικυτταρίνης
AWO	<ul style="list-style-type: none"> • Χρήση μίγματος ακετόνης/νερού για οξείδωση βιομάζας χωρίς χρήση βάσης 	<ul style="list-style-type: none"> • Όχι αρκετά ανεπτυγμένη • Ανάγκη παραγωγής αρκετής αιθανόλης για βιωσιμότητα μεθόδου
Έκρηξη αμμωνίας (AFEX)	<ul style="list-style-type: none"> • Κατεργασία με άνυδρη υγρή αμμωνία στους 60-120° C, πάνω από 3 MPa για 30-60 λεπτά και γρήγορη εκτόνωση 	<ul style="list-style-type: none"> • Λιγότερο αποτελεσματική για softwoods • Περιβαλλοντικός Αντίκτυπος
Βιολογικές	<ul style="list-style-type: none"> • Κατεργασία με μικρόβια, κυρίως μύκητες 	<ul style="list-style-type: none"> • Πολύ χαμηλός βαθμός απολιγνινοποίησης • Απώλεια υδρογονανθράκων λόγω κατανάλωσης • Μεγάλοι χρόνοι παραμονής (10-14 μέρες) • Ρυθμοί απολιγνινοποίησης περιορισμένοι από τα μικρόβια

2.2 Υδρόλυση της βιομάζας

Υδρόλυση ονομάζεται η κατεργασία κατά την οποία η κυτταρίνη και η ημικυτταρίνη που βρίσκονται στη λιγνινοκυτταρινούχο βιομάζα μετατρέπονται σε ζυμώσιμα

σάκχαρα. Στις περισσότερες περιπτώσεις, το αποτέλεσμα της προκατεργασίας είναι δύο κλάσματα, ένα που περιέχει αδιάλυτα στερεά και αποτελείται κυρίως από λιγνίνη και κυτταρίνη και ένα δεύτερο υγρό κλάσμα που περιέχει την ημικυτταρίνη. Ανάλογα με τη μέθοδο προκατεργασίας η ημικυτταρίνη είτε έχει ήδη υδρολυθεί σε μονομερή σάκχαρα και μπορεί να μετατραπεί σε αιθανόλη χωρίς περαιτέρω υδρόλυση, είτε χρειάζεται επιπλέον υδρόλυση προκειμένου να αποπολυμεριστεί τελείως και να είναι δυνατή η ζύμωση των σακχάρων της (Lavarack, Griffin, and Rodman 2002). Τα βασικότερα σάκχαρα στην ημικυτταρίνη είναι η μαννόζη σε softwoods και η ξυλόζη σε hardwoods και αγροτικά υπολείμματα, με μια μικρή ποσότητα αραβινόζης και γαλακτόζης. Από την άλλη πλευρά, το σάκχαρο που παράγεται από την κυτταρίνη είναι η γλυκόζη. Ανάλογα, με τη μέθοδο προκατεργασίας υπάρχει πιθανότητα να έχει υδρολυθεί ένα μικρό κομμάτι της κυτταρίνης σε γλυκόζη, ωστόσο η πλειονότητα της κυτταρίνης παραμένει ανέπαφη και χρειάζεται περαιτέρω υδρόλυση. Σε γενικές γραμμές, η υδρόλυση της κυτταρίνης και της ημικυτταρίνης στα μονομερή σάκχάρά τους μπορεί να χωριστεί σε όξινη και σε ενζυμική.

2.2.1 Όξινη Υδρόλυση

Η όξινη υδρόλυση χαρακτηρίζεται από δύο προσεγγίσεις: α) κατεργασία με αραιό οξύ σε υψηλή θερμοκρασία και πίεση για μικρό χρονικό διάστημα (από δευτερόλεπτα μέχρι λεπτά), β) κατεργασία με πυκνό οξύ σε χαμηλή θερμοκρασία. Τα βασικότερα μειονεκτήματα με την όξινη υδρόλυση είναι οι απαιτήσεις για ανάκτηση του οξέος μετά την υδρόλυση ή η εξουδετέρωσή τους πριν τη ζύμωση και κατ' επέκταση η παραγωγή μεγάλων ποσοτήτων αποβλήτων. Στην όξινη υδρόλυση χρησιμοποιείται κατά κύριο λόγο θειικό οξύ, ωστόσο μπορούν να χρησιμοποιηθούν και άλλα ανόργανα οξέα όπως υδροχλωρικό οξύ, νιτρικό οξύ, τριφθοροξικό οξύ (TFA) και φωσφορικό οξύ.

Η υδρόλυση με αραιό οξύ είναι μια διαδικασία δυο σταδίων κατά την οποία στο πρώτο στάδιο σε χαμηλή θερμοκρασία γίνεται περαιτέρω μετατροπή της ημικυτταρίνης σε μονομερή σάκχαρα, γιατί η ημικυτταρίνη αποπολυμερίζεται σε χαμηλότερη θερμοκρασία απ' ό,τι η κυτταρίνη λόγω της διαφοράς της δομής των δυο υδρογονανθράκων. Το δεύτερο στάδιο περιλαμβάνει υψηλές θερμοκρασίες από 230 °C και 240 °C για τη μετατροπή της κυτταρίνης σε γλυκόζη (Wyman 1999). Τα βασικά μειονεκτήματα της μετατροπής κυτταρίνης με χρήση οξέος είναι οι απαιτήσεις σε υψηλή θερμοκρασία και ο κίνδυνος σχηματισμού παρεμποδιστών από την υποβάθμιση των σακχάρων. Οι περισσότερο χρησιμοποιούμενες συγκεντρώσεις θειικού οξέος είναι από 0,5% έως 1,5% και οι θερμοκρασίες 120 °C-160 °C.

Από την άλλη πλευρά, η μέθοδος πυκνού οξέος μπορεί να εφαρμοστεί για τον αποπολυμερισμό και της ημικυτταρίνης και της κυτταρίνης. Τα οξέα που χρησιμοποιούνται είναι τα ίδια με συγκεντρώσεις περίπου στο 41% για υδροχλωρικό, 100% για TFA και 70-90% για θειικό. Οι χρόνοι αντίδρασης είναι συνήθως αρκετά μεγαλύτεροι συγκριτικά με αυτούς της μεθόδου αραιού οξέος. Ωστόσο, η μέθοδος του πυκνού οξέος επιτυγχάνει ολοκληρωτική και γρήγορη μετατροπή της κυτταρίνης σε γλυκόζη και της ημικυτταρίνης στα πέντε μονομερή της. Παρόλα αυτά, η διάβρωση του εξοπλισμού λόγω της μεγάλης συγκέντρωσης οξέος αποτελεί βασικό μειονέκτημα (Zabed et al. 2016).

2.2.2 Ενζυμική Υδρόλυση

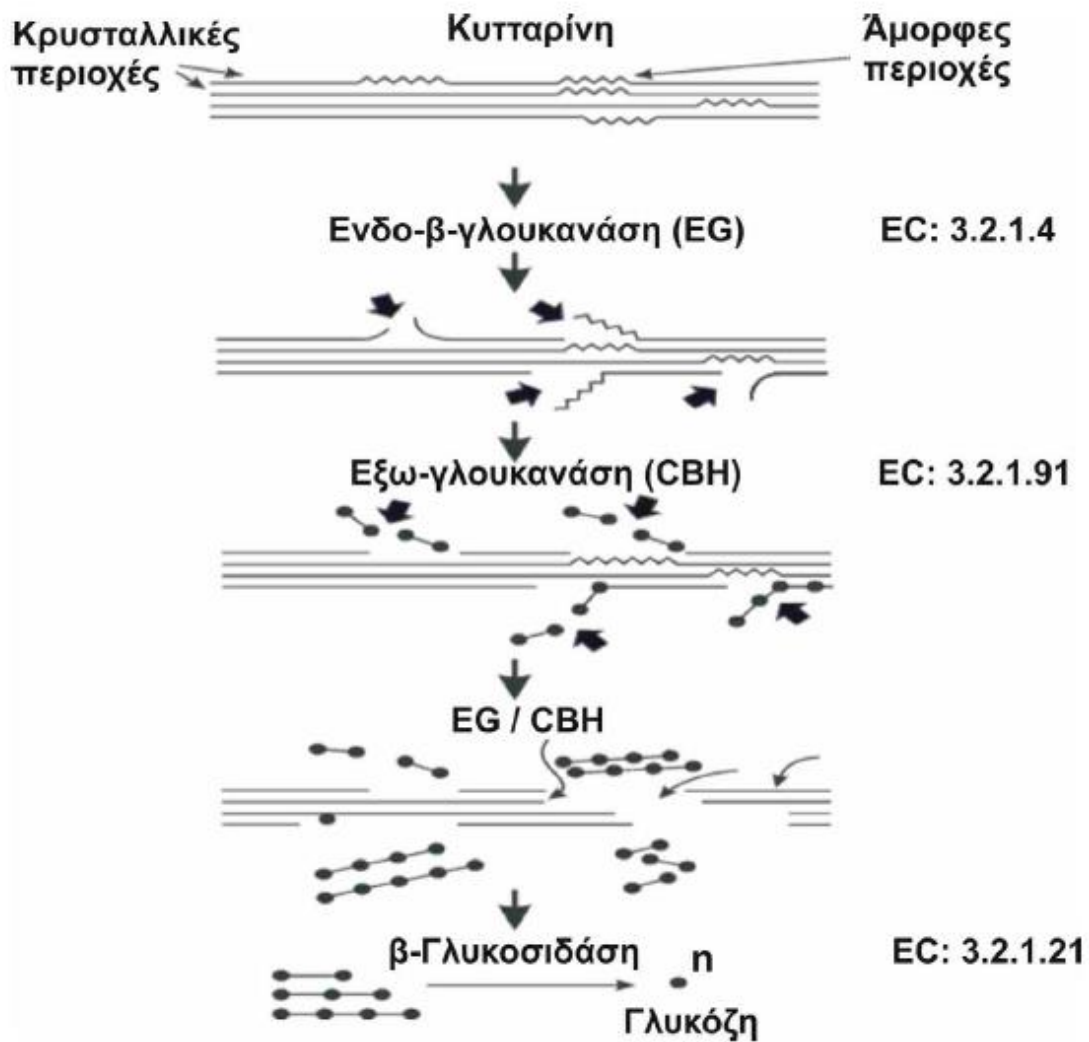
Η ενζυμική υδρόλυση της βιομάζας επιτυγχάνεται είτε χρησιμοποιώντας μικροοργανισμούς οι οποίοι παράγουν ένζυμα στα διάφορα στάδια της ανάπτυξής τους ή απευθείας εμπορικά σκευάσματα που περιέχουν συστήματα ενζύμων, με το δεύτερο να είναι το επικρατέστερο. Η ενζυμική υδρόλυση θεωρείται η πιο πολλά υποσχόμενη και αποτελεσματική μέθοδος υδρόλυσης, λόγω της αποκλειστικότητας των ενζύμων με το υπόστρωμα, τις σχετικά χαμηλές θερμοκρασίες και το σχηματισμό λίγων παρεμποδιστών. Ωστόσο, η παραγωγή εμπορικής αιθανόλης μπορεί να αποτελέσει πρόκληση, λόγω αφ' ενός του κόστους των ενζύμων και αφ' ετέρου του γεγονότος ότι η παραγωγή σακχάρων κατά την υδρόλυση με ένζυμα είναι χαμηλότερη της θεωρητικής. Τα ένζυμα που χρησιμοποιούνται είναι οι κυτταρινάσες για τη διάσπαση της κυτταρίνης, οι ξυλανάσες για τη διάσπαση της ημικυτταρίνης και οι λιγνινάσες για τη διάσπαση της λιγνίνης (Zabed et al. 2016).

Κυτταρινάσες

Η ομάδα των κυτταρινασών αποτελείται από πολλά ένζυμα τα οποία λειτουργούν συνεργιστικά για τη διάσπαση της κυτταρίνης και τη μετατροπή της σε γλυκόζη. Τουλάχιστον τρία ένζυμα απαιτούνται για ένα τυπικό σύστημα ενζύμων για τη βιομετατροπή της κυτταρίνης σε γλυκόζη: οι ενδο-1-4-β-γλουκανάσες ή καρβοξυλομεθυλοκυτταρινάσες, οι εξωγλουκανάσες ή κελλοβιοζυδρολάσες και οι β-γλυκοζιδάσες (Χριστακόπουλος n.d.).

- Ενδο-1-4-β-γλουκανάσες: Υδρολύουν 1, 4-β-D-γλυκοζιτικούς δεσμούς τυχαία, στις αλυσίδες των άμορφων περιοχών των μορίων της κυτταρίνης ή στην επιφάνεια των μικροϊνιδίων και παράγουν ελεύθερες αλυσίδες που έχουν αναγωγικά (CBHI) και μη αναγωγικά άκρα (CBHII)

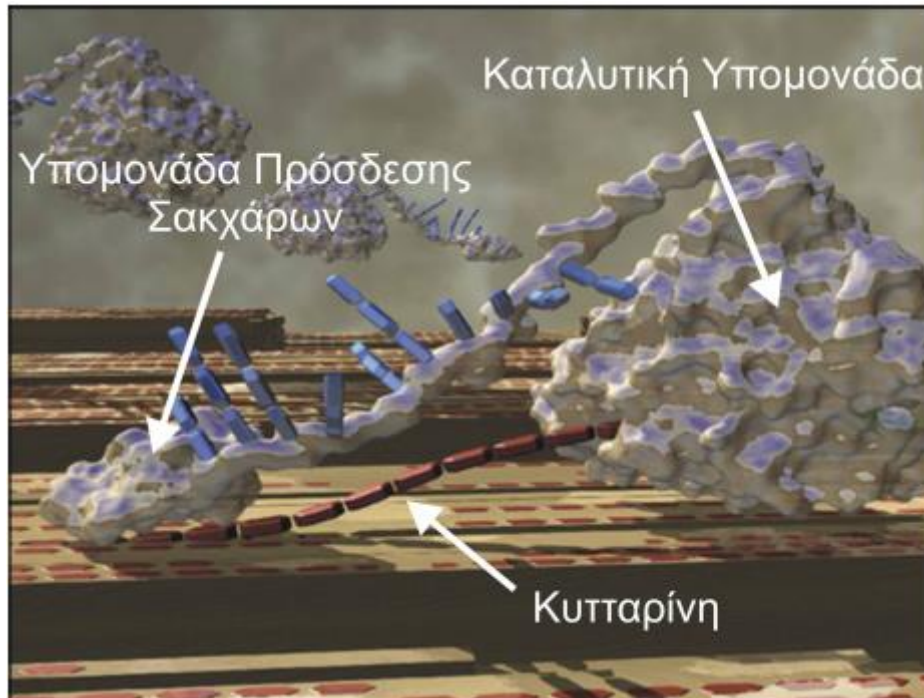
- Εξωγλουκανάσες: Επιδρούν στα αναγωγικά και μη αναγωγικά άκρα κόβοντας τα και παράγουν μόρια κελλοβιόζης
- β-γλυκοζιδάσες: Επιδρούν στα μόρια κελλοβιόζης μετατρέποντάς τα σε γλυκόζη



Σχήμα 2.3: Δράση κυτταρινασών για την παραγωγή γλυκόζης από κυτταρίνη στη βιομάζα (Χριστακόπουλος 2015)

Περισσότερες από 90 οικογένειες γλυκοζυλ-υδρολασών έχουν περιγραφεί σύμφωνα με τη βάση δεδομένων CAZY (Carbohydrate Active enZymes). Η μοριακή διαμόρφωση των ενδογλουκανασών και των εξωγλουκανασών είναι σημαντική για την καταλυτική τους ενεργότητα και εξειδίκευση. Και τα δύο ένζυμα είναι δομικά οργανωμένα σε δύο υπομονάδες. Η μεγαλύτερη ομάδα από τις δύο, είναι η καταλυτική ομάδα που υδρολύει τους γλυκοζιδικούς δεσμούς της αλυσίδας της κυτταρίνης, ενώ η μικρότερη υπομονάδα δεν έχει κάποιο καταλυτικό ρόλο, αλλά είναι αυτή που προσδένεται στην κυτταρίνη φέρνοντας την σε επαφή με την

καταλυτική ομάδα αυξάνοντας το χρόνο επαφής με το κυτταρινούχο υπόστρωμα. Η μικρή ομάδα ονομάζεται υπομονάδα πρόσδεσης σακχάρων (carbohydrate binding domain, CBD) και συνδέεται με την καταλυτική υπομονάδα μέσω μιας πεπτιδικής αλυσίδας, που αποτελείται συνήθως από 50-60 αμινοξέα (Χριστακόπουλος 2015).



Σχήμα 2.4: Απεικόνιση μορίου κυτταρινάσης (Χριστακόπουλος n.d.)

Ημικυτταρινάσες-Ξυλανάσες

Σε αντίθεση με την κυτταρίνη, η ημικυτταρίνη αποτελεί ένα περίπλοκο χημικό σύστημα, του οποίου η διάσπαση απαιτεί περισσότερα και πιο συγκεκριμένα ένζυμα. Τα ένζυμα που προκαλούν τη διάσπαση της ημικυτταρίνης αποκαλούνται ξυλανάσες και αποτελούν μέλη των οικογενειών 5, 7, 8, 10, 11 και 43 της ευρύτερης ομάδας των γλυκοζυλ-υδρολασών (GH), σύμφωνα με την τράπεζα δεδομένων CAZY. Η αποικοδόμηση της αλυσίδας της ημικυτταρίνης (ξυλάνης) επιτυγχάνεται με τη δράση δύο ενζύμων: τις ενδο-ξυλανάσες, οι οποίες έχουν τη δυνατότητα να διασπούν την αλυσίδα της ξυλάνης σε μικρότερους ολιγοσακχαρίτες, οι οποίοι μπορούν με τη σειρά τους να αποδομηθούν περαιτέρω σε ξυλόζης από τις β-ξυλοζιδάσες (Χριστακόπουλος 2015). Ακόμα, λόγω της περίπλοκης μορφής του μορίου της ημικυτταρίνης, προκειμένου να απομακρυνθούν οι πλευρικές ομάδες και να σπάσει η αλυσίδα της ξυλάνης σε μονομερή, η οικογένεια των ξυλανασών περιλαμβάνει ένζυμα όπως: i) οι α-L-αραβινοφουρανοζιδάσες, οι οποίες καταλύουν την υδρόλυση πλευρικών μονάδων L-αραβινόζης, ii) τις α-γλυκουρονοζιδάσες οι οποίες απομακρύνουν τις ομάδες του γλυκουρονικού οξέος, iii) τις ακετυλο-

Θεωρητικό Μέρος

εστεράσες ή εστεράσες του οξικού οξέος, οι οποίες απελευθερώνουν ακετυλομάδες που είναι υποκαταστάτες της βασικής αλυσίδας της ξυλάνης, iv) τις εστεράσες του φερουλικού και π-κουμαρικού οξέος, οι οποίες έχουν την ικανότητα να υδρολύουν τον εστερικό δεσμό μεταξύ υδροξυ-κινναμικών οξέων (όπως το φερουλικό ή το π-κουμαρικό οξύ) (Zabed et al. 2016).

Λιγνινάσες

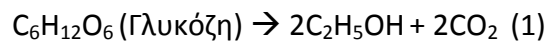
Λόγω της δομικής πολυπλοκότητας της λιγνίνης, αρκετά οξειδωτικά ένζυμα απαιτούν τη συνεργιστική δράση των κυτταρινασών και των ημικυτταρινασών για την κατάρριψη του φράγματος της λιγνίνης. Τα βασικότερα ένζυμα που διασπούν τη λιγνίνη είναι υπεροξειδάσες και λακκάσες (Zabed et al. 2016).

Η μετατροπή της λιγνινοκυτταρινούχου βιομάζας σε ζυμώσιμα σάκχαρα εξαρτάται από τις συνθήκες υδρόλυσης και τους τύπους βιομάζας. Η παραγωγή σακχάρων μπορεί να επηρεάζεται από αρκετούς παράγοντες οι οποίοι ομαδοποιούνται σε δυο κατηγορίες: παράγοντες που αφορούν τα ένζυμα και τη διεργασία και παράγοντες που αφορούν το υπόστρωμα. Η πρώτη ομάδα αφορά κυρίως τη φύση και τις προδιαγραφές των ενζύμων καθώς και τις συνθήκες και τον τύπο προκατεργασίας. Η δεύτερη ομάδα περιλαμβάνει τους παρακάτω παράγοντες (Zabed et al. 2016):

- Σύνθεση και δομή υποστρώματος
- Κρυσταλλικότητα κυτταρίνης
- Βαθμός πολυμερισμού κυτταρίνης
- Διαθέσιμη επιφάνεια στο υπόστρωμα
- Παρουσία της λιγνίνης στη βιομάζα που μπορεί να εμποδίσει την ενζυμική υδρόλυση σαν φυσικό εμπόδιο
- Περιεχόμενο σε ημικυτταρίνη (Η απομόνωση της ημικυτταρίνης αυξάνει το μέγεθος των πόρων του υποστρώματος και κατά συνέπεια την προσβασιμότητα στην κυτταρίνη)
- Μέγεθος σωματιδίων υποστρώματος τροφοδοσίας (μείωση του μεγέθους αυξάνει την ειδική επιφάνεια και κατά συνέπεια την προσβασιμότητα στην κυτταρίνη)
- Πορώδες (το μέγεθος των πόρων της βιομάζας σε σχέση με το μέγεθος των ενζύμων μπορεί να είναι ο βασικός παράγοντας παρεμπόδισης στην υδρόλυση της βιομάζας)
- Πάχος κυτταρικού τοιχώματος στη βιομάζα που εμποδίζει τη διείσδυση του υγρού
- Μεταβολές στην προσβασιμότητα των ενζύμων

2.3 Ζύμωση

Μετά την προκατεργασία και την υδρόλυση της λιγνινοκυτταρινούχου βιομάζας, τα απλά σάκχαρα που έχουν παραχθεί ζυμώνονται από κατάλληλους μικροοργανισμούς για παραγωγή αιθανόλης. Η συνολική διεργασία ονομάζεται ζύμωση και σημαντικοί παράγοντες για την επιτυχία της και την παραγωγή υψηλής ποσότητας αιθανόλης θεωρούνται η υψηλή ανάπτυξη των κυττάρων καθώς και η συνολική κυτταρική μάζα. Ωστόσο, οι παραπάνω δύο παράγοντες επηρεάζονται από άλλα χαρακτηριστικά, όπως η εξάντληση του υποστρώματος των σακχάρων. Κατά το στάδιο της ζύμωσης λαμβάνουν χώρα οι παρακάτω αντιδράσεις μετατροπής των πεντοζών και των εξοζών που προέκυψαν από την κυτταρίνη και την ημικυτταρίνη (Zabed et al. 2016):



Η ζύμωση μπορεί να πραγματοποιηθεί σε τρεις μεθόδους όπως είναι η διαλείπωντος έργου, η ημιδιαλείπωντος έργου και η συνεχής ζύμωση, η επιλογή των οποίων γίνεται ανάλογα με τις κινητικές των μικροοργανισμών και τον τύπο των υποστρωμάτων τροφοδοσίας. Σε καλλιέργειες διαλείπωντος έργου ο μικροοργανισμός αναπτύσσεται σε κλειστό σύστημα με συγκεκριμένο αριθμό θρεπτικών συστατικών με συνέχιση της ζύμωσης μέχρι την εξάντληση των συστατικών. Είναι η πιο απλή μορφή ζύμωσης, στην οποία δεν προστίθεται τίποτα στον όγκο της αντίδρασης παρά μόνο ορισμένες βάσεις ή οξέα για ρύθμιση του pH (Olsson and Hahn-Hägerdal 1996).

Στο σύστημα ημιδιαλείπωντος έργου ο μικροοργανισμός λειτουργεί σε χαμηλή συγκέντρωση υποστρώματος κατά τη διάρκεια της διαδικασίας ζύμωσης. Οι παραπάνω καλλιέργειες συχνά καλύτερα αποτελέσματα συγκριτικά με τις άλλες μεθόδους κυρίως λόγω του πλεονεκτήματος, ότι σε τέτοια συστήματα είναι δυνατή η επίτευξη της μέγιστης συγκέντρωσης κυττάρων, την αύξηση του χρόνου ζωής της καλλιέργειας, και η επίτευξη μεγαλύτερων συγκεντρώσεων προϊόντων (Chandel et al. 2013).

Η συνεχής ζύμωση πραγματοποιείται σε διάφορους τύπους βιοαντιδραστήρων και περιλαμβάνει συνεχή παροχή υποστρώματος, μέσου καλλιέργειας και θρεπτικών συστατικών στο σύστημα της ζύμωσης (Balat 2011).

Ένας άλλος τρόπος διαχωρισμού των μεθόδων ζύμωσης είναι σε σχέση με την υδρόλυση και το στάδιο που λαμβάνουν χώρα οι δύο διεργασίες. Έτσι, μπορούμε να χωρίσουμε τις μεθόδους σε ξεχωριστής υδρόλυσης και ζύμωσης (SHF, Separate Hydrolysis and Fermentation), ταυτόχρονης σακχαροποίησης και ζύμωσης (SSF,

Simultaneous Saccharification and Fermentation) και ενοποιημένης διεργασίας (CBP, Consolidated Bioprocess).

2.3.1 Διακριτή υδρόλυση και ζύμωση (SHF)

Σε αυτή τη μέθοδο ζύμωσης τα ένζυμα απελευθερώνουν στο πρώτο στάδιο μονομερή σάκχαρα και σε δεύτερο στάδιο ο μικροοργανισμός μετατρέπει τα σάκχαρα σε αιθανόλη. Σε αυτή τη διεργασία, εφαρμόζονται άριστες συνθήκες για κάθε στάδιο με αποτέλεσμα τα ένζυμα να εμφανίζουν αυξημένη καταλυτική δραστηριότητα διότι δρουν στις βέλτιστες θερμοκρασίες τους και οι μικροοργανισμοί παρουσιάζουν μέγιστο δυναμικό παραγωγής διότι δρουν σε πιο ήπιες θερμοκρασίες. Ωστόσο, πολλές φορές είναι απαραίτητος ο διαχωρισμός των πεντοζών και των εξοζών που προκύπτουν από το πρώτο στάδιο διότι οι μικροοργανισμοί ενδέχεται να μην ζυμώνουν και τους δύο μονοσακχαρίτες (Χριστακόπουλος 2015; Gírio et al. 2010).

2.3.2 Ταυτόχρονη σακχαροποίηση και ζύμωση (SSF)

Σε αυτή τη διεργασία τα σάκχαρα που παράγονται από τη δράση των ενζύμων καταναλώνονται αμέσως από τους μικροοργανισμούς για την παραγωγή αιθανόλης διατηρώντας τις συγκεντρώσεις σακχάρων σε χαμηλά επίπεδα. Για αυτό το λόγο είναι αναγκαίο οι συνθήκες του αντιδραστήρα να είναι όσο το δυνατόν βέλτιστες για τα ένζυμα και τους μικροοργανισμούς. Η συγκεκριμένη μέθοδος έχει σαν αποτέλεσμα μεγαλύτερη απόδοση στην παραγωγή της αιθανόλης, διότι μια πιθανή παρεμπόδιση από τα παράγωγα της υδρόλυσης εξαλείφεται λόγω της άμεσης κατανάλωσης των σακχάρων. Το βασικότερο πρόβλημα της μεθόδου αυτής αποτελεί η εύρεση κατάλληλων συνθηκών (συνήθως θερμοκρασίας και pH) για τα ένζυμα και τους μικροοργανισμούς, αφού τα πρώτα λειτουργούν ιδανικά συνήθως σε pH 4-5 και θερμοκρασία 40-50 °C, ενώ η ζύμωση πραγματοποιείται σε θερμοκρασία 30 °C και pH ίδιο (Χριστακόπουλος 2015; Ishola et al. 2013).

2.3.3 Ενοποιημένη διεργασία

Η ενοποιημένη διεργασία αποτελεί μια εναλλακτική στην SSF. Σε αυτή τη διεργασία στόχος είναι η εύρεση και χρήση ενός μικροοργανισμού ο οποίος θα μπορεί να υδρολύσει της βιομάζα και να ζυμώσει ο ίδιος τα παράγωγα της υδρόλυσης σε ένα στάδιο. Τέτοιο οργανισμοί είναι οι *Fusarium oxysporum*, *Monilia sp.* και *Neurospora*

crassa. Ωστόσο, οι μικροοργανισμοί αυτοί παράγουν αιθανόλη σε σχετικά χαμηλούς ρυθμούς και συγκεντρώσεις με αποτέλεσμα να μην είναι δυνατή η βιομηχανική τους εφαρμογή (Parisutham et al. 2014).

2.3.4 Μικροοργανισμοί που χρησιμοποιούνται στη ζύμωση

Αρκετά βακτήρια και ζύμες μπορούν να ζυμώσουν διαλυτά σάκχαρα σε απουσία οξυγόνου, με αποτέλεσμα την παραγωγή αιθανόλης. Αυτοί οι μικροοργανισμοί μπορεί να προέρχονται από ζύμες, βακτήρια και μύκητες. Ωστόσο, δεν είναι όλοι οι μικροοργανισμοί το ίδιο αποδοτικοί και ικανοί στην παραγωγή αιθανόλης και μόνο ελάχιστοι χρησιμοποιούνται για βιομηχανική παραγωγή.

Ο βασικότερος και πιο ευρέως χρησιμοποιούμενος μικροοργανισμός για την παραγωγή αιθανόλης είναι ο *S. cerevisiae* που έχει βρεθεί ότι ταιριάζει αρκετά καλά σε υδρολύματα λιγνινοκυτταρινούχου βιομάζας (Galbe and Zacchi 2002). Ο μικροοργανισμός αυτός ζυμώνει όλες τις εξόζες που προέρχονται από τη λιγνινοκυτταρινούχο πρώτη ύλης με απόδοση κοντά σε αυτή της θεωρητικής που είναι 0,51 g αιθανόλης ανά g γλυκόζης, όμως δεν μπορεί να ζυμώσει τις πεντόζες που προέρχονται από την ημικυτταρίνη. Η ιδανική θερμοκρασία λειτουργίας του μικροοργανισμού για βιομηχανική παραγωγή είναι οι 30 °C σε pH 5.0 (με εύρος θερμοκρασίας 20-40 °C και pH 3-7,5), εμφανίζει μεγάλες αποδόσεις αιθανόλης, υψηλή παραγωγικότητα, υψηλή αντοχή σε αιθανόλη, σκληρές συνθήκες διεργασιών και χαμηλό pH. Ωστόσο, προκειμένου ο μικροοργανισμός να μπορέσει να ζυμώσει μια πληθώρα υποστρωμάτων συμπεριλαμβανόμενων και των πεντοζών της ξυλάνης, γίνονται προσπάθειες από τη μεταβολική μηχανική με χρήση της τεχνολογίας ανασυνδυασμένου DNA για την εισαγωγή γονιδίων τα οποία μπορούν να μετατρέπουν την ξυλόζη σε αιθανόλη.

Ο δεύτερος πιο σημαντικός μικροοργανισμός που παράγει αιθανόλη είναι το βακτήριο *Zyotomonas mobilis*, ο οποίος χρησιμοποιείται για παραγωγή αιθανόλης σε pH 5 και θερμοκρασίες μεταξύ 30-40 °C. Έχει μικρή ενεργειακή απόδοση και για αυτό ο μεταβολισμός του επιταχύνεται τρομερά, με αποτέλεσμα την παραγωγή γλυκολυτικών εζύμων σε υψηλά επίπεδα και κατ' επέκταση την υψηλή απόδοση παραγωγής αιθανόλης.

Ο *Escherichia coli* είναι ένας αιθανολοπαραγωγός μικροοργανισμός ο οποίος έχει τη δυνατότητα να καταναλώνει ένα μεγάλο εύρος υποστρωμάτων μετατρέποντας πεντόζες, εξόζες και ουρονικά οξέα σε πυροσταφυλικό. Στη συνέχεια, το πυροσταφυλικό μετατρέπεται σε ένα μίγμα από ίσα μέρη αιθανόλης, οξικού, γαλακτικού και φορμικού οξέος. Κατά κανόνα, οι ζυμώσεις του γίνονται σε pH 7 και θερμοκρασίες 30-35 °C. Ο στόχος για τη χρήση αυτού του μικροοργανισμού είναι να καταστεί κατάλληλος για διεργασίες χρήσης λιγνινοκυτταρινούχων πρώτων υλών

για παραγωγή αιθανόλης ή για να στραφούν τα μεταβολικά του μονοπάτια προς την παραγωγή αιθανόλης, υποβαθμίζοντας την παραγωγή οξικού και γαλακτικού οξέος.

Ο μικροοργανισμός *Pichia Stipitis* ξεκίνησε να χρησιμοποιείται λόγω της ικανότητάς του να μεταβολίζει εκτός από τη γλυκόζη και την ξυλόζη. Ωστόσο, το μειονέκτημα της χρήσης του είναι ότι παρεμποδίζεται από τις ουσίες που σχηματίζονται κατά τη διάρκεια της προκατεργασίας και της υδρόλυσης της βιομάζας, καθώς και το γεγονός ότι για το συμμεταβολισμό της γλυκόζης και της ξυλόζης απαιτούνται μικροαερόβιες συνθήκες.

Συνοψίζοντας, οι βασικότεροι στόχοι για την επιλογή ενός μικροοργανισμού είναι αρχικά, η ικανότητά του να παράγει αιθανόλη από λιγνινοκυτταρινούχες πρώτες ύλες και μια υψηλή παραγωγικότητα σε αυτό το πλαίσιο. Ωστόσο, οι επιλεγμένοι μικροοργανισμοί θα πρέπει να διαθέτουν και επιπλέον χαρακτηριστικά για τη βελτιστοποίηση της παραγωγής της αιθανόλης, τα οποία μπορεί να είναι η ελαχιστοποίηση παραγωγής παραπροϊόντων, η αυξημένη αντοχή στην αιθανόλη (η οποία είναι τοξική για τους περισσότερους μικροοργανισμούς), η αυξημένη αντοχή σε παρεμποδιστές που παράγονται είτε στο στάδιο της προκατεργασίας, είτε της υδρόλυσης, είτε της ζύμωσης (όπως για παράδειγμα φουρφουράλη ή HMF), καθώς και ικανότητα ταυτόχρονης κατανάλωσης ενός εύρους σακχάρων όπως οι πεντόζες της ξυλάνης πέρα από τις εξόζες της κυτταρίνης.

2.3.5 Χρήση υψηλών συγκεντρώσεων στερεών (High Gravity)

Οι αυξημένες ανάγκες για παραγωγή αιθανόλης και για μείωση του κόστους των διεργασιών έχουν οδηγήσει στην ανάπτυξη μεθόδων που γίνεται χρήση υψηλής συγκέντρωσης στερεών. Ακόμα, χρησιμοποιώντας συνθήκες HG (συγκέντρωση σακχάρων της τάξης των 200-250 g/l) έχει βρεθεί πως πέρα από την ελάττωση του κόστους, λαμβάνεται και προϊόν καλύτερης ποιότητας (Korppam et al. 2014).

Ωστόσο, η χρήση τέτοιων συνθηκών παρουσιάζει κάποια προβλήματα, αφού πολλοί θερμοχημικοί και δομικοί παράγοντες μπορεί να κάνουν τη βιομάζα ανεπίδεκτη σε διάσπαση. Η χρήση υψηλών συγκεντρώσεων στο στάδιο της προκατεργασίας με σκοπό την απελευθέρωση μεγάλων ποσοτήτων σακχάρων στην ενζυμική υδρόλυση σημαίνει την ανάγκη για αντιμετώπιση πολλών προκλήσεων όπως περιορισμούς λόγω φαινομένων μεταφοράς μάζας, αυξημένο ιξώδες υλικού και δημιουργία υψηλών συγκεντρώσεων παρεμποδιστών που επηρεάζουν την υδρόλυση και τη ζύμωση.

Προκειμένου να επιτευχθεί μια συγκέντρωση αιθανόλης μεγαλύτερη του 4% w/w, που αποτελεί το ελάχιστο όριο, τα επίπεδα των σακχάρων θα πρέπει να είναι της

τάξης του 8% w/w, το οποίο μπορεί να σημαίνει ότι η περιεκτικότητα σε στερεά θα πρέπει να είναι μεγαλύτερη του 20% w/w για αρκετές πρώτες ύλες (Larsen et al. 2008). Ωστόσο, τα κυτταρινούχα υποστρώματα έχουν μικρή πυκνότητα και είναι πολύ υγροσκοπικά, το οποίο προϋποθέτει για υψηλή υγρασία στα υλικά. Έτσι, οι λάσπες κυτταρίνης γίνονται σταδιακά πιο πηχτές, ιξώδεις και δύσκολο να χειριστούν για συγκεντρώσεις στερεών μεγαλύτερες του 15% w/w. Σε ότι αφορά στην προκατεργασία, η δυσκολία που παρουσιάζουν οι συνθήκες HG έγκειται στην παραγωγή μεγάλων ποσοτήτων παρεμποδιστών οι οποίοι θα πρέπει να απομακρυνθούν με διαφορετική διεργασία ή να εισαχθεί ένα στάδιο αποτοξικοποίησης. Ακόμα, σε διεργασίες HG είναι απαραίτητο οι μικροοργανισμοί που θα χρησιμοποιηθούν να έχουν αυξημένη αντίσταση στις υψηλές συγκεντρώσεις παρεμποδιστών κατά το στάδιο της ζύμωσης και να μπορούν να προσαρμόζονται γρήγορα στην εναλλαγή του περιβάλλοντος της ζύμωσης. Σε αυτό το στόχο, πιθανή λύση θα μπορούσε να είναι είτε η γενετική τροποποίηση και εξέλιξη των στελεχών μικροοργανισμών που πραγματοποιούν τη ζύμωση ώστε να αυξηθεί η αντίστασή τους στους παρεμποδιστές (Hawkins and Doran-Peterson 2011) ή η μετατροπή της μεθόδου ζύμωσης ώστε να δημιουργηθεί ένα περιβάλλον με μικρότερες συγκεντρώσεις παρεμποδιστών (SSF) (Koppram et al. 2014).

Συνοπτικά, οι δυνατότητες που παρέχουν οι μέθοδοι σε συνθήκες HG δημιουργούν την ανάγκη για καλύτερη κατανόηση των φυσικοχημικών και βιολογικών προκλήσεων των μεθόδων αυτών. Ο σχεδιασμός διεργασιών με κατάλληλες συνθήκες (στρατηγικές τροφοδοσίας, αποτοξικοποίηση, προϋδρόλυση) με σκοπό την καταπολέμηση του αυξημένου ιξώδους, των προβλημάτων στα φαινόμενα μεταφοράς και της δημιουργίας παρεμποδιστών, θα οδηγήσει σε αποτελεσματικότερη ζύμωση του υλικού και υψηλότερη παραγωγή αιθανόλης.

Κεφάλαιο 3: Ξυλοολιγοσακχαρίτες ως πρεβιοτικά

Με την αυξημένη ευαισθητοποίηση και ενημέρωση του κόσμου σχετικά με τη διατροφή, η έρευνα στα τρόφιμα ξεπερνά την απλή μελέτη για παροχή ενέργειας στον άνθρωπο και μεταστρέφεται στη μελέτη της βιολογικής δράσης των τροφίμων στην ανθρώπινη υγεία. Έτσι, έχει θεσπιστεί ο όρος “λειτουργικό τρόφιμο” για προϊόντα τα οποία παρουσιάζουν φυσιολογικά οφέλη. Αυτά τα λειτουργικά τρόφιμα περιλαμβάνουν διάφορα βιοενεργά συστατικά ανάμεσα στα οποία βρίσκονται και ουσίες οι οποίες αποκαλούνται πρεβιοτικά και παρουσιάζουν αυξημένο επιστημονικό ενδιαφέρον.

3.1 Πρεβιοτικά

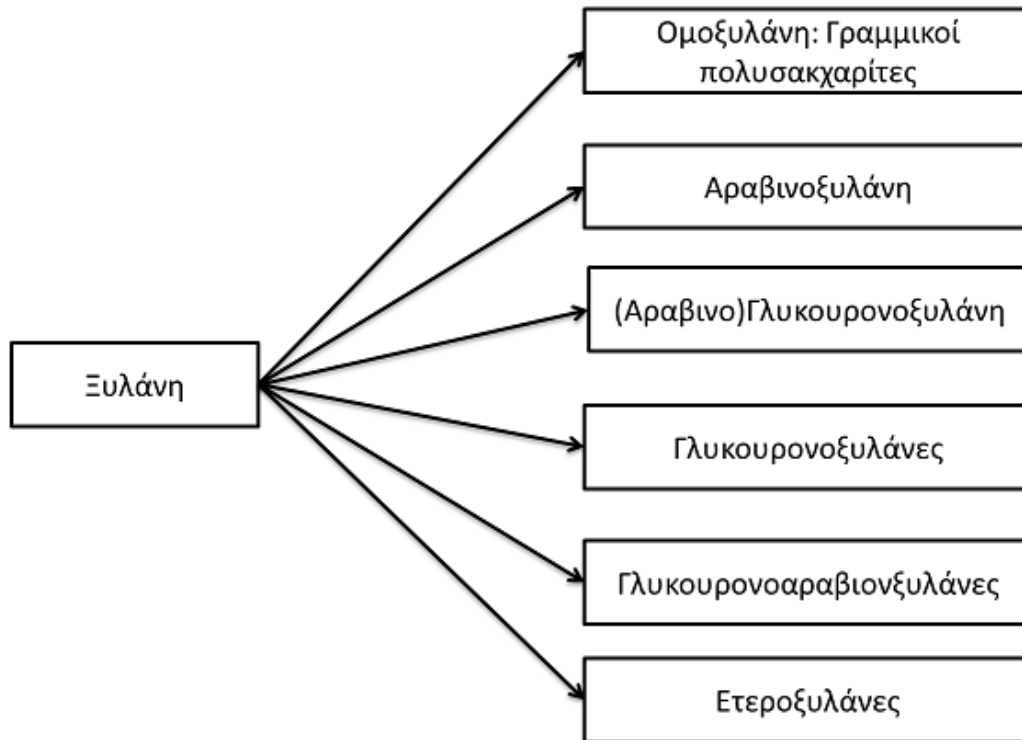
Ως πρεβιοτικά περιγράφονται, συστατικά των τροφίμων τα οποία δεν πέπτονται από τον ανθρώπινο οργανισμό ή εμφανίζουν χαμηλή πεπτικότητα και βοηθούν επιλεκτικά την ανάπτυξη ορισμένων ειδών μικροοργανισμών της μικροχλωρίδας του εντέρου, εξασφαλίζοντας έτσι οφέλη για το άνθρωπο (Gibson and Roberfroid 1995). Σύμφωνα με τον FAO (Food and Agricultural Organization) μια ουσία θα πρέπει να πληροί τρία κριτήρια για να μπορέσει να αποκαλείται πρεβιοτικό: να είναι χημικό συστατικό και όχι μικροοργανισμός ή φάρμακο, τα οφέλη στην υγεία του ανθρώπου να είναι μετρήσιμα και όχι λόγω της απορρόφησης στο αίμα ή της δράσης της ουσίας από μόνη της και να μπορούν να προξενήσουν αλλαγές στη σύσταση ή τις δραστηριότητες της μικροχλωρίδας του οργανισμού ξενιστή. Ωστόσο, πέρα από τα βασικά αυτά κριτήρια ένα ιδανικό πρεβιοτικό πρέπει να πραγματοποιεί τα εξής (Samanta et al. 2015):

- Επιλεκτική ζύμωση από την ωφέλιμη μικροχλωρίδα του εντέρου
- Ρύθμιση της ομοιόστασης της εντερικής μικροχλωρίδας προς το ωφέλιμο με αποτέλεσμα την αύξηση του πληθυσμού ή των μεταβολικών αντιδράσεων
- Διασφάλιση της υγείας του ξενιστή
- Να προέρχεται από φυτά ή να συντίθενται από μικροοργανισμούς ή τα ένζυμά τους
- Διατήρηση της δομής τους μέσα από την πορεία διαφόρων γαστροεντερικών τμημάτων
- Απουσία προβλημάτων υπολειμμάτων
- Χρήση ιδανικά ως τρόφιμο ή πρόσθετο τροφίμου
- Συμβατότητα με άλλα τρόφιμα ή συστατικά τροφίμων

Τα πρεβιοτικά περιλαμβάνουν ολιγοσακχαρίτες και πολυσακχαρίτες οι οποίοι αντιστέκονται στην ενζυμική υδρόλυση από τα ένζυμα των θηλαστικών, ζυμώνονται από την εντερική μικροχλωρίδα και τονώνουν επιλεκτικά την ανάπτυξη της εντερικής μικροχλωρίδας. Τα πρεβιοτικά περιλαμβάνουν ενώσεις όπως οι φρουκτοολιγοσακχαρίτες, οι γαλακτοολιγοσακχαρίτες, οι ισομαλτοολιγοσακχαρίτες και οι ξυλοολιγοσακχαρίτες.

3.2 Ξυλοολιγοσακχαρίτες

Σύμφωνα με την IUP-IPAC, ολιγοσακχαρίτες ονομάζονται τα ολιγομερή τα οποία αποτελούνται από 2-10 μόρια μονοσακχαριτών. Οι ολιγοσακχαρίτες είναι υδατάνθρακες χαμηλού μοριακού βάρους οι οποίοι μπορούν να κατηγοριοποιηθούν σε χωνεύσιμους και μη χωνεύσιμους (Mussatto and Mancilha 2007). Οι ξυλοολιγοσακχαρίτες είναι προϊόντα υδρόλυσης της ξυλάνης (ημικυτταρίνης) του κυτταρικού τοιχώματος των φυτών και αποτελούνται από ολιγομερή ξυλόζης ενωμένα με β-1,4 γλυκοζιδικό δεσμό (ξυλόζη, ξυλοβιόζη, ξυλοτριόζη, ξυλοτετραόζη κ.ό.κ.), με διάφορους υποκαταστάτες όπως το ακετυλοξύ, το φαινολικό οξύ και το ουρονικό οξύ. Βρίσκονται στα φρούτα, τα λαχανικά, το μπαμπού, το μέλι, το γάλα καθώς και σε λιγνινοκυτταρινούχο βιομάζα πλούσια σε ξυλάνη (ημικυτταρίνη) (Kumar et al. 2012).



Σχήμα 3.1: Κατηγοριοποίηση των πολυσακχαριτών της ξυλάνης (Ebringerová 2006)

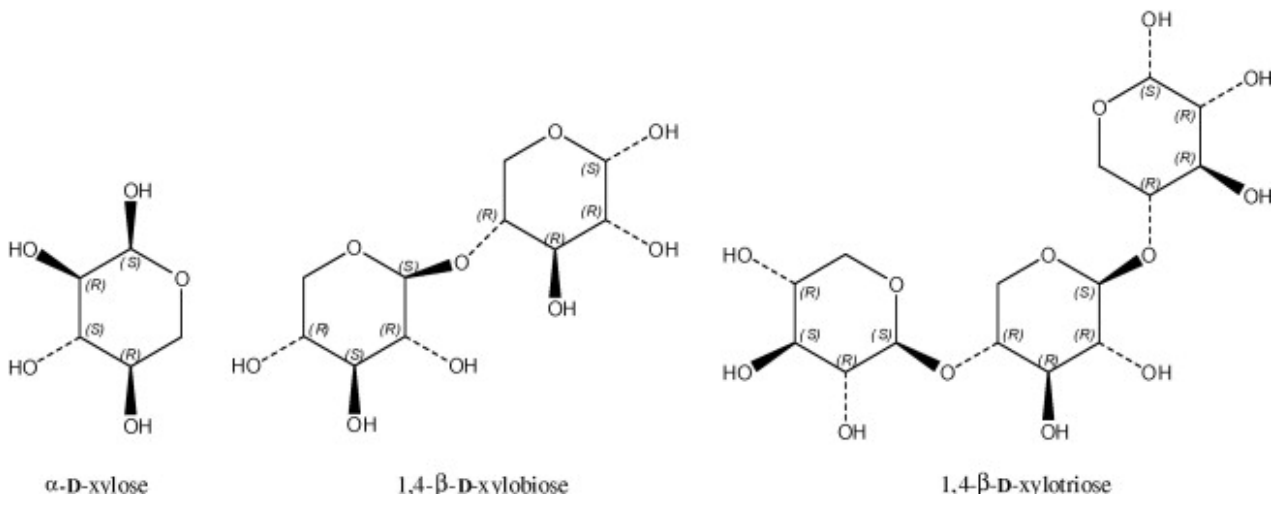
3.3 Οφέλη των ολιγοσακχαριτών

Ως συστατικά των τροφίμων, οι ξυλοολιγοσακχαρίτες είναι μη καρκινογενείς, τονώνουν τη βακτηριακή ανάπτυξη και ζύμωση και βελτιώνουν την απορρόφηση των μετάλλων.

Σε ότι αφορά στις ανωμαλίες στο μεταβολισμό, οι ξυλοολιγοσακχαρίτες μπορούν να παίξουν ένα σημαντικό ρόλο λόγω της ικανότητάς τους να ελέγχουν το βάρος του σώματος, την ομοιοστάση της γλυκόζης και των λιπιδίων, την ευαισθησία της ινσουλίνης και τη ρύθμιση του δείκτη φλεγμονής. Ακόμα, η τόνωση των bifidobacteria (*Bifidobacterium spp.*) από τους ολιγοσακχαρίτες οδηγεί σε καταστολή της ζύμωσης των πρωτεϊνών μειώνοντας τα επίπεδα των τοξικών καταβολιτών όπως η αμμωνία και οι φαινόλες μειώνοντας τον κίνδυνο για φλεγμονώδη νοσήματα (Bone et al. 1976).

Οι ξυλοολιγοσακχαρίτες έχουν επίσης αντιοξειδωτικές ιδιότητες οι οποίες αποδίδονται στην παρουσία οξέων ενωμένων με εστερικό δεσμό στην αλυσίδα της ξυλάνης, όπως το φερουλικό οξύ. Μελέτες επαλήθευσαν τις αντιοξειδωτικές ιδιότητες του φερουλικού οξέος σε ποντικούς που τρέφονταν με φερουλοποιημένους ολιγοσακχαρίτες από στάχυ (Wang et al. 2010), καθιστώντας τους αξιόπιστους σαν υποκατάστατα τροφίμων.

Το γαστρεντερικό σύστημα υπόκειται σε πολλά ερεθίσματα αντιγόνων από τρόφιμα και μικροοργανισμούς. Για αυτό το λόγο είναι αναγκαία η άμεση ανοσοποιητική απόκριση για την καταπολέμηση μιας παθογένειας, ενώ παράλληλα πρέπει να αποφευχθεί η υπερευαίσθητη αντίδραση με τα διαιτητικά αντιγόνα. Οι πρεβιοτικές ίνες μετριάζουν την ανοσοποιητική απόκριση μέσω της άμεσης επαφής με bifidobacteria (*Bifidobacterium spp.*) και με βακτήρια του λακτικού οξέος. Τέλος οι ξυλοολιγοσακχαρίτες παρεμποδίζουν την παραγωγή φλεγμονωδών ουσιών στους μακροφάγους, επιδεικνύοντας, έτσι, αντιφλεγμονώδη και ανοσοποιητική δραστηριότητα (Singh et al. 2015).



Εικόνα 3.1: Ολιγομερή της ξυλόζης

ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ

Κεφάλαιο 4: Υλικά και Μέθοδοι

4.1 Υλικά

4.1.1 Στέλεχος αραβοσίτου

Το δείγμα στελέχους αραβοσίτου ($93.9 \pm 0,1$ % DM) παραχωρήθηκε από το Τμήμα Γεωπονίας, Φυτικής Παραγωγής και Αγροτικού Περιβάλλοντος του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας. Τα στελέχη υπέστησαν ξήρανση στον αγρό και άλεση μέχρι τελικής κοκκομετρίας 0,75 mm. Η αποθήκευση πραγματοποιήθηκε σε σφραγισμένα πλαστικά δοχεία.

Στη συνέχεια το υλικό υποβλήθηκε σε προκατεργασία, με σκοπό τον προσδιορισμό των βέλτιστων συνθηκών για τη διεργασία, στο Εθνικό Κέντρο Έρευνας και Τεχνολογικής Ανάπτυξης (ΕΚΕΤΑ) στη Θεσσαλονίκη. Η διαδικασία της προκατεργασίας ήταν η εξής: 50 g υλικού εισήχθησαν σε αυτόκλειστο με 500 g μείγματος ακετόνης/νερού σε αναλογία υγρού προς στερεό 10:1. Η πίεση του αντιδραστήρα ήταν 40 atm και η κατανομή της θερμότητας στο υλικό ρυθμίστηκε με ανάδευση στα 150 rpm. Η θερμοκρασία και ο χρόνος αντίδρασης ορίστηκαν στους 175 °C και στις 2 h αντίστοιχα. Μετά το τέλος της αντίδρασης ο χρόνος ψύξης τέθηκε ίσος με 15 min και η ψύξη επιτεύχθηκε εξωτερικά με χρήση αέρα και εσωτερικά με κυκλοφορία ψυχρού νερού μέσω πηνίου ψύξης (cooling coil). Το στερεό υπόλειμμα που διαχωρίστηκε από την υγρή φάση υπέστη πλύση με 250 g ακετόνης και αφέθηκε για ξήρανση σε φούρνο στους 80 °C για μια μέρα.

4.1.2 Μικροοργανισμοί

4.1.2.1 *Saccharomyces cerevisiae*

Για τα πειράματα ζύμωσης των σακχάρων της βιομάζας χρησιμοποιήθηκε ο μικροοργανισμός *S. Cerevisiae* EthanolRed της εταιρείας Fermentis (Lesaffre, France). Ο μικροοργανισμός αυτός είναι μεσόφιλος με βέλτιστες συνθήκες θερμοκρασίας από 20 °C έως 40 °C και pH 3,0-7,5. Έχει τη δυνατότητα να παράγει αιθανόλη από τη ζύμωση των εξοζών που προέρχονται από τη βιομάζα, αλλά δε μπορεί να ζυμώσει τις πεντόζες. Η ζύμωση γίνεται σε αναερόβιες συνθήκες.

4.1.2.2 *Pichia Pastoris*

Στην παρούσα διπλωματική εργασία για την παραγωγή της ξυλανάσης (της οικογένειας GH-11) του μικροοργανισμού *Fusarium oxysporum*, χρησιμοποιήθηκε το μετασηματισμένο στέλεχος του ζυμομύκητα *Pichia pastoris*. Ο μονοκύτταρος μεθυλότροφος μικροοργανισμός *P. Pastoris* έχει παραδοσιακά αποτελέσει σύστημα ετερόλογης έκφρασης γονιδίων από ευκαρυωτικούς οργανισμούς, καθώς χαρακτηρίζεται από τα ειδικά λειτουργικά πλεονεκτήματα των ανώτερων συστημάτων έκφρασης, όπως είναι οι μετα-μεταφραστικές τροποποιήσεις (δημιουργία δισουλφιδικών δεσμών και γλυκοζυλίωση πρωτεϊνών). Ως σύστημα είναι εύκολο στη χρήση, με υψηλό ρυθμό αύξησης ακόμα και σε θρεπτικά μέσα ιδιαίτερα χαμηλού κόστους. Συγκεκριμένα, το ένζυμο αλκοολική οξειδάση, το οποίο κωδικοποιείται από δυο γονίδια με υψηλή ομολογία (97% ομολογία), το *AOX1* και το *AOX2*, καταβολίζει τη μεθανόλη σε φορμαλδεΐδη παρουσία οξυγόνου. Υψηλότερα επίπεδα ενζύμου παράγονται με την έκφραση του γονιδίου *AOX1*, εν αντιθέσει με την έκφραση του *AOX2* που οδηγεί σε χαμηλότερα επίπεδα. Τα κύτταρα στα οποία εκφράζονται και τα δυο γονίδια αυξάνονται σε υψηλές συγκεντρώσεις μεθανόλης (φαινότυπος Mut^+ , methanol utilization plus), ενώ εκείνα στα οποία εκφράζεται μόνο το *AOX2* γονίδιο, έχουν τη δυνατότητα να αυξάνονται σε μικρές συγκεντρώσεις μεθανόλης (φαινότυπος Mut^s , methanol utilization slow). Τέλος, στο συγκεκριμένο ζυμομύκητα διευκολύνεται η απομόνωση υψηλών συγκεντρώσεων ετερόλογων πρωτεϊνικών μορίων λόγω έκκρισης περιορισμένων ποσοτήτων ενδογενών πρωτεϊνών.

4.1.3 Χημικά Αντιδραστήρια

Τα χημικά αντιδραστήρια και τα αναλώσιμα υλικά που χρησιμοποιήθηκαν, προμηθεύτηκαν από τις εταιρείες Sigma-Aldrich (Η.Π.Α), Panreac (Ιταλία), Applichem (Γερμανία), LAB-SCAN (Ιρλανδία) και FischerScientific (Η.Π.Α) και η καθαρότητά τους ήταν αναλυτικού βαθμού

Τα πλαστικά και γυάλινα εργαστηριακά είδη που χρησιμοποιήθηκαν ήταν των εταιρειών Greiner-BioOne (Γερμανία), Eppendorf (Γερμανία), Whatman (Ηνωμένο Βασίλειο), Millipore (Η.Π.Α), SterilinLimited (Ηνωμένο Βασίλειο), SIMAX (Τσεχία), SCHOTTAG (Γερμανία), BOMEX (Κίνα) και ISOLAB (Γερμανία).

4.1.4 Υλικά και στήλες Χρωματογραφίας

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

4.1.5 Εμπορικά Ένζυμα

Στα πειράματα ενζυμικής υδρόλυσης χρησιμοποιήθηκε το ενζυμικό παρασκεύασμα Cellic CTec2 (Novozymes, Δανία) που περιέχει κυτταρινάσες από το μικροοργανισμό *Trichoderma reesei*. Σε αυτό, περιέχονται ημικυτταρινάσες και ενισχυτικά ένζυμα της οικογένειας AA9 ή Lytic Polysaccharide Monooxygenases, LPMO's (CAZy AA9, πρώην GH61) που βοηθούν την υδρόλυση της κυτταρίνης. Οι βέλτιστες συνθήκες θερμοκρασίας και pH για το ένζυμο είναι αντίστοιχα 45-50 °C και 5.0-5.5, η ενεργότητα προσδιορίστηκε σε 84 FPU/mL ενώ το περιεχόμενο σε πρωτεΐνη υπολογίστηκε με τη μέθοδο Bradford σε 90 mg/ mL.

4.1.6 Ρυθμιστικά διαλύματα

Το ρυθμιστικό διάλυμα που χρησιμοποιήθηκε για την εκπόνηση των υδρολύσεων και των ζυμώσεων της παρούσας διπλωματικής ήταν κιτρικών-φωσφορικών με pH 5.0 που προκύπτει από την ανάμιξη 25.7 mL Na₂HPO₄ συγκέντρωσης 0.2 M με 24.3 mL κιτρικού οξέος συγκέντρωσης 0.1 M.

4.1.7 Θρεπτικά μέσα

Τα θρεπτικά μέσα που χρησιμοποιήθηκαν για την ανάπτυξη των μικροοργανισμών αποστειρώνονταν σε αυτόκαυστο στους 121 °C για 15 min και υπό πίεση 0,1 MPa. Η γλυκόζη αποστειρώνεται ξεχωριστά υπό μορφή σκόνης. Για την παραγωγή στερεού θρεπτικού μέσου γίνεται προσθήκη 2% άγαρ. Οι συστάσεις των θρεπτικών μέσων παρουσιάζονται στον παρακάτω πίνακα:

Πίνακας 4.1 : Σύσταση θρεπτικών μέσων

Θρεπτικό Μέσο	Σύσταση
YPD	1% (w/v) εκχύλισμα ζύμης, 2% (w/v) πεπτόνη, 2% (w/v) άγαρ, 2% (w/v) γλυκόζη
BMGY	1% (w/v) εκχύλισμα ζύμης, 2% (w/v) πεπτόνη, 100mM ΡΔ φωσφορικών pH 6.0, 1,34% (w/v) YNB, 4×10^{-5} (w/v) βιοτίνη, 1% (w/v) γλυκερόλη
BMMY	1% (w/v) εκχύλισμα ζύμης, 2% (w/v) πεπτόνη, 100mM ΡΔ φωσφορικών pH 6.0, 1,34% (w/v) YNB, 4×10^{-5} (w/v) βιοτίνη, 0,5% (w/v) μεθανόλη

4.1.8 Συσκευές και όργανα

Παρακάτω παρατίθεται η λίστα με τις συσκευές και τα όργανα που χρησιμοποιήθηκαν:

- Ηλεκτρονικοί ζυγοί ακριβείας Bell Engineering (Ιταλία), KernABS (Γερμανία)
- Φωτόμετρο S-22 UV-VIS Spectrophotometer, BOECO (Γερμανία)
- Φωτόμετρο Microplate reader (Spectramax 250, Molecular devices)
- Συσκευή μέτρησης pHWTW 537, WTW (Γερμανία)
- Συσκευή διήθησης υπό κενό
- Συσκευή υπερδιήθησης Stirred Cell Model 8400 (Amicon, Millipore, Η.Π.Α)
- Συσκευή εξάχνωσης υπό κενό (freeze drying) ChristALPHA 1-4, B. BraunBiotec. International, Melsugen (Γερμανία)
- Ξηραντήρας WTEbinder 7200 Tutteigen (Γερμανία)
- Φυγόκεντρος Beckman Coulter (Η.Π.Α) και μικροφυγόκεντρος πάγκου Eppendorf 3200 (Γερμανία)
- Επωαστήρας ZHWY-211C, Zhicheng (Κίνα)
- Επωαστήρας Orbital Incubator S150, Stuart Scientific (Μ. Βρετανία)
- Θερμαινόμενος επωαστήρας με ανάδευση Eppendorf Thermomixer Comfort, Eppendorf (Γερμανία)
- Σύστημα παραγωγής υπερκαθαρού νερού DirectQ, Millipore (Η.Π.Α)
- Σύστημα χρωματογραφίας υψηλής απόδοσης (HPLC) Shimadzu (Ιαπωνία), με σύστημα αυτόματης παροχής διαλύτη (Shimadzu LC-20AD), ανιχνευτή δείκτη διάθλασης (Shimadzu RID 10A), αυτόματο δειγματολήπτη (Shimadzu SIL-20A) και λογισμικό σύστημα (LC solution έκδοση 1.24 SP1, Shimadzu)

- Φούρνος-πυριαντήριο Muffle Furnace, Size 1, Gallenkamp (Γερμανία)

4.2 Μέθοδοι

4.2.1 Ανάλυση σύστασης στελέχους αραβοσίτου

4.2.1.1 Σκοπός

Σκοπός της ανάλυσης σύστασης του στελέχους αραβοσίτου είναι ο προσδιορισμός της ημικυτταρίνης, κυτταρίνης, λιγνίνης και τέφρας που περιέχονται σε αυτό.

4.2.1.2 Ανάλυση σύστασης

Τα ποσοστά κυτταρίνης, λιγνίνης, ημικυτταρίνης και περιεχόμενης τέφρας προσδιορίστηκαν με βάση το πρωτόκολλο σύστασης βιομάζας NREL (βάλε βιβλιογραφία). Σύμφωνα με αυτό, αρχικά πραγματοποιήθηκε όξινη υδρόλυση 300 mg ξηρού υλικού με 3 mL διαλύματος 72% w/w θειικού οξέος, με σκοπό τη διαλυτοποίηση της κυτταρίνης, της ημικυτταρίνης και της λιγνίνης. Η υδρόλυση πραγματοποιήθηκε σε κωνικές φιάλες των 100 mL οι οποίες τοποθετήθηκαν σε επωαστήρα για 60 min σε θερμοκρασία 30 °C και ανάδευση 180 rpm, ενώ έγινε επιπλέον ανάδευση με υάλινη ράβδο προκειμένου να κατανεμηθεί το θειικό οξύ ομοιόμορφα σε όλο το κλάσμα της βιομάζας.

Αφότου ολοκληρώθηκε η όξινη υδρόλυση, έγινε προσθήκη 84 mL απιονισμένου νερού για την αραιώση του πυκνού θειικού οξέος ώστε η τελική συγκέντρωση να είναι 4% w/w. Ακολούθησε αποστείρωση των κωνικών φιαλών στους 121 °C για 60 min, μετά το τέλος της οποίας οι κωνικές φιάλες αφέθηκαν να κρυώσουν σε θερμοκρασία δωματίου.

Ακολούθησε διήθηση του μείγματος υπό κενό με σκοπό το διαχωρισμό του υγρού (διήθημα), το οποίο περιέχει την κυτταρίνη, την ημικυτταρίνη και τη λιγνίνη που έχουν διαλυθεί, με το στερεό υπόλειμμα το οποίο περιέχει την αδιάλυτη σε οξύ λιγνίνη και την τέφρα της βιομάζας.

Για τη μέτρηση της αδιάλυτης λιγνίνης αρχικά, τοποθετήθηκε το στερεό υπόλειμμα σε προζυγισμένο υάλινο ηθμό και οδηγήθηκε σε φούρνο θερμοκρασίας 105 °C για ξήρανση. Μετά την ξήρανση μετρήθηκε η μάζα του ξηρού υπολείμματος, η οποία αποτελεί το άθροισμα της αδιάλυτης λιγνίνης και τέφρας. Στη συνέχεια, το στερεό υπόλειμμα τοποθετήθηκε σε φούρνο στους 575 °C για αποτέφρωση σε

προζυγισμένη κάψα. Μετά το στάδιο της αποτέφρωσης ζυγίζεται η μάζα του υλικού που απέμεινε, η οποία αποτελεί την τέφρα που περιέχεται στο υλικό.

Για τον προσδιορισμό του ποσοστού κυτταρίνης, ημικυτταρίνης και διαλυτής λιγνίνης χρησιμοποιήθηκε το διήθημα της διαδικασίας διήθησης. Για τον υπολογισμό της διαλυτής λιγνίνης πραγματοποιήθηκε φωτομέτρηση του δείγματος σε κυψελίδα χαλαζία στα 320 nm μετά από αραιώση του δείγματος με 4% w/v θειικό οξύ (H_2SO_4). Ακολούθησε εξουδετέρωση του διηθήματος με ανθρακικό ασβέστιο ($CaCO_3$) έως ότου το pH φτάσει στην περιοχή 5-6 με αργή ανάδευση προς αποφυγή αφρισμού λόγω της παραγωγής διοξειδίου του άνθρακα (CO_2). Το δείγμα τότε αφέθηκε σε ηρεμία με σκοπό το διαχωρισμό των δύο φάσεων. Μετά το διαχωρισμό, απομονώθηκε η ανώτερη φάση και οδηγήθηκε για φυγοκέντρηση με σκοπό την ολοκληρωτική απομάκρυνση του ιζήματος. Στο υπερκείμενο υγρό έγινε αραιώση 1:4 με απιονισμένο νερό και το δείγμα οδηγήθηκε για μέτρηση ολικών αναγωγικών σακχάρων (μέθοδος DNS) και γλυκόζης (μέθοδος GOD-PAP). Έτσι, η μέτρηση γλυκόζης έδωσε πληροφορίες για το ποσοστό κυτταρίνης, ενώ η μέτρηση αναγωγικών σακχάρων δίνει πληροφορίες για το ποσοστό ημικυτταρίνης.

4.2.2 Μέτρηση ολικών αναγωγικών σακχάρων με τη μέθοδο DNS

Η μέθοδος του 3,5-δινιτροσαλικυλικού οξέος (Miller 1959) χρησιμοποιήθηκε για τη μέτρηση της συγκέντρωσης των ολικών αναγωγικών σακχάρων. Το 3,5-δινιτροσαλικυλικό οξύ είναι μια αρωματική ουσία η οποία αντιδρά με τα αναγωγικά σάκχαρα με αποτέλεσμα το σχηματισμό 3-αμινο-5νιτροσαλικυλικού οξέος που απορροφά έντονα στα 540 nm. Για αυτό το λόγο χρησιμοποιείται για τον ποσοτικό προσδιορισμό αναγωγικών σακχάρων, με βάση μια καμπύλη αναφοράς που κατασκευάζεται από διαλύματα αναγωγικών σακχάρων γνωστής συγκέντρωσης.

Για την Παρασκευή του DNS παρασκευάστηκε διάλυμα NaOH 8% w/v με διάλυση 16 g καθαρού στερεού NaOH σε 200 mL απιονισμένου νερού. Το διάλυμα αυτό αναμείχθηκε με 500 mL απιονισμένου νερού και 10 g στερεού DNS μέχρι πλήρους διάλυσης των στερεών. Στη συνέχεια, προστέθηκαν αργά 402.7 g τρυγικού νατρίου-καλίου-potassium sodium tartrate (Rochelle Salts) υπό ανάδευση και ήπια θέρμανση. Μετά την πλήρη διάλυση των στερεών προστέθηκε απιονισμένο νερό μέχρι τελικού όγκου 1000 mL και το διάλυμα αποθηκεύτηκε σε σκουρόχρωμο δοχείο μακριά από το φως.

Για τον προσδιορισμό των αναγωγικών σακχάρων στα δείγματα σύμφωνα με το πρωτόκολλο προστέθηκαν 250 μ L διαλύματος DNS σε 250 μ L δείγματος και το συνολικό διάλυμα αφέθηκε για βρασμό για 5 min. Έπειτα, προστέθηκαν 2 mL απιονισμένου νερού και το δείγμα οδηγήθηκε στο φωτόμετρο για μέτρηση στα 540 nm. Για κάθε δείγμα πραγματοποιήθηκαν δύο μετρήσεις ενώ τα ολικά αναγωγικά

σάκχαρα (TRS, Total Reducing Sugar) μετρήθηκαν με χρήση καμπύλη αναφοράς σε ισοδύναμα γλυκόζης. Ακόμα, σε κάθε δείγμα πραγματοποιήθηκαν οι κατάλληλες αραιώσεις προκειμένου οι μετρήσεις μας να βρίσκονται εντός του εύρους γραμμικότητας της ευθείας.

4.2.3 Μέτρηση Γλυκόζης

Οι μετρήσεις συγκέντρωσης γλυκόζης πραγματοποιήθηκαν με το εμπορικό σκεύασμα GOD/PAP (glucose oxidase/ peroxidase assay). Ο προσδιορισμός βασίζεται στη μετατροπή της γλυκόζης σε ένα προϊόν ερυθρού χρώματος το οποίο είναι αποτέλεσμα της διαδοχικής δράσης των ενζύμων οξειδάση και υπεροξειδάση της γλυκόζης και εμφανίζει μέγιστη απορρόφηση στα 510 nm. Πιο αναλυτικά, η παρουσία του ενζύμου οξειδάση της γλυκόζης (GOD) παράγει H_2O_2 λόγω της οξείδωσης της γλυκόζης. Η αντίδραση του H_2O_2 με φαινολικό παράγωγο και 4-αμινοφαιναζόνη καταλύεται από το ένζυμο υπεροξειδάση (POD) και παράγει έγχρωμο προϊόν ερυθρού χρώματος. Η αύξηση της απορρόφησης στα 510 nm είναι ανάλογη της συγκέντρωσης της γλυκόζης στο δείγμα.

Σύμφωνα με το πρωτόκολλο, για τη μέτρηση της γλυκόζης στα δείγματα προστίθενται στις υποδοχές (wells) της πλακέτας ELISA Microplate, 240 μ L του σκευάσματος GOD/PAP και 10 μ L του δείγματος προς μέτρηση και το διάλυμα οδηγείται στο θάλαμο του φωτόμετρου Microplate reader για 15 min σε θερμοκρασία 37 °C. Η απορρόφηση μετρήθηκε στα 510 nm στην επίτευξη ισορροπίας της αντίδρασης (endpoint). Η γλυκόζη μετρήθηκε με χρήση καμπύλης αναφοράς που κατασκευάστηκε από διαλύματα γνωστής συγκέντρωσης γλυκόζης και για κάθε δείγμα έγιναν οι κατάλληλες αραιώσεις προκειμένου η μέτρηση να βρίσκεται στην περιοχή γραμμικότητας της ευθείας. Ακόμα, για κάθε δείγμα πραγματοποιήθηκαν δύο μετρήσεις.

4.2.4 Υπολογισμός της συγκέντρωσης πρωτεϊνών με τη μέθοδο Bradford

Η μέθοδος Bradford (Bradford 1976) χρησιμοποιήθηκε για τη μέτρηση του ενζύμου της ξυλανάσης μέσω του προσδιορισμού της συγκέντρωσης των πρωτεϊνών. Είναι μια φωτομετρική μέθοδος που βασίζεται στην αλλαγή χρώματος της βαφής Coomassie Brilliant Blue G-250 κατά την πρόσδεσή της στις πρωτεΐνες. Η βαφή είναι καφέ στην ελεύθερη μορφή της όμως μετατρέπεται σε σκούρο μπλε κατά την πρόσδεσή της στις πρωτεΐνες. Η μέθοδος μπορεί να χρησιμοποιηθεί ποιοτικά για την ανίχνευση πρωτεϊνών σε ένα διάλυμα ενώ μπορεί να χρησιμοποιηθεί και

Πειραματικό Μέρος

ποσοτικά για τον ακριβή προσδιορισμό της συγκέντρωσης πρωτεϊνών με χρήση καμπύλης αναφοράς.

Στο πείραμά μας χρησιμοποιήθηκαν αραιώσεις 1:100, 1:50, 1:20 του ενζύμου που παράχθηκε, ενώ για τη μέτρηση προστέθηκαν 25 μL από κάθε δείγμα σε 1,250 mL διαλύματος Bradford. Ακολούθησε έντονη ανάδευση και φωτομέτρηση στα 595 nm.

4.2.5 Υδρόλυση στελεχών αραβοσίτου

4.2.5.1 Σκοπός

Σκοπός της διαδικασίας ενζυμικής υδρόλυσης είναι η διάσπαση της αλυσίδας της κυτταρίνης σε πρώτο βαθμό και της ημικυτταρίνης δευτερευόντως με αποτέλεσμα την παραγωγή των μονομερών τους. Το εμπορικό σκεύασμα που χρησιμοποιήθηκε περιέχει κυτταρινάσες που διασπούν την αλυσίδα της κυτταρίνης και ημικυτταρινάσες που διασπούν την αλυσίδα της ημικυτταρίνης στα μονομερή τους με σκοπό αυτά να χρησιμοποιηθούν για τη ζύμωση από τους ζυμωτικούς μικροοργανισμούς. Στην παρούσα εργασία για την παραγωγή της αιθανόλης χρησιμοποιήθηκε ο μικροοργανισμός *S. cerevisiae* ο οποίος μπορεί να ζυμώσει μόνο εξόζες και όχι πεντόζες με αποτέλεσμα να δοθεί έμφαση στην παραγωγή της γλυκόζης έναντι των λοιπών μονομερών.

Η υδρόλυση μελετήθηκε αφ' ενός ως προς τη συγκέντρωση στερεών (ποσοστό βιομάζας στο μίγμα της αντίδρασης), αφ' ετέρου ως προς τη συγκέντρωση ενζύμου (enzyme loading) και στην επίδραση που είχαν αυτοί οι δύο παράγοντες στην παραγωγή σακχάρων. Ακόμα, πραγματοποιήθηκαν πειράματα διαλείποντος έργου και ημιδιαλείποντος έργου με σκοπό να ελεγχθεί η επιρροή της τροφοδοσίας του προκατεργασμένου υλικού κατά τη διάρκεια του σταδίου προϋδρόλυσης και κατ' επέκταση στην παραγωγή της αιθανόλης. Έπειτα, διεξήχθησαν συμπεράσματα σχετικά με την ιδανική συγκέντρωση στερεών για την επιθυμητή παραγωγή αιθανόλης στη ζύμωση.

4.2.5.2 Υδρόλυση σε διαφορετικές συγκεντρώσεις στερεών

Πραγματοποιήθηκαν πειραματικές δοκιμές για να μελετηθεί η παραγωγή σακχάρων σε διαφορετικές συγκεντρώσεις στερεών από το δείγμα αραβοσίτου. Η υδρόλυση πραγματοποιήθηκε σε συγκέντρωση ενζύμου 9 mg πρωτεϊνών/g ξηρής βιομάζας και σε βέλτιστο pH για τη λειτουργία του ενζυμικού σκευάσματος ίσο με 5. Για να επιτευχθεί αυτή η τιμή pH η υδρόλυση πραγματοποιήθηκε σε ρυθμιστικό διάλυμα

κιτρικών-φωσφορικών που παρασκευάστηκε στο εργαστήριο. Η σειρά πειραμάτων ήταν μικρής κλίμακας και πραγματοποιήθηκε σε κωνικές φιάλες Erlenmeyer όγκου 50 mL, στις οποίες τοποθετήθηκαν τα στερεά και κατάλληλη ποσότητα ενζύμου και ρυθμιστικού διαλύματος για να επιτευχθεί η επιθυμητή συγκέντρωση. Στον παρακάτω πίνακα συνοψίζονται οι ποσότητες στερεών, ενζύμου και ρυθμιστικού διαλύματος που χρησιμοποιήθηκαν για κάθε δείγμα.

Πίνακας 4.2: Ποσότητες βιομάζας, ενζύμου και ρυθμιστικού διαλύματος για τη σειρά πειραμάτων συγκέντρωσης βιομάζας (solids loading)

Συγκέντρωση Βιομάζας	Ποσότητα Βιομάζας (g)	Ποσότητα buffer (mL)
8%	0,4	4,6
10%	0,5	4,5
12%	0,6	4,4
14%	0,7	4,3
16%	0,8	4,2

Στον παρακάτω πίνακα, η ποσότητα του ενζύμου που περιγράφεται για κάθε συγκέντρωση έχει διαλυθεί στα mL του ρυθμιστικού διαλύματος και όλο το διάλυμα προστέθηκε στην ξηρή βιομάζα στη φιάλη. Ακόμα, λόγω του κινδύνου μόλυνσης των δειγμάτων μας από μικροοργανισμούς οι οποίοι πιθανώς να καταναλώνουν τη γλυκόζη με αποτέλεσμα την αλλοίωση των αποτελεσμάτων, κατά την παρασκευή του ρυθμιστικού διαλύματος προστέθηκε αζίδιο του νατρίου (sodium azide) σε συγκέντρωση 0,01% w/v. Η παραπάνω ουσία είναι τοξική για τους μικροοργανισμούς και η χρήση της είναι απαραίτητη για την αποτροπή ανάπτυξής τους σε περίπτωση μόλυνσης. Ωστόσο, η χρήση της περιορίστηκε μόνο σε πειράματα μελέτης παραγωγής γλυκόζης και όχι σε πειράματα ζύμωσης, αφού στα τελευταία θα υπήρχε θανάτωση του μικροοργανισμού *S. cerevisiae* που πραγματοποιεί τη ζύμωση.

Η ενζυμική υδρόλυση πραγματοποιήθηκε για 72 h ενώ, οι σε συνθήκες θερμοκρασίας 50 °C και ανάδευσης 180 rpm. Κατά τη διεξαγωγή των πειραμάτων πραγματοποιήθηκε λήψη δείγματος στις εξής ώρες: 2, 4, 6, 8, 12, 24, 48 και 72. Λόγω της ύπαρξης και στερεής και υγρής φάσης στο δείγμα ήταν απαραίτητη η φυγοκέντριση των δειγμάτων για το διαχωρισμό των στερεών από το υπερκείμενο υγρό όπου βρίσκονταν τα διαλυτά σάκχαρα. Έπειτα, έγινε απομόνωση του υπερκείμενου υγρού και κατάλληλη αραιώσή του προκειμένου η μέτρηση των σακχάρων να βρίσκεται στην περιοχή γραμμικότητας της καμπύλης αναφοράς. Οι μετρήσεις σε κάθε δείγμα πραγματοποιήθηκαν εις διπλούν.

4.2.5.3 Υδρόλυση σε διαφορετικές συγκεντρώσεις ενζύμου

Η υδρόλυση της βιομάζας σε διαφορετικές συγκεντρώσεις ενζύμου πραγματοποιήθηκε σε ίδιες συνθήκες θερμοκρασίας, pH και ανάδευσης και σε συγκέντρωση στερεών ίση με 10%. Η αντίδραση έλαβε χώρα σε κωνικές φιάλες των 50 mL, όπου προστέθηκαν 0,5g βιομάζας σε 4,5 mL ρυθμιστικού διαλύματος (στο οποίο έχει διαλυθεί το ενζυμικό παρασκεύασμα).

4.2.5.4 Υδρόλυση βιομάζας με επεξεργασία με ξυλανάση

Η επεξεργασία με ξυλανάση περιλάμβανε αντίδραση της βιομάζας του αραβόσιτου με το ένζυμο της ξυλανάσης που παρήχθη από την ετερόλογη έκφραση σε *Pichia pastoris* του γονιδίου *xyn11a* του μικροοργανισμού *Fusarium oxysporum*.

Η αντίδραση πραγματοποιήθηκε σε κωνικές φιάλες των 100 mL και σε περιβάλλον pH=5, θερμοκρασίας 50 °C και ανάδευσης 180 rpm. Συνολικά, χρησιμοποιήθηκαν τρεις κωνικές φιάλες καθεμία από τις οποίες περιείχε 0,5 g βιομάζας, 10 mL ρυθμιστικού διαλύματος κιτρικών-φωσφορικών και 2 mL ακατέργαστου ενζύμου. Οι φιάλες αφέθηκαν για χρόνο 24 h για να πραγματοποιηθεί η αντίδραση. Στη συνέχεια, πραγματοποιήθηκε διήθηση υπό κενό του υλικού μέσα στις φιάλες και απομόνωση του υγρού από το στερεό. Το υγρό αποθηκεύτηκε στην κατάψυξη και κομμάτι του στερεού οδηγήθηκε για ξήρανση σε φούρνο στους 120 °C για τρεις μέρες. Το υπόλοιπο στερεό αποθηκεύτηκε στην κατάψυξη. Από την απώλεια του υγρού μετά την ξήρανση, υπολογίστηκε η μάζα κατεψυγμένου στερεού που απαιτείται για την επίτευξη συγκεντρώσεων στερεών 10% w/w και 16% w/w, με σκοπό την περαιτέρω υδρόλυση της βιομάζας για παραγωγή γλυκόζης.

Έτσι, ακολούθησε διαδικασία υδρόλυσης του κατεψυγμένου υλικού στις παραπάνω συγκεντρώσεις στερεών με τρόπο παρόμοιο με την υδρόλυση για διαφορετικές συγκεντρώσεις στερεών.

4.2.6 Ζύμωση στελεχών αραβοσίτου

4.2.6.1 Σκοπός

Ο σκοπός αυτής της σειράς πειραμάτων είναι η παραγωγή αιθανόλης με χρήση του μικροοργανισμού *S. cerevisiae*, με πηγή άνθρακα τα σάκχαρα που προέκυψαν από τη μέθοδο της ενζυμικής υδρόλυσης. Είναι επιθυμητή, όσο το δυνατόν μεγαλύτερη

συγκέντρωση αιθανόλης στο τελικό μείγμα, καθώς η επίτευξη υψηλής απόδοσης μειώνει το κόστος του διαχωρισμού και συμβάλλει στη μείωση του κόστους της συνολικής διεργασίας.

Η ζύμωση των στελεχών του αραβοσίτου πραγματοποιήθηκε μελετήθηκε σε τρία στάδια. Αρχικά, πραγματοποιήθηκε ζύμωση σε σύστημα διαλείποντος έργου, στο οποίο η ζύμωση πραγματοποιήθηκε στη συνολική μάζα του αραβοσίτου έπειτα από ένα στάδιο προϋδρόλυσης. Στο δεύτερο στάδιο η ζύμωση πραγματοποιήθηκε σε σύστημα ημιδιαλείποντος έργου, όπου η ποσότητα βιομάζας αυξανόταν σταδιακά κατά το στάδιο της προϋδρόλυσης. Στο τρίτο στάδιο η ζύμωση πραγματοποιήθηκε σε συγκεκριμένη συγκέντρωση στερεών βιομάζας, η οποία είχε υποστεί επεξεργασία με την παραχθείσα ξυλανάση.

4.2.6.2 Ζύμωση σε σύστημα διαλείποντος έργου

Τα αρχικά πειράματα ζύμωσης πραγματοποιήθηκαν σε συγκεντρώσεις στερεών 10%, 12%, 14%, 16%, 18%, 20% για τη μελέτη παραγωγής της αιθανόλης και την κατανόηση της συμπεριφοράς του υλικού με σκοπό την εύρεση της βέλτιστης συγκέντρωσης για μεταφορά σε μεγαλύτερη κλίμακα.

Η ζύμωση πραγματοποιήθηκε σε κωνικές φιάλες των 100 mL και ακολούθησε ένα στάδιο προϋδρόλυσης που διήρκησε 12 h. Κατά το στάδιο της προϋδρόλυσης εισήχθη η κατάλληλη ποσότητα στερεού, ενζύμου και ρυθμιστικού διαλύματος με βάση τα δεδομένα που προέκυψαν από τα πειράματα υδρόλυσης της βιομάζας και τα δείγματα οδηγήθηκαν στους επωαστήρες σε θερμοκρασία 50 °C και ανάδευση 180 rpm για να πραγματοποιηθεί η υδρόλυση. Στο τέλος των 12 h έγινε παραλαβή δείγματος 200 mL για τη μέτρηση σακχάρων.

Με την πάροδο των 12 h πραγματοποιήθηκε εισαγωγή του στελέχους EthanolRed® (Lesaffre, France), ενός μικροοργανισμού κατάλληλα επεξεργασμένου για υψηλή αντοχή σε μεγάλες συγκεντρώσεις αιθανόλης, σε συγκέντρωση 20 mg/g ξηρής βιομάζας (Dry Matter). Η ζύγιση πραγματοποιήθηκε σε αναλυτικό ζυγό υψηλής ακρίβειας και η προσθήκη του στον όγκο της αντίδρασης έγινε με τέτοιο τρόπο ώστε να αποφευχθεί η προσκόλληση του μικροοργανισμού στα τοιχώματα της φιάλης και να επιτευχθεί η ομοιόμορφη κατανομή του στον όγκο της αντίδρασης. Η ζύμωση πραγματοποιήθηκε σε θερμοκρασία 35 °C ώστε να έχουμε βέλτιστη δράση του ζυμομύκητα, ανάδευση 80 rpm και pH=5 λόγω της χρήσης του ρυθμιστικού διαλύματος κιτρικών φωσφορικών. Ακόμα, επειδή η ζύμωση αποτελεί αναερόβια διεργασία αλλά είναι απαραίτητη η απομάκρυνση του παραγόμενου διοξειδίου του άνθρακα, οι φιάλες πωματίστηκαν με πώματα που είχαν οπή καλυμμένη με βαμβάκι. Η χρήση του βαμβακιού εξυπηρετεί την αποφυγή μόλυνσης της ζύμωσης από μικροοργανισμούς.

Πειραματικό Μέρος

Η δειγματοληψία πραγματοποιήθηκε σε χρονικές στιγμές 8, 12, 24, 48, 72, 96, 120 h για τις συγκεντρώσεις στερεών 10%-14% και στις 24 h για τις συγκεντρώσεις στερεών 16%-20%, στις οποίες συλλέχθηκε δείγμα 1 mL το οποίο οδηγήθηκε σε σύστημα υγρής χρωματογραφίας υψηλής απόδοσης για μέτρηση αιθανόλης, έπειτα από φυγοκέντρηση, απομάκρυνση του υπερκείμενου υγρού και φιλτράρισμα με φίλτρα Whatman 0,45μm (Whatman, Ηνωμένο Βασίλειο). Τέλος, η λήψη του δείγματος έγινε προσεκτικά ώστε το δείγμα να είναι όσο το δυνατόν πιο αντιπροσωπευτικό.

4.2.6.3 Ζύμωση σε σύστημα ημιδιαλείποντος έργου

Η ζύμωση σε αυτό το σύστημα πραγματοποιήθηκε με τον ίδιο τρόπο όπως και στο σύστημα διαλείποντος έργου με τη διαφορά, ότι στην προϋδρόλυση άλλαξε η τροφοδοσία της βιομάζας. Στο σύστημα ημιδιαλείποντος έργου αντί να προστεθεί εξ' ολοκλήρου η ποσότητα της βιομάζας από την αρχή της προϋδρόλυσης, έγινε σταδιακή αύξηση της συγκέντρωσης στερεών. Συγκεκριμένα, η προϋδρόλυση πραγματοποιήθηκε σε κωνικές φιάλες των 100 mL σε τελικό όγκο αντίδρασης 10 mL. Το πείραμα περιείχε τρεις σειρές δειγμάτων (Α, Β, Γ) οι οποίες αντιστοιχούν σε διαφορετικές τελικές συγκεντρώσεις στερεών: Α(16% w/w), Β(18% w/w), Γ(20% w/w) και κάθε σειρά δειγμάτων αποτελούνταν από δύο δείγματα α και β. Η προσθήκη των στερεών έγινε με τέτοιο τρόπο ώστε οι συγκεντρώσεις να είναι αυτές που απεικονίζονται στον πίνακα παρακάτω:

Πίνακας 4.3: Συγκεντρώσεις στερεών για διάφορες χρονικές στιγμές της προϋδρόλυσης

Δείγμα	Συγκεντρώσεις στερεών			
	0h	2h	4h	6h
Αα	8%	14%	16%	-
Αβ	10%	12%	16%	-
Βα	8%	12%	16%	18%
Ββ	8%	12%	16%	18%
Γα	8%	14%	18%	20%
Γβ	8%	14%	18%	20%

Όπως φαίνεται και από τον πίνακα, η τελική προσθήκη του υλικού έγινε στις 6 h. Το δείγμα τότε αφέθηκε να υδρολυθεί μέχρι τις 12 h οπότε και προστέθηκε η ζύμη για την εκκίνηση της υδρόλυσης. Η ζύμωση και η δειγματοληψία κατά τη διαδικασία τη ζύμωση πραγματοποιήθηκαν όπως και στο σύστημα διαλείποντος έργου.

4.2.7 Προσδιορισμός αιθανόλης με υγρή χρωματογραφία – HPLC

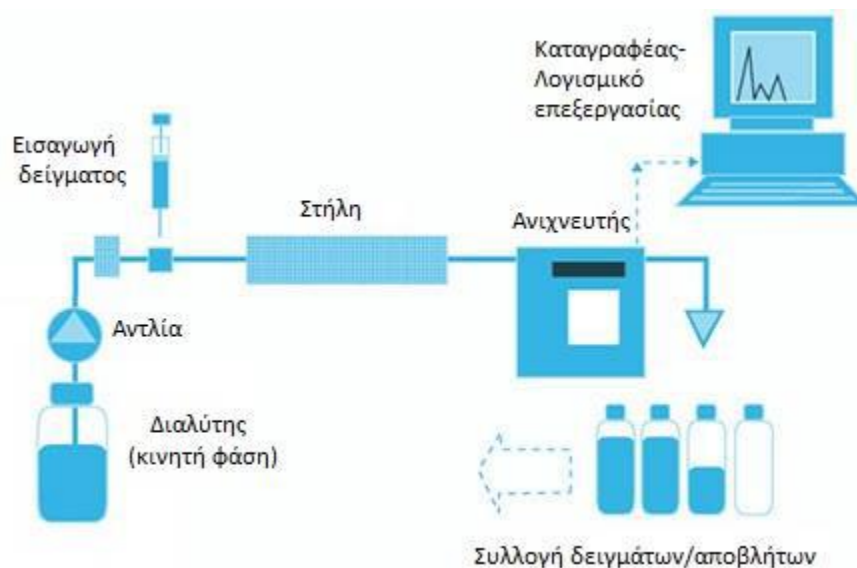
4.2.7.1 Σκοπός

Σκοπός της χρήσης της μεθόδου υγρής χρωματογραφίας υψηλής απόδοσης είναι ο ποσοτικός προσδιορισμός της αιθανόλης στο προϊόν μείγμα της ζύμωσης.

4.2.7.2 Διαδικασία και συνθήκες

Η βασική αρχή όλων των χρωματογραφικών διαχωρισμών περιλαμβάνει τη διέλευση του δείγματος που βρίσκεται στην κινητή φάση (στο διαλύτη έκλυσης) μέσα από μια στατική φάση (στήλη). Στην υγρή χρωματογραφία υψηλής απόδοσης ο διαχωρισμός των συστατικών της κινητής φάσης επιτυγχάνεται με την κατακράτηση των συστατικών της κινητής φάσης σε διαφορετικούς χρόνους και εξαρτάται από τις αλληλεπιδράσεις μεταξύ δείγματος, σταθερής φάσης και διαλύτη έκλυσης. Η επιλογή της κατάλληλης κινητής φάσης γίνεται με βάση τη δύναμη (solvent strength) και την εκλεκτικότητα (selectivity) του διαλύτη. Όταν η κινητή φάση έχει σταθερή σύσταση η έκλυση είναι ισοκρατική, ενώ όταν μεταβάλλεται βαθμιαία η έκλυση είναι βαθμιδωτή.

Η διάταξη μιας συσκευής υγρής χρωματογραφίας αποτελείται από το σύστημα παροχής υγρής φάσης, το σύστημα εισαγωγής δείγματος, τη στήλη, τον ανιχνευτή και τον καταγραφέα. Η διάταξη της συσκευής υγρής χρωματογραφίας που χρησιμοποιήθηκε σε αυτή την εργασία αποτελείται από σύστημα παροχής διαλύτη (Shimadzu LC-20AD), σε συνδυασμό με ανιχνευτή δείκτη διάθλασης (Shimadzu RID 10A), αυτόματο δειγματολήπτη (Shimadzu SIL-20A) και σύστημα εισαγωγής δεδομένων στον υπολογιστή (LCsolution έκδοση 1.24 SP1, Shimadzu).



Σχήμα 4.1: Σχηματική απεικόνιση της οργάνολογίας συστήματος υγρής χρωματογραφίας υψηλής απόδοσης όπου φαίνονται τα βασικότερα συστατικά στοιχεία

Η στήλη που χρησιμοποιήθηκε για την ανάλυση των δειγμάτων είναι η AminexHPX-87H (Bio-Rad, 300x7.8mm, μέγεθος σωματιδίων 9 μm) ενώ πριν την αναλυτική στήλη παρεμβαλλόταν μικρή προστατευτική στήλη (προ-στήλη) για την αύξηση του χρόνου ζωής της. Η κινητή φάση ήταν αραιό διάλυμα θειικού οξέος συγκέντρωσης 5 mM σε νερό υψηλής καθαρότητας (Millipore) το οποίο παρασκευάστηκε από τη διάλυση πυκνού θειικού οξέος στον όγκο του νερού. Ο λόγος χρήσης του νερού υψηλής καθαρότητας ήταν για την αποφυγή βλάβης στο σύστημα της χρωματογραφίας και για αυτό το λόγο ήταν απαραίτητο το φιλτράρισμα όλων των δειγμάτων μέσα από φίλτρα 0,45 μm (Whatman, Ηνωμένο Βασίλειο). Το διάλυμα θειικού οξέος απαερώθηκε σε συσκευή υπερήχων για 30 min προς αποφυγή αποκλίσεων στις μετρήσεις και με σκοπό τη σωστή λειτουργία του ανιχνευτή. Η ταχύτητα της κινητής φάσης ήταν σταθερή και ίση με 0,6 mL/min και η στήλη λειτούργησε σε θερμοκρασία 40 °C μέσω θαλάμου θέρμανσης στήλης (Merck Millipore, Darmstadt, Γερμανία). Η απομόνωση της αιθανόλης παρατηρείται περίπου στο 19^ο λεπτό ανάλυσης οπότε ο χρόνος ανάλυσης για κάθε δείγμα τέθηκε στα 30 min. Ο όγκος δειγματοληψίας ήταν ίσος με 50 μL και για αυτό το λόγο χρησιμοποιήθηκαν 500 μL από κάθε δείγμα ενώ χρησιμοποιήθηκαν επίσης δείγματα για βαθμονόμηση και δημιουργία καμπυλών αναφοράς.

4.2.8 Παραγωγή ξυλανάσης της οικογένειας GH-11 του μικροοργανισμού *Fusarium oxysporum* (FoXyn)

4.2.8.1 Σκοπός

Σκοπός της μεθόδου είναι η παραγωγή του ενζύμου που εκφράζεται από το γονίδιο *xyh11a* του μικροοργανισμού *F. oxysporum*. Το παραπάνω ένζυμο εμφανίζει ξυλανολυτική δράση και η παραγωγή του έγινε με ετερόλογη έκφραση του γονιδίου σε κύτταρα *P. pastoris*.

4.2.8.2 Παραγωγή και απομόνωση ανασυνδυασμένων πρωτεϊνών από μετασχηματισμένα κύτταρα *P. Pastoris*

Η παραγωγή των ανασυνδυασμένων πρωτεϊνών επάγεται κατά την προσθήκη μεθανόλης στην καλλιέργεια. Η μεθανόλη ενεργοποιεί τον υποκινητή της αλκοολικής οξειδάσης (AOX1) και οι ανασυνδυασμένες πρωτεΐνες οδηγούνται με τη βοήθεια του πεπτιδικού οδηγού (α -factor από τη ζύμη *S. cerevisiae*) προς έκκριση στο υπερκείμενο υγρό των κυττάρων, γεγονός που καθιστά εύκολη τη συλλογή και απομόνωσή τους.

4.2.8.2.i Προκαλλιέργειες κυττάρων *P. pastoris*

Πραγματοποιήθηκε εισαγωγή τρυβλίων με στερεό θρεπτικό υλικό YPDεμβολιασμένων με το μετασχηματισμένο στέλεχος X33 της ζύμης *P. Pastoris* σε επωαστήρα στους 30 °C για 24 h.

Μετά το πέρας των 24 h, οι αποικίες που σχηματίστηκαν στα τρυβλία χρησιμοποιήθηκαν για εμβολιασμό 300 mL θρεπτικού υλικού BMGY ισόποσα χωρισμένου σε 2 γυάλινες κωνικές φιάλες των 250 mL. Οι κωνικές φιάλες αφέθηκαν για επώαση για 16-20 h στους 30 °C σε επωαστήρα ZHWY-211C (Zhicheng, Κίνα). Ακολούθησε, φωτομέτρηση της προκαλλιέργειας σε φωτόμετρο UV-Vis για τον προσδιορισμό της οπτικής πυκνότητας. Από κάθε κωνική φιάλη έγινε λήψη 100 μ L και πραγματοποιήθηκε αραιώση 1:20 σε κάθε δείγμα με την προσθήκη 900 μ L απιονισμένου νερού. Τα αποτελέσματα της φωτομέτρησης για κάθε δείγμα καθώς και οι όγκοι που πρέπει να ληφθούν από κάθε κωνική φιάλη ώστε να έχουμε $O.D_{600nm}=1$ στις κύριες καλλιέργειες φαίνονται στο παρακάτω πίνακα.

Πίνακας 4.4: Οπτική πυκνότητα και απαιτούμενοι όγκοι για επίτευξη $O.D_{600nm}=1$ στις κύριες καλλιέργειες

Φιάλη	Απορρόφηση (ABS)	$O.D_{600nm}$	V (mL)
1	0,681	13,6	18,4
2	0,785	15,7	16,0

4.2.8.2.ii Κύριες καλλιέργειες κυττάρων *P. pastoris*

Ακολουθεί φυγοκέντρηση του υγρού που απομονώθηκε από κάθε καλλιέργεια σε φυγόκεντρο Beckman Coulter (Η.Π.Α), συλλογή των κυττάρων και επαναιώρησή τους σε 1 L θρεπτικού υλικού BMMY χωρισμένου σε 4 γυάλινες κωνικές φιάλες του 1 L.

Τα κύτταρα της ζύμης παρέμειναν για επώαση σε ανάδευση 200 rpm στους 30°C για χρονικό διάστημα 5 ημερών με καθημερινή προσθήκη μεθανόλης 5% v/v. Οι απαιτούμενες συνθήκες καλού αερισμού για την ανάπτυξη των κυττάρων του μικροοργανισμού επιτεύχθηκαν με χρήση κωνικών φιαλών μεγάλης χωρητικότητας πωματισμένων με βαμβάκι. Για τη συλλογή των πρωτεϊνών που παρήχθησαν πραγματοποιήθηκε στη συνέχεια φυγοκέντρηση, διήθηση, συμπύκνωση και εξισορρόπηση του υπερκείμενου υγρού της καλλιέργειας.

4.2.8.2.iii Διήθηση και συμπύκνωση του υπερκείμενου υγρού της καλλιέργειας

Τα βήματα της διήθησης, της συμπύκνωσης και της εξισορρόπησης πραγματοποιήθηκαν στο υπερκείμενο υγρό που απομονώθηκε μετά τη φυγοκέντρηση σε 5000 rpm σε φυγόκεντρο Beckman Coulter (Η.Π.Α).

Η διήθηση πραγματοποιήθηκε υπό κενό με χρήση διηθητικού χαρτιού Whatman (Μ. Βρετανία) και φίλτρων διαμέτρου 0,8 και 0,2 μm προς απομάκρυνση τυχόν κυτταρικών θραυσμάτων.

Ακολούθως, πραγματοποιήθηκε συμπύκνωση του διαλύματος πρωτεϊνών με χρήση της συσκευής υπερδιήθησης Stirred Cell Model 8400 και μεμβρανών PM-10 (Amicon, Millipore, Η.Π.Α). κατά τη διάρκεια της συμπύκνωσης, μόρια μεγαλύτερα από τη διάμετρο των πόρων της μεμβράνης συγκρατούνται, ενώ μικρότερα μόρια διαφεύγουν μαζί με το διάλυμα. Στο εσωτερικό της συσκευής παρέμεινε τελικά το συμπυκνωμένο διάλυμα των πρωτεϊνών μοριακού βάρους πάνω από 10 kDa, όγκου περίπου 14 mL, το οποίο ισομοιράστηκε σε φιαλίδια Eppendorftων 2 mL προς αποθήκευση υπό κατάψυξη σε ακατέργαστη μορφή.

4.2.8.3 Μέτρηση ενεργότητας ξυλανάσης

Για τη μέτρηση ενεργότητας πραγματοποιήθηκαν αντιδράσεις του ενζύμου σε ακατέργαστη μορφή με το στέλεχος αραβοσίτου. Οι αντιδράσεις ήταν μικρής κλίμακας και πραγματοποιήθηκαν σε φιαλίδια Eppendorf όγκου 2 mL σε συνθήκες θερμοκρασίας 50 °C και ανάδευσης 750 rpm σε Thermomixer (Eppendorf, Γερμανία) για 10 min. Σε κάθε φιαλίδιο Eppendorf εισήχθη 0,5% w/v υπόστρωμα ξυλάνης (στέλεχος αραβοσίτου), 450 μL ΡΔ citrate phosphate Η 5.0 και 50 μL ακατέργαστου ενζύμου κατάλληλης αραιώσης κάθε φορά. Μετά το πέρας της αντίδρασης, ακολούθησε μέτρηση ολικών αναγωγικών σακχάρων για τον υπολογισμό της ενεργότητας της ξυλανάσης. Η ενεργότητα της ξυλανάσης μετράται σε U (Units). Ως Unit ορίζεται η ποσότητα του ενζύμου που απαιτείται για την παραγωγή 1 μmol ξυλόζης σε 1 min αντίδρασης σε θερμοκρασία 50 °C και ανάδευση 180 rpm.

4.2.9 Παραγωγή και ταυτοποίηση ολιγοσακχαριτών με χρήση της ξυλανάσης *FoXyn*

4.2.9.1 Σκοπός

Σκοπός της μεθόδου είναι η παραγωγή και η ταυτοποίηση των ολιγοσακχαριτών που παράγονται από τη δράση του ενζύμου της ξυλανάσης *FoXyn* στο στέλεχος του αραβοσίτου.

4.2.9.2 Παραγωγή ολιγοσακχαριστών

Η παραγωγή των ολιγοσακχαριτών πραγματοποιήθηκε σε κωνικές φιάλες Erlenmeyer των 100 mL όπου έλαβε χώρα η αντίδραση της ξυλανάσης με τη βιομάζα.

Συγκεκριμένα χρησιμοποιήθηκαν τρεις κωνικές φιάλες σε καθεμία από τις οποίες έγινε εισαγωγή 0,5 g ξηρής βιομάζας, 10 mL ΡΔ citrate phosphate pH 5.0 και 2 mL του ακατέργαστου ενζύμου της ξυλανάσης. Οι κωνικές φιάλες τοποθετήθηκαν σε επωαστήρα σε συνθήκες θερμοκρασίας 50 °C και ανάδευσης 180 rpm, προκειμένου να εξασφαλιστεί η ομοιόμορφη κατανομή του ενζύμου σε όλο το υλικό, για χρονική διάρκεια 24 h.

Μετά το πέρας της αντίδρασης, έγινε συλλογή του μείγματος από τις τρεις κωνικές φιάλες, και οδηγήθηκε σε συσκευή διήθησης υπό κενό όπου πραγματοποιήθηκε ο διαχωρισμός του στερεού κλάσματος και της υγρής φάσης. Μετά την απομόνωση,

έγινε πλύση του στερεού κλάσματος με απιονισμένο νερό και αποθήκευση υπό κατάψυξη με σκοπό να χρησιμοποιηθεί αργότερα για ζύμωση. Το υπερκείμενο υγρό της αντίδρασης, αφότου απομονώθηκε με τη διήθηση, αποθηκεύτηκε υπό κατάψυξη για προσδιορισμό των ολιγοσακχαριτών.

4.2.9.3 Προσδιορισμός ολιγοσακχαριτών

Ο προσδιορισμός των ολιγοσακχαριτών που παράγονται κατά την αντίδραση της ξυλανάσης με το στέλεχος αραβοσίτου πραγματοποιήθηκε με χρήση της μεθόδου χρωματογραφίας εναλλαγής ιόντων (HPLC).

Χρωματογραφία εναλλαγής ανιόντων υψηλής απόδοσης (HPLC)

Η χρωματογραφία εναλλαγής ανιόντων δε χρησιμοποιείται συχνά για την ανάλυση ουδέτερων υδρογονανθράκων. Ωστόσο, πολλοί υδρογονάνθρακες είναι ασθενή οξέα με τιμές pK_a μεταξύ 12 και 14 με αποτέλεσμα σε μεγάλες τιμές pH οι υδροξυλομάδες τους να μετατρέπονται μερικώς ή εξ' ολοκλήρου σε οξυανιόντα, επιτρέποντας έτσι την απομόνωση των συστατικών αυτών ως ανιόντων σε χρωματογραφία εναλλαγής ανιόντων. Οι παράγοντες που επηρεάζουν το διαχωρισμό αυτών των υδρογονανθράκων είναι ο αριθμός των υδροξυλομάδων, η ισομέρεια θέσης και ο βαθμός πολυμερισμού. Έτσι, είναι δυνατή η ταυτοποίηση ουσιών ή ο προσδιορισμός των παραπάνω παραμέτρων με βάση το χρόνο κατακράτησης (retention time) που προκύπτει από τη χρωματογραφία.

Ο προσδιορισμός των ολιγοσακχαριτών πραγματοποιήθηκε με την εισαγωγή 20 μ L απομονωμένου υπερκείμενου υγρού κατάλληλα αραιωμένου στη διάταξη της χρωματογραφίας εναλλαγής ανιόντων. Η διάταξη περιλαμβάνει στήλη CarboPac PA-1 (4x250 nm) εξοπλισμένης με ηλεκτροχημικό ανιχνευτή ED40 (Dionex, Sunnyvale, CA, Η.Π.Α.). Η κινητή φάση της στήλης αποτελούνταν από υδροξείδιο του νατρίου (NaOH) συγκέντρωσης 100 mM και 500 mM NaOAc σε 100 mM NaOH με ροή 1 mL/min.

ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

Κεφάλαιο 5: Ανάλυση σύστασης αραβόσιτου

Η ανάλυση σύστασης του αραβόσιτου πραγματοποιήθηκε με βάση το πρωτόκολλο σύστασης βιομάζας NREL. Στον παρακάτω πίνακα παρουσιάζονται οι ποσοστιαίες συστάσεις σε λιγνίνη, ημικυτταρίνη και κυτταρίνη για το ακατέργαστο υλικό και το υλικό μετά την προκατεργασία οξείδωσης με μείγμα ακετόνης νερού (Acetone Water Oxidation, AWO).

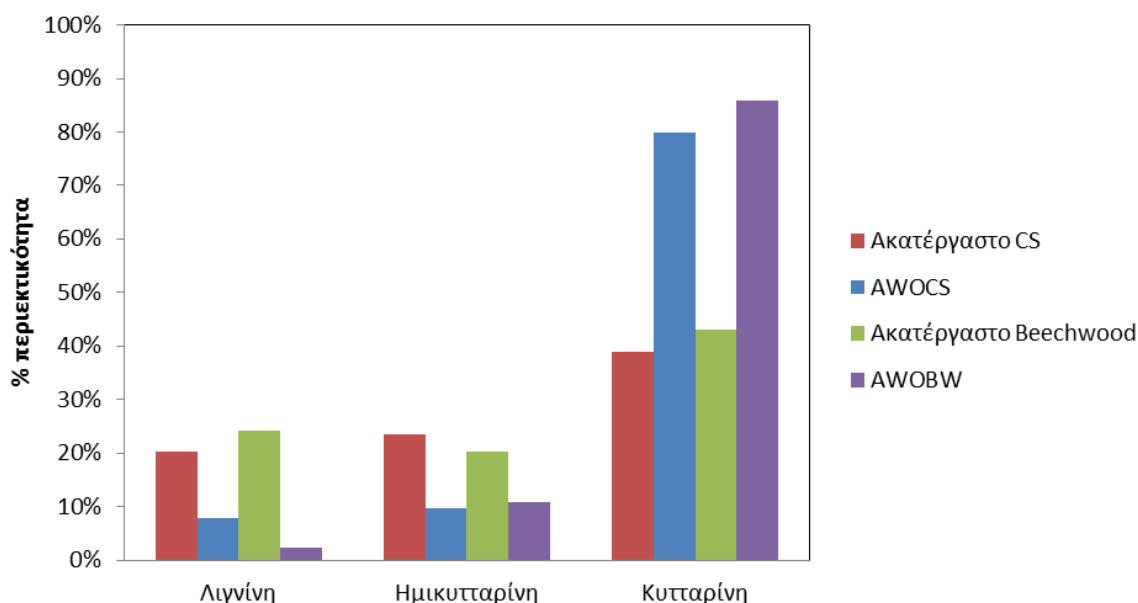
Πίνακας 5.1: Ποσοστιαίες αναλογίες λιγνίνης, ημικυτταρίνης και κυτταρίνης πριν και μετά την προκατεργασία

	Λιγνίνη	Ημικυτταρίνη	Κυτταρίνη
Ακατέργαστο Corn Stover	20,2%	23,5%	38,8%
Acetone Water Oxidation Corn Stover (AWOCS)	7,7%	9,7%	79,8%

Η προκατεργασία του αραβόσιτου πραγματοποιήθηκε σε θερμοκρασία 175° C και σε πίεση 40 atm, ενώ η αναλογία ακετόνης/ νερού ήταν 1:1. Σκοπός της προκατεργασίας είναι η απομάκρυνση της λιγνίνης και της ημικυτταρίνης και η αποικοδόμηση της περίπλοκης δομής του κυτταρικού τοιχώματος με σκοπό την απελευθέρωση της κυτταρίνης έτσι ώστε να είναι προσβάσιμη στα κυτταρινολυτικά ένζυμα. Για αυτό το λόγο, στόχος της προκατεργασίας είναι η μείωση της περιεκτικότητας του υλικού σε λιγνίνη και ημικυτταρίνη, κάτι που φαίνεται ότι επιτυγχάνεται στον αραβόσιτο.

Οι Katsimpouras et al. (2017) εξέτασαν την επίδραση της προκατεργασίας AWO σε πρώτη ύλη ξύλου οξιάς (beechwood, BW) για διαφορετικές συνθήκες κάθε φορά. Έτσι, χρησιμοποιήθηκαν διαφορετικές αναλογίες μειγμάτων ακετόνης/νερού, διαφορετικές θερμοκρασίες και πιέσεις και διαφορετικές συνθήκες περιεκτικότητας της ατμόσφαιρας σε οξυγόνο. Τα αποτελέσματα της μεταβολής των ποσοστών λιγνίνης, ημικυτταρίνης και κυτταρίνης παρουσιάζονται σε σύγκριση με αυτά του αραβόσιτου στο παρακάτω διάγραμμα:

Ποσοστιαία περιεκτικότητα κάθε υλικού



Διάγραμμα 5.1: Ποσοστιαία περιεκτικότητα σε λιγνίνη, ημικυτταρίνη και κυτταρίνη για ακατέργαστα και προκατεργασμένα Corn Stover και Beechwood έπειτα από προκατεργασία σε θερμοκρασία 175° C, πίεση 40 atm και αναλογία ακετόνης/ νερού 1:1

Από το παραπάνω διάγραμμα βγαίνει το συμπέρασμα ότι οι συγκεκριμένες συνθήκες προκατεργασίας AWO είναι αποτελεσματικές περισσότερες από μια πρώτες ύλες, αφού οι περιεκτικότητες λιγνίνης, ημικυτταρίνης και κυτταρίνης μεταβάλλονται με παρόμοιο τρόπο. Ακόμα, και στις δύο περιπτώσεις επιτυγχάνεται μείωση του ποσοστού της λιγνίνης και της ημικυτταρίνης και αύξηση του ποσοστού της κυτταρίνης. Αυτή η αύξηση είναι φαινομενική αφού δε γίνεται παραγωγή κυτταρίνης, αλλά η απομάκρυνση λοιπών συστατικών αυξάνει το ποσοστό της μάζας που καλύπτει. Επιπλέον, πολύ σημαντικό στοιχείο της συγκεκριμένης προκατεργασίας είναι το γεγονός ότι απομακρύνεται μεγάλο ποσοστό της λιγνίνης (83,8%) και της ημικυτταρίνης (82,6%), αφού με αυτό τον τρόπο επιτυγχάνονται δύο στόχοι. Ο πρώτος στόχος έχει να κάνει με το σπάσιμο του φυσικού φράγματος που δημιουργεί η λιγνίνη και η ημικυτταρίνη στα κυτταρινολυτικά ένζυμα. Με αυτή την επεξεργασία η κυτταρίνη απελευθερώνεται και η πρόσβαση των κυτταρινολυτικών ενζύμων σε αυτήν είναι ευκολότερη. Ο δεύτερος στόχος έχει να κάνει με το γεγονός ότι η λιγνίνη αποτελεί σημείο απορρόφησης των κυτταρινολυτικών ενζύμων και μάλιστα μη αντιστρεπτής, μειώνοντας έτσι τη δράση τους. Η απομάκρυνση της λιγνίνης αποτρέπει την απορρόφηση των ενζύμων σε αυτήν, με αποτέλεσμα την καλύτερη πρόσβαση των κυτταρινολυτικών ενζύμων στην κυτταρίνη και τη βελτίωση της υδρόλυσης (Kumar et al. 2009).

Τέλος, αξίζει να αναφερθεί ότι για τη συναγωγή ασφαλέστερων συμπερασμάτων για τον αραβόσιτο, είναι αναγκαία η διεξαγωγή προκατεργασίας σε διαφορετικές

συνθήκες θερμοκρασίας, πίεσης και αναλογίας μείγματος ακετόνης/νερού προκειμένου να εξεταστεί αναλυτικότερα η συμπεριφορά της πρώτης ύλης και να βρεθούν οι βέλτιστες συνθήκες για την αποτελεσματικότερη απομάκρυνση της λιγνίνης και της ημικυτταρίνης.

Κεφάλαιο 6: Ενζυμική Υδρόλυση

6.1 Προσδιορισμός ενεργότητας κυτταρινολυτικού σκευάσματος

Ο προσδιορισμός της ενζυμικής ενεργότητας του κυτταρινολυτικού σκευάσματος έγινε με βάση το πρωτόκολλο NREL για τη μέτρηση ενεργότητας κυτταρινασών, το οποίο υπάγεται στις οδηγίες της IUPAC και εκφράστηκε σε Filter Paper Units – FPU Units. Παράλληλα με τη μέθοδο Bradford μετρήθηκε η ποσότητα των περιεχόμενων πρωτεϊνών στο σκεύασμα η οποία εκφράστηκε μέσω της συγκέντρωσης σε mg πρωτεΐνης/ mL σκευάσματος. Έτσι, ενεργότητα του ενζύμου υπολογίστηκε σε 84 FPA Units και το πρωτεϊνικό του περιεχόμενο σε 90 mg πρωτεΐνης/ mL σκευάσματος.

6.2 Υδρόλυση σε διαφορετικές συγκεντρώσεις ενζύμου

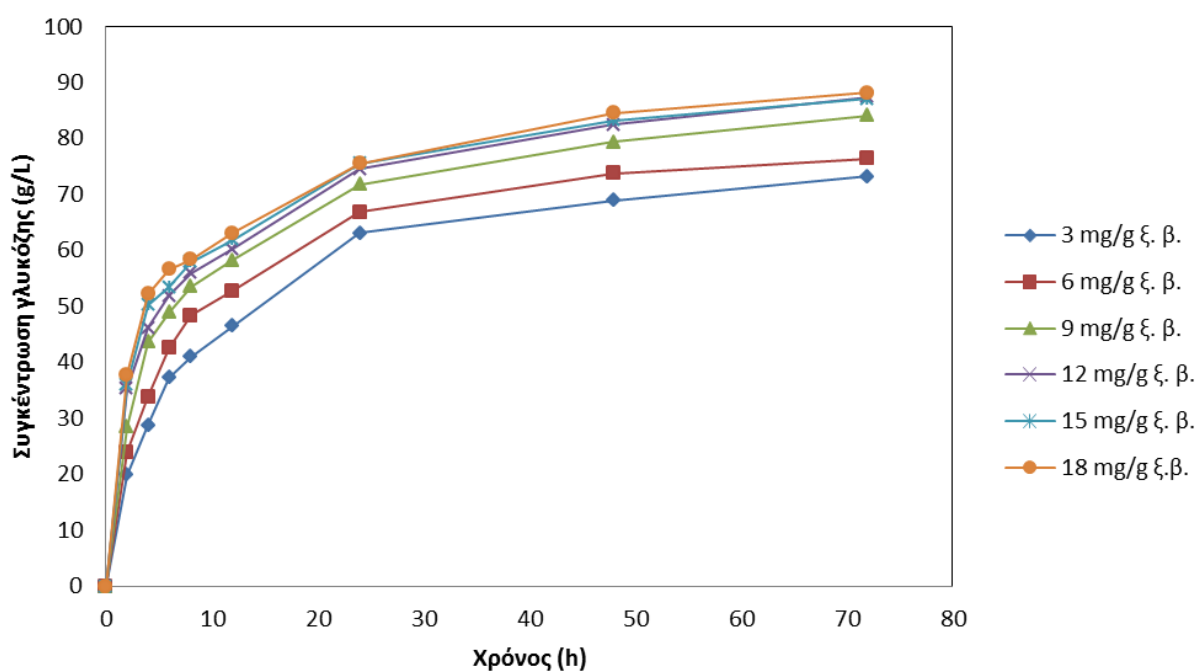
Η βασική αρχή που διέπει αυτό το πείραμα είναι ίδια με αυτή του πειράματος μελέτης της επίδρασης της συγκέντρωσης στερεών και θα μετρηθεί και εδώ η συγκέντρωση της γλυκόζης σε διάφορες χρονικές στιγμές. Σε αυτό το πείραμα η συγκέντρωση στερεών διατηρήθηκε σταθερή και ίση με 10% w/w για όλα τα δείγματα, όπως και η θερμοκρασία ίση με 50° C και ο ρυθμός ανάδευσης ίσος με 180 rpm. Το πείραμα αυτό διεξήχθη σε έξι δείγματα σε κωνικές φιάλες των 50 mL σε καθεμία από τις οποίες αντιστοιχεί μια συγκέντρωση ενζύμου. Οι συγκεντρώσεις ενζύμου που χρησιμοποιήθηκαν ήταν 3 mg πρωτεΐνης/g ξηρής βιομάζας, 6 mg πρωτεΐνης/g ξηρής βιομάζας, 9 mg πρωτεΐνης/g ξηρής βιομάζας, 12 mg πρωτεΐνης/g ξηρής βιομάζας, 15 mg πρωτεΐνης/g ξηρής βιομάζας και 18 mg πρωτεΐνης/g ξηρής βιομάζας. Η χρονική πορεία παραγωγής γλυκόζης περιγράφεται από τα δεδομένα του πίνακα 6.3 και απεικονίζεται συνοπτικά στο διάγραμμα 6.4.

Αποτελέσματα

Πίνακας 6.1: Παραγωγή γλυκόζης για διαφορετικές συγκεντρώσεις ενζύμου σε συγκέντρωση στερεών 10%

Χρόνος (h)	Συγκέντρωση γλυκόζης (g/L)					
	3 mg/g ξ.β.	6 mg/g ξ.β.	9 mg/g ξ.β.	12 mg/g ξ.β.	15 mg/g ξ.β.	18 mg/g ξ.β.
2	19,8	23,9	28,4	35,3	36,0	37,8
4	28,8	33,8	43,7	46,1	50,2	52,6
6	37,3	42,5	48,9	51,8	53,4	56,6
8	40,9	48,4	53,5	56,0	57,9	8,4
12	46,5	52,8	58,2	60,2	61,8	63,1
24	63,1	66,8	71,7	74,6	75,5	75,6
48	68,9	73,8	79,4	82,4	83,2	84,5
72	73,2	76,4	84,1	87,4	87,1	88,1

Υδρόλυση με διαφορετικά ενζυμικά φορτία - Χρόνος

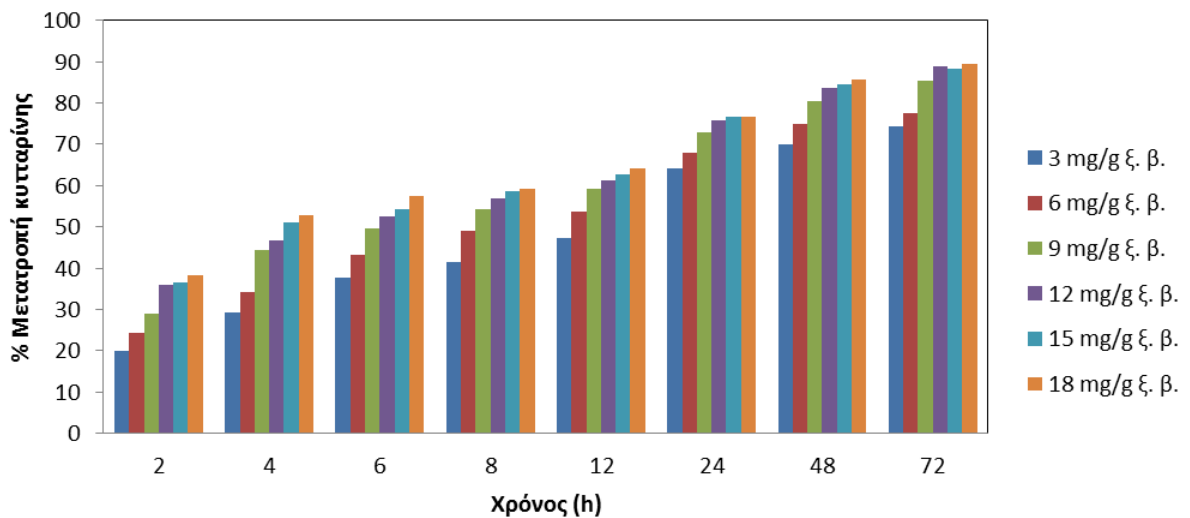


Διάγραμμα 6.1: Συγκέντρωση γλυκόζης για διαφορετικά ενζυμικά φορτία στην πάροδο του χρόνου

Από τη μορφή των καμπυλών φαίνεται η πορεία της αύξησης της γλυκόζης η οποία έχει την ίδια μορφή με αυτή του πειράματος για τις διαφορετικές συγκεντρώσεις στερεών (solids loading), γεγονός που είναι αναμενόμενο λόγω του ότι η αντίδραση που λαμβάνει χώρα είναι η ίδια. Επιπλέον, οι καμπύλες σε αυτό το πείραμα φαίνονται ομαλότερες και παρατηρείται μια μικρή και σχεδόν σταθερή αύξηση

ανάμεσα στις διαφορετικές συγκεντρώσεις ενζύμου. Αυτό πιθανώς να συμβαίνει διότι η συγκέντρωση στερεών είναι μικρή και κατά συνέπεια η ανάδευση είναι καλύτερη με αποτέλεσμα το ένζυμο να κατανέμεται καλύτερα σε όλο το υλικό. Έτσι, είναι λογικό η αυξανόμενη ποσότητα ενζύμου να παράγει μεγαλύτερη συγκέντρωση γλυκόζης κάθε χρονική στιγμή. Ακόμα, εξετάζεται και σε αυτό το πείραμα το ποσοστό μετατροπής της κυτταρίνης σύμφωνα με το διάγραμμα 6.5.

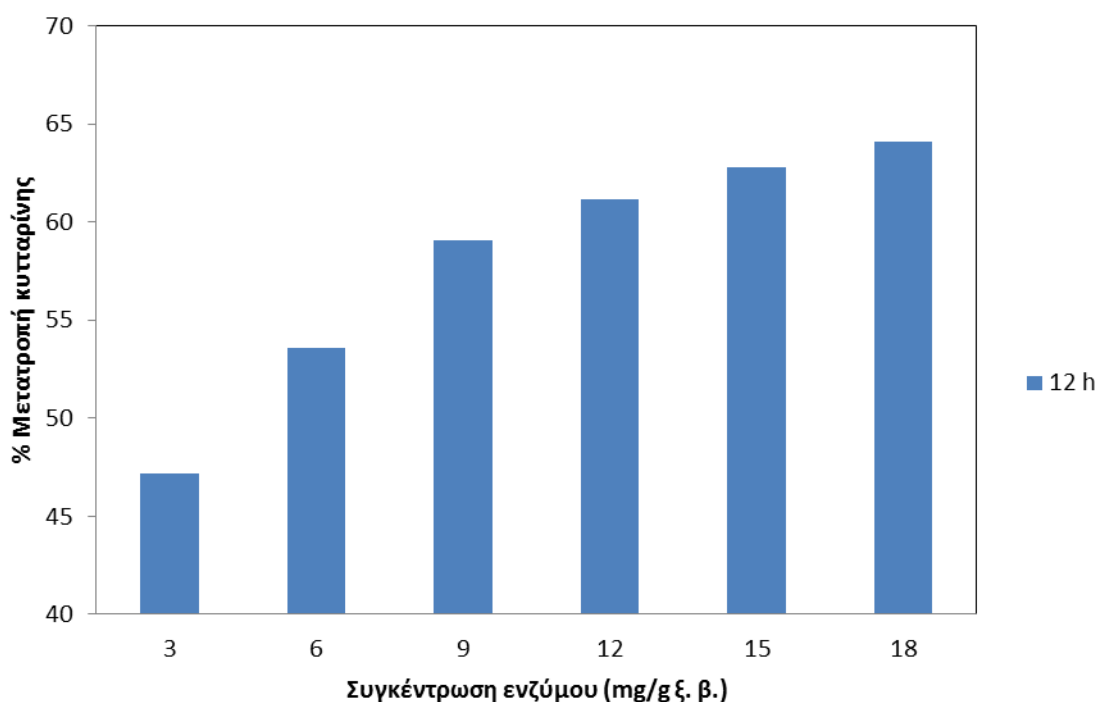
Μετατροπή κυτταρίνης - Χρόνος



Διάγραμμα 6.2: Ποσοστιαία μετατροπή κυτταρίνης για διαφορετικές συγκεντρώσεις ενζύμου σε κάθε χρονική στιγμή

Εξετάζοντας το διάγραμμα 6.5 παρατηρείται μια ομοιότητα με το διάγραμμα 6.3, αφού και στις δύο περιπτώσεις για δεδομένη συγκέντρωση ενζύμου το ποσοστό μετατροπής της κυτταρίνης αυξάνεται με την πάροδο του χρόνου (η συγκέντρωση στερεών είναι σταθερή και ίση με 10%). Ωστόσο, αντίθετα με τη φθίνουσα μετατροπή κυτταρίνης κατά την αύξηση της συγκέντρωσης στερεών για δεδομένη χρονική στιγμή (διάγραμμα 6.3), σε αυτή την περίπτωση η αύξηση της συγκέντρωσης του ενζύμου οδηγεί σε μεγαλύτερη μετατροπή κυτταρίνης.

Ποσοστιαία μετατροπή κυτταρίνης στις 24 h



Διάγραμμα 6.3: Ποσοστιαία μετατροπή κυτταρίνης για τις διαφορετικές συγκεντρώσεις ενζύμου στις 12 h

Ακόμα, αν εξεταστεί η χρονική στιγμή των 12 h, στην οποία ξεκινάει να εμφανίζεται το πλατώ της γλυκόζης, παρατηρείται ότι οι μετατροπές κυτταρίνης για τις συγκεντρώσεις ενζύμου 12 mg/g ξ. β., 15 mg/g ξ. β., 18 mg/g ξ. β. είναι σχεδόν ίσες (61,2%, 62,3% και 64,1% αντίστοιχα), ενώ για τις συγκεντρώσεις 6 και 9 mg/g ξ. β. είναι 53,6% και 59,1%. Αυτό σημαίνει, ότι η μετάβαση από τη συγκέντρωση των 6 mg/g ξ. β. στη συγκέντρωση των 9 mg/g ξ. β. αντιστοιχεί σε μια αύξηση περίπου 10% του ποσοστού μετατροπής της κυτταρίνης, ενώ η μετάβαση από τη συγκέντρωση 9 mg/g ξ. β. σε συγκέντρωση 12 mg/g ξ. β. σε αύξηση μόλις 3,5%. Και επειδή η μετατροπή της κυτταρίνης για συγκέντρωση 12 mg/g ξ. β. είναι αρκετά κοντά στη μέγιστη δυνατή που μπορεί να παρατηρηθεί, επιλέγεται η συγκέντρωση ενζύμου των 9 mg/g ξ. β. ως η ιδανικότερη για την επίτευξη ικανοποιητικών αποτελεσμάτων με την ελάχιστη δυνατή κατανάλωση ενζύμου για τη διεξαγωγή των υδρολύσεων.

6.3 Μελέτη της υδρόλυσης για διαφορετικές συγκεντρώσεις ξηρής βιομάζας

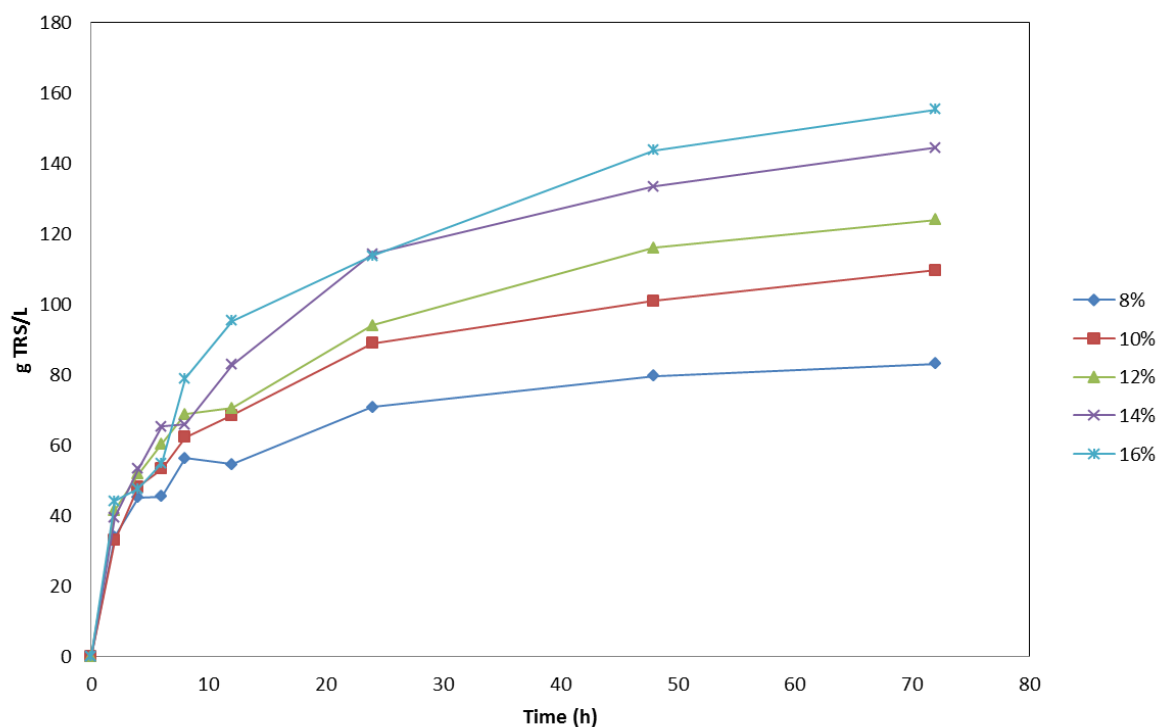
Σε αυτή τη σειρά πειραμάτων πραγματοποιήθηκε ενζυμική υδρόλυση της βιομάζας του αραβόσιτου για διαφορετικές συγκεντρώσεις στερεών με δεδομένη συγκέντρωση ενζύμου. Στόχος είναι η μελέτη της απελευθέρωσης ολικών αναγωγικών σακχάρων καθώς και ο υπολογισμός απελευθέρωσης γλυκόζης, η οποία αποτελεί το υπόστρωμα για την παραγωγή αιθανόλης από το μικροοργανισμό *S. cerevisiae*.

Ο προσδιορισμός των ολικών αναγωγικών σακχάρων έγινε με τη μέθοδο DNS, ενώ της γλυκόζης με τη μέθοδο GOD/PAP. Αναλυτικά, η υδρόλυση πραγματοποιήθηκε σε κωνικές φιάλες Erlenmeyer των 50 mL καθεμία από τις οποίες περιείχε διαφορετική συγκέντρωση στερεών: 8% w/v, 10% w/v, 12% w/v, 14% w/v, 16% w/v ξηρής βιομάζας. Ο όγκος της αντίδρασης ήταν 5 mL και η συγκέντρωση του ενζύμου που χρησιμοποιήθηκε ήταν 9 mg ενζύμου/ g ξηρής βιομάζας (Dry Matter, DM). Η υδρόλυση πραγματοποιήθηκε σε επωαστήρα για τη ρύθμιση της θερμοκρασίας στους 50° C και της ανάδευσης σε 180 rpm και η δειγματοληψία έγινε στις χρονικές στιγμές των 2 h, 4 h, 6 h, 8 h, 12 h, 24 h, 48 h και 72 h μετά την προσθήκη του ενζύμου στη φιάλη. Τα αποτελέσματα παραγωγής ολικών αναγωγικών σακχάρων παρουσιάζονται παρακάτω.

Πίνακας 6.2: Συγκέντρωση ολικών αναγωγικών σακχάρων για τις διαφορετικές συγκεντρώσεις στερεών στις διάφορες χρονικές στιγμές

Χρόνος (h)	Συγκέντρωση ολικών αναγωγικών σακχάρων (g/L)				
	8%	10%	12%	14%	16%
2	34,0	32,9	41,6	39,5	44,1
4	45,2	48,1	51,8	53,2	47,6
6	45,5	53,3	60,3	65,2	54,8
8	56,3	62,2	68,7	65,9	78,9
12	54,5	68,5	70,5	82,8	95,2
24	70,7	89,0	94,1	114,3	113,7
48	79,6	101,0	116,1	133,	143,7
72	83,2	109,6	124,0	144,4	155,3

Ολικά Αναγωγικά Σάκχαρα - Χρόνος

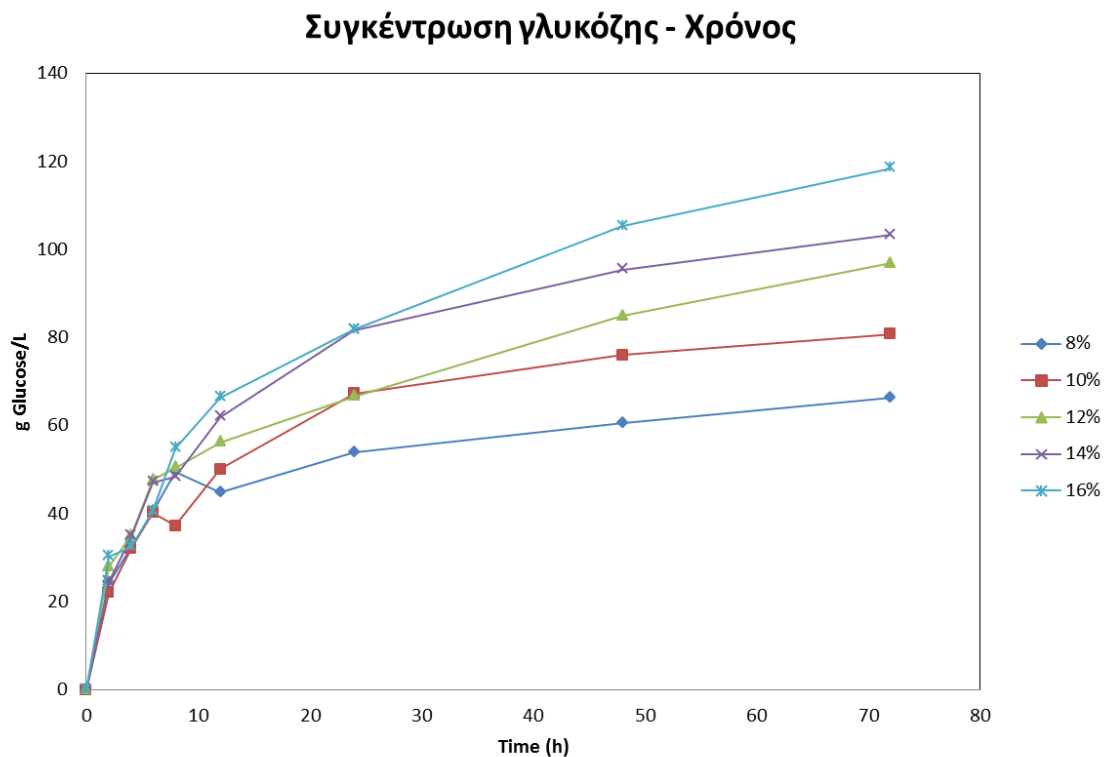


Διάγραμμα 6.4: Απελευθέρωση ολικών αναγωγικών σακχάρων με την πάροδο του χρόνου.

Από το διάγραμμα παρατηρείται ότι στα πρώτα δείγματα υπάρχει μια γρήγορη αύξηση των ολικών αναγωγικών σακχάρων, ενώ μετά τις 12 h αντίδρασης αρχίζει να σχηματίζεται πλατώ. Αυτό συμβαίνει αφ' ενός διότι στις αρχικές ώρες 0-12 h η συγκέντρωση του υποστρώματος είναι μεγαλύτερη με αποτέλεσμα ο ρυθμός αντίδρασης να είναι μεγαλύτερος, αφ' ετέρου διότι παρεμπόδιση από το προϊόν είναι μικρή, λόγω της χαμηλής συγκέντρωσής του. Αντίθετα, σε μεγαλύτερους χρόνους (>12 h) όπου αρχίζει να σχηματίζεται το πλατώ, η παραγωγή των αναγωγικών σακχάρων μειώνεται σημαντικά αφού έχει καταναλωθεί αρκετό υπόστρωμα και η συγκέντρωση των σακχάρων είναι αρκετά μεγάλη για να προκαλεί παρεμπόδιση.

Πίνακας 6.3: Συγκέντρωση γλυκόζης για τις διαφορετικές συγκεντρώσεις στερεών στις διάφορες χρονικές στιγμές

Χρόνος (h)	Συγκέντρωση γλυκόζης (g/L)				
	8%	10%	12%	14%	16%
2	24,3	22,0	27,9	24,5	30,3
4	32,5	32,1	35,1	34,9	32,4
6	40,4	40,3	47,7	47,1	40,6
8	49,6	37,3	50,4	48,3	54,9
12	44,8	50,1	56,2	62,0	66,4
24	53,9	67,3	66,6	81,7	81,8
48	60,5	76,0	84,8	95,4	105,3
72	66,3	80,8	96,9	103,3	118,5

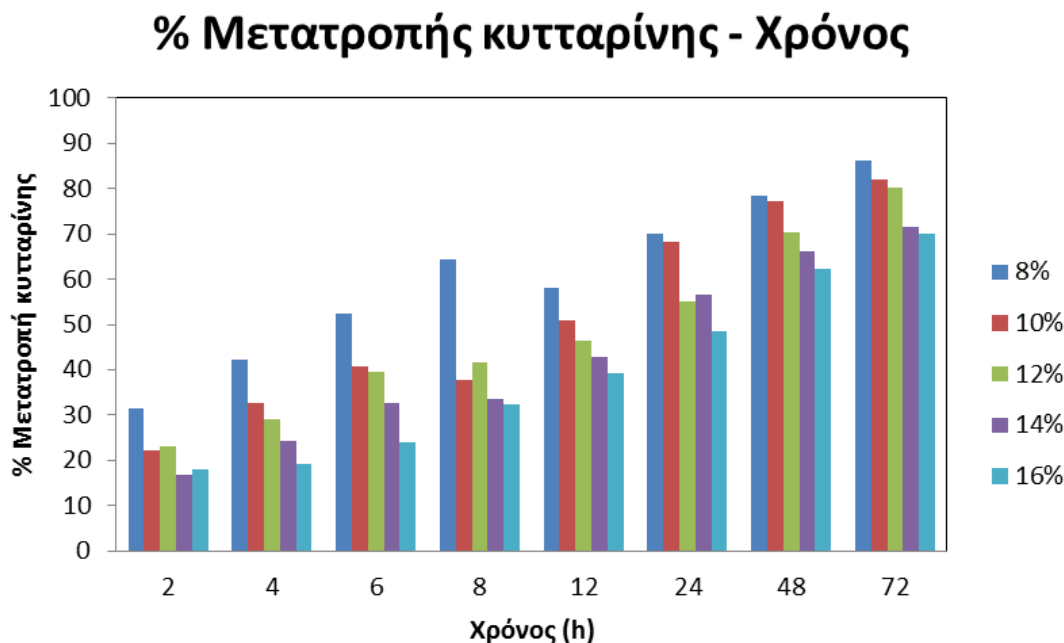


Διάγραμμα 6.5: Απελευθέρωση γλυκόζης με την πάροδο του χρόνου για τις διαφορετικές συγκεντρώσεις στερεών

Από το διάγραμμα φαίνεται πως οι καμπύλες της γλυκόζης ακολουθούν παρόμοια μορφή με αυτές των ολικών αναγωγικών σακχάρων. Ωστόσο, φαίνεται ότι οι τελικές τιμές συγκέντρωσης της γλυκόζης είναι χαμηλότερες από αυτές των ολικών αναγωγικών σακχάρων. Αυτή η συμπεριφορά είναι αναμενόμενη, αφού η γλυκόζη αποτελεί και αυτή αναγωγικό σάκχαρο αλλά όχι το σύνολο αυτών, με αποτέλεσμα να παράγεται με τον ίδιο ρυθμό και να φτάνει μέγιστο στον ίδιο χρόνο αλλά η συγκέντρωσή της να είναι χαμηλότερη από το σύνολο των ολικών αναγωγικών σακχάρων.

Αποτελέσματα

Ακόμα, αξίζει να υπολογιστεί το ποσοστό της κυτταρίνης που μετατρέπεται σε γλυκόζη από τη συνολική κυτταρίνη που υπάρχει στη βιομάζα. Αυτός ο υπολογισμός θα γίνει με βάση τη συγκέντρωση της γλυκόζης που μετρήθηκε. Τα αποτελέσματα της ποσοστιαίας μετατροπής της κυτταρίνης συνοψίζονται στο διάγραμμα 6.3.



Διάγραμμα 6.6: Ποσοστιαία μετατροπή της κυτταρίνης του δείγματος σε γλυκόζη

Από το διάγραμμα 6.3 παρατηρείται ότι κατά κανόνα, για δεδομένη χρονική στιγμή το ποσοστό μετατροπής της κυτταρίνης μειώνεται με την αύξηση της συγκέντρωσης, ενώ για δεδομένη συγκέντρωση το ποσοστό της μετατροπής της κυτταρίνης αυξάνεται με την πάροδο του χρόνου. Το δεύτερο σκέλος της παρατήρησης ερμηνεύεται λογικά αφού για μια δεδομένη συγκέντρωση, με την πάροδο του χρόνου η αντίδραση υδρόλυσης προχωρά με αποτέλεσμα να διασπάται μεγαλύτερο μέρος κυτταρίνης αυξάνοντας έτσι την ποσοστιαία μετατροπή της. Βάσει αποτελεσμάτων αυτό επαληθεύεται από το γεγονός ότι για συγκέντρωση στερεών 14% το αρχικό ποσοστό μετατροπής είναι 17,0% στις 2 h υδρόλυσης, ενώ στις 72 h είναι 71,6%.

Από την άλλη πλευρά, το πρώτο σκέλος της εξήγησης μπορεί να ερμηνευθεί ως εξής. Η αντίδραση της υδρόλυσης απαιτεί συγκεκριμένες συνθήκες θερμοκρασίας (50° C) έτσι ώστε να υπάρχει βέλτιστη λειτουργία του κυτταρινολυτικού ενζύμου. Ακόμα, η βέλτιστη δράση του ενζύμου προϋποθέτει την πρόσβασή του στη συνολική μάζα του υλικού η οποία επιτυγχάνεται με την ανάδευση και τη διαβροχή του υλικού από το διάλυμα του ενζύμου και του ρυθμιστικού διαλύματος. Έτσι, σε μεγάλες συγκεντρώσεις στερεών υπάρχει πιθανότητα το υλικό να μην έχει υποστεί ολική διαβροχή ώστε το ένζυμο να έχει πρόσβαση στη συνολική ποσότητα της

κυτταρίνης ή λόγω ανεπαρκούς ανάδευσης η κατανομή της θερμότητας να μην είναι σωστή και να μη βρίσκεται όλο το υλικό σε θερμοκρασία 50° C που απαιτείται. Αντιθέτως αυτά τα φαινόμενα είναι πιο εύκολο να επιτευχθούν σε συστήματα χαμηλών συγκεντρώσεων στερεών όπου το ιξώδες είναι χαμηλότερο και η ανάδευση πιο αξιόπιστη. Έτσι, παρατηρείται ότι την τελική στιγμή (72 h) όπου το ποσοστό μετατροπής της κυτταρίνης είναι το μέγιστο το δείγμα συγκέντρωσης στερεών 8% παρουσιάζει μετατροπή κυτταρίνης 86,02%, ενώ το δείγμα συγκέντρωσης στερεών 70,16%. Η παρατήρηση αυτή παρατηρείται και στις περισσότερες χρονικές στιγμές του πειράματος με ελάχιστες εξαιρέσεις.

6.4 Υδρόλυση υλικού μετά από επεξεργασία με *FoXyn*

Σε αυτή τη σειρά πειραμάτων πραγματοποιήθηκε υδρόλυση βιομάζας, η οποία είχε υποστεί επεξεργασία με την ξυλανάση *FoXyn*. Η ξυλανάση αυτή παρέχει τη δυνατότητα υδρόλυσης των μονομερών της ημικυτταρίνης και το διαχωρισμό τους από τη στερεή βιομάζα στην υγρή φάση της αντίδρασης. Με αυτό τον τρόπο επιτυγχάνεται αφ' ενός απελευθέρωση περιοχών της κυτταρίνης, οι οποίες είναι προσδεμένες στη δομή της ημικυτταρίνης, προκειμένου να είναι προσβάσιμες στο κυτταρινολυτικό ένζυμο και αφ' ετέρου αύξηση του συνολικού ποσοστού της κυτταρίνης στην ξηρή βιομάζα. Το γεγονός αυτό, μπορεί να προκαλέσει αύξηση στην παραγωγή της γλυκόζης μετά το στάδιο της υδρόλυσης καθώς και στη μετατροπή της κυτταρίνης σε γλυκόζη.

Η διεξαγωγή του πειράματος χωρίζεται σε δύο μέρη και στόχος ήταν να μελετηθεί η υδρόλυση σε συγκεντρώσεις στερεών 10% και 16% με συγκέντρωση ενζύμου 9 mg/g ξ. β. Στο πρώτο μέρος του πειράματος πραγματοποιήθηκε εισαγωγή υλικού σε κωνικές φιάλες των 100 mL μαζί με ρυθμιστικό διάλυμα pH 5.0 ένζυμο συγκέντρωσης 28,8 mg/g ξ. β. για τη συγκέντρωση στερεών 10% και 14,4 mg/g ξ. β. για τη συγκέντρωση στερεών 16%. Οι κωνικές φιάλες αφέθηκαν για αντίδραση για 24 h στους 50° C και μετά το τέλος της αντίδρασης έγινε συλλογή του στερεού κλάσματος. Στο δεύτερο μέρος του πειράματος έγινε κατάλληλη ζύγιση στο υλικό για την επίτευξη συγκέντρωσης στερεών 10% και 16% και πραγματοποιήθηκε υδρόλυσή τους σε συνθήκες ίδιες με αυτές του πειράματος υδρόλυσης για διαφορετικές συγκεντρώσεις στερεών (solids loading). Η υδρόλυση διήρκεσε για 12 h οπότε και μετρήθηκε η συγκέντρωση γλυκόζης. Τα αποτελέσματα του πειράματος φαίνονται στον πίνακα 6.4.

Αποτελέσματα

Πίνακας 6.4: Αποτελέσματα υδρόλυσης βιομάζας επεξεργασμένης με *FoXyn* σε σύγκριση με τα αποτελέσματα των υδρολύσεων για διαφορετικές συγκεντρώσεις στερεών μετά από 12 h υδρόλυσης

Συγκέντρωση στερεών	10% στερεά		16% στερεά	
	Συγκέντρωση γλυκόζης (g/L)	% Μετατροπή κυτταρίνης	Συγκέντρωση γλυκόζης (g/L)	% Μετατροπή κυτταρίνης
Υλικό χωρίς <i>FoXyn</i>	50,1	50,8	66,4	39,3
Υλικό με <i>FoXyn</i>	73,2	74,3	83,6	48,3

Από τα δεδομένα του πίνακα φαίνεται ότι η συγκέντρωση της γλυκόζης που απελευθερώνεται σε κάθε περίπτωση είναι σημαντικά μεγαλύτερη και το ίδιο ισχύει και για τη μετατροπή της κυτταρίνης. Επομένως, αποδείχθηκε η αρχική υπόθεση σχετικά με τη βελτίωση της υδρόλυσης έπειτα από επεξεργασία του υλικού με *FoXyn*.

Κεφάλαιο 7: Ζυμώσεις και παραγωγή αιθανόλης

7.1 Ζύμωση βιομάζας σε σύστημα διαλείποντος έργου

Αυτή η σειρά πειραμάτων περιλαμβάνει την παραγωγή αιθανόλης από ζύμωση της βιομάζας του στελέχους αραβοσίτου σε σύστημα διαλείποντος έργου. Το σύστημα διαλείποντος έργου περιλαμβάνει την εισαγωγή ολόκληρης της ποσότητας βιομάζας πριν την εκκίνηση της υδρόλυσης και η ζύμωση πραγματοποιήθηκε για συγκεντρώσεις στερεών 10% w/w, 12% w/w, 14% w/w. Στη συνέχεια, πραγματοποιήθηκε προϋδρόλυση της βιομάζας για χρονικό διάστημα 12 h με συγκέντρωση ενζύμου 9 mg πρωτεΐνης/ g ξ. β. σε θερμοκρασία 50 °C και ανάδευση 180 rpm. Στο τέλος των 12 h έγινε λήψη δείγματος για μέτρηση σακχάρων και αφότου το σύστημα έφτασε σε θερμοκρασία 35 °C έγινε εισαγωγή της ζύμης για εκκίνηση της ζύμωσης. Η δειγματοληψία για τη μέτρηση της αιθανόλης έγινε στις χρονικές στιγμές 8 h, 24 h, 48 h, 72 h, 96 h και 120 h. Τα αποτελέσματα σχετικά με την παραγωγή της αιθανόλης μετρήθηκαν με χρήση υγρής χρωματογραφίας (HPLC).

Πίνακας 7.1: Συγκέντρωση αιθανόλης για τις συγκεντρώσεις στερεών 10%-14% σε κάθε χρονική στιγμή

Χρόνος (h)	Συγκέντρωση αιθανόλης (g/L)		
	10%	12%	14%
8	7,5	8,0	9,6
24	18,2	22,6	27,2
48	27,4	31,1	36,1
72	27,5	31,5	38,7
96	30,0	34,9	41,5
120	29,1	34,6	41,6

Από τις τιμές του παραπάνω πίνακα βγαίνει το συμπέρασμα ότι η συγκέντρωση της αιθανόλης αυξάνεται όσο μεγαλύτερη είναι η συγκέντρωση των στερεών. Αυτό το συμπέρασμα είναι λογικό διότι μεγαλύτερη συγκέντρωση στερεών σημαίνει περισσότερο υπόστρωμα για κατανάλωση και κατ' επέκταση μεγαλύτερη παραγωγή αιθανόλης. Παράλληλα με την παρατήρηση της πορείας της αιθανόλης, είναι χρήσιμο να εξεταστεί και η πορεία κατανάλωσης της γλυκόζης από το μικροοργανισμό. Ωστόσο, ο ακριβής προσδιορισμός της κατανάλωσης της γλυκόζης δεν είναι δυνατός, αφού το σύστημα εκτός από διαλείποντος έργου είναι και σύστημα SSF. Αυτό σημαίνει ότι οι αντιδράσεις υδρόλυσης και ζύμωσης προχωρούν παράλληλα, με αποτέλεσμα να παράγεται και να καταναλώνεται γλυκόζη σε κάθε σημείο του πειράματος μετά το στάδιο της προϋδρόλυσης, μην επιτρέποντας τον

Αποτελέσματα

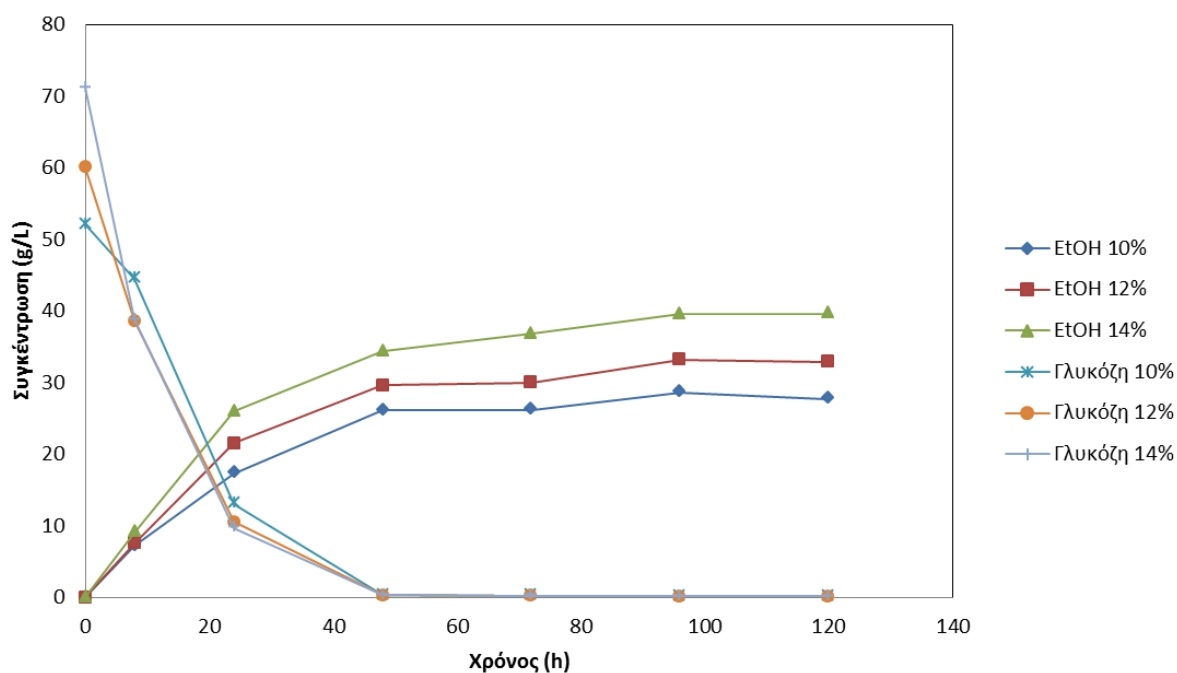
ακριβή προσδιορισμό του ρυθμού κατανάλωσης και παραγωγής της γλυκόζης. Παρ' όλα αυτά, ο συντελεστής μετατροπής της γλυκόζης σε αιθανόλη είναι 0.51, που σημαίνει ότι η τελική συγκέντρωση της αιθανόλης θα πρέπει να είναι λίγο μεγαλύτερη της μισής συγκέντρωσης γλυκόζης που είναι δυνατόν να παραχθεί από κάθε συγκέντρωση στερεών.

Πίνακας 7.2: Συγκέντρωση γλυκόζης για τις συγκεντρώσεις στερεών 10%-14% σε κάθε χρονική στιγμή

Χρόνος (h)	Συγκέντρωση γλυκόζης (g/L)		
	10%	12%	14%
0	52,1	60,8	71,2
8	44,5	38,6	38,9
24	13,2	10,5	9,8
48	0,4	0,4	0,4
72	0,2	0,2	0,3
96	0,2	0,2	0,2
120	0,2	0,2	0,2

Από τον παραπάνω πίνακα φαίνεται ότι η συγκέντρωση της γλυκόζης κατά κανόνα μειώνεται, γεγονός που είναι αναμενόμενο λόγω της κατανάλωσης από το μικροοργανισμό. Τα παραπάνω αποτελέσματα σχετικά με την παραγωγή της αιθανόλης και της γλυκόζης μπορούν να συνοψιστούν στο διάγραμμα 7.1.

Ζύμωση διαλείποντος έργου



Διάγραμμα 7.1: Χρονική εξέλιξη της γλυκόζης και της αιθανόλης για τη ζύμωση σε σύστημα διαλείποντος έργου σε συγκεντρώσεις στερεών 10%-14%

Οι καμπύλες του διαγράμματος επαληθεύουν την αντίθετη πορεία των γραμμών της γλυκόζης και της αιθανόλης, αφού η συγκέντρωση της γλυκόζης μειώνεται και η συγκέντρωση της αιθανόλης αυξάνεται. Ακόμα, από τις γραμμές συγκέντρωσης της αιθανόλης βγαίνει το συμπέρασμα ότι η συγκέντρωση της αιθανόλης ξεκινά να εμφανίζει πλατώ στις 24 h, ενώ μετά τις 48 h αυξάνεται, αλλά με μικρότερο ρυθμό. Αυτό μπορεί να επαληθευτεί και από τις τιμές της παραγωγικότητας της αιθανόλης για τις διαφορετικές χρονικές στιγμές οι οποίες παρουσιάζονται στον πίνακα 7.3.

Πίνακας 7.3: Παραγωγικότητα αιθανόλης για συγκεντρώσεις στερεών 10%-14% σε κάθε χρονική στιγμή

Χρόνος (h)	Παραγωγικότητα αιθανόλης (g/L/h)		
	10%	12%	14%
8	0,94	1,00	1,20
24	0,76	0,94	1,13
48	0,57	0,65	0,75
72	0,38	0,44	0,54
96	0,31	0,36	0,43
120	0,24	0,29	0,35

Παρατηρείται ότι οι τιμές της παραγωγικότητας της αιθανόλης είναι φθίνουσες σχεδόν για όλες τις συγκεντρώσεις στερεών με την πάροδο του χρόνου. Ακόμα, μετά την πάροδο των 48 h οι τιμές της παραγωγικότητας είναι αρκετά μικρές γεγονός που επαληθεύει το σχηματισμό πλατώ. Η αύξηση της παραγωγικότητας συνδέεται κατά ένα ποσοστό με την αύξηση της συγκέντρωσης της γλυκόζης, αφού περισσότερη γλυκόζη σημαίνει περισσότερο υπόστρωμα προς κατανάλωση και κατ'επέκταση μεγαλύτερη παραγωγικότητα. Το γεγονός ότι η παραγωγικότητα της αιθανόλης κυμαίνεται σε σχετικά υψηλά επίπεδα μπορεί να επαληθευτεί και από τη μορφή της καμπύλης, αφού ακόμα και μετά τις 48 h η συγκέντρωση της αιθανόλης αυξάνεται, άρα υπάρχει παραγωγικότητα.

Τέλος, είναι αξιόλογο να εκτιμηθεί η απόδοση επί τοις εκατό παραγωγής της αιθανόλης. Η ποσότητα της αιθανόλης που παράγεται κατά τη ζύμωση δεν αποτελεί τη μέγιστη ποσότητα αιθανόλης που προκύπτει στοιχειομετρικά από τη μετατροπή της γλυκόζης με την αιθανόλη. Αυτό συμβαίνει διότι η παραγωγή της αιθανόλης γίνεται με το μικροοργανισμό *S.cerevisiae*, ο οποίος καταναλώνει τη γλυκόζη ως υπόστρωμα. Έτσι, κάποια ποσότητα της γλυκόζης χρησιμοποιείται για την παραγωγή ενέργειας από το μικροοργανισμό για την επιβίωσή του ή για την παραγωγή διαφορετικών προϊόντων μεταβολισμού. Έτσι, αν αιθανόλη που παράγεται από μια δεδομένη συγκέντρωση σακχάρων αντιστοιχεί σε μια ποσότητα με βάση το στοιχειομετρικό συντελεστή 0.511, αυτή η ποσότητα αιθανόλης θα είναι

Αποτελέσματα

μεγαλύτερη από την αιθανόλη που μετράται πειραματικά και ως απόδοση παραγωγής αιθανόλης ορίζεται:

$$\text{Απόδοση Παραγωγής Αιθανόλης} = \frac{\text{Πειραματική Μέτρηση Αιθανόλης}}{\text{Θεωρητική Παραγωγή Αιθανόλης}} * 100\%$$

Ακόμα, μπορεί να γίνει υπολογισμός απόδοσης αιθανόλης με βάση την κυτταρίνη που περιέχεται στη βιομάζα. Έτσι, η απόδοση θα συσχετίζει την αιθανόλη που μετρήθηκε με αυτήν που θα παραγόταν αν είχε υδρολυθεί όλη η κυτταρίνη που υπάρχει στη βιομάζα. Οι Zhang and Bao (2012) απέδειξαν ότι για χαμηλές συγκεντρώσεις στερεών (έως 16%) η απόδοση αυτή της αιθανόλης μπορεί να υπολογιστεί από τη σχέση:

$$\text{Ethanol Yield (\%)} = \frac{[\text{EtOH}]}{0,511 * f * [\text{biomass}] * 1,111} * 100\% \quad (1)$$

Όπου: [EtOH]: η συγκέντρωση αιθανόλης (g/L), f: το κλάσμα κυτταρίνης στη βιομάζα, [biomass]: η συγκέντρωση της βιομάζας στην εκκίνηση της ζύμωσης (g/L)

Και για υψηλές συγκεντρώσεις στερεών (μεγαλύτερες του 16%) από τη σχέση:

$$\text{Ethanol Yield (\%)} = \frac{[\text{C1}] * W}{976.9 - 0,804 * [\text{C1}]} * \frac{1}{0,511 * f * [\text{biomass}] * m * 1,111} * 100\% \quad (2)$$

Όπου [C1]: συγκέντρωση αιθανόλης μετά το τέλος της ζύμωσης (g/L), W: μάζα υγρής φάσης στο σύστημα (g), m: βάρος του συστήματος ζύμωσης στην αρχή της διεργασίας (g)

Πίνακας 7.4: Ποσοστιαία απόδοση παραγωγής αιθανόλης για συγκεντρώσεις στερεών 10%-14% κάθε χρονική στιγμή με βάση την εξίσωση (1)

Χρόνος (h)	Απόδοση παραγωγής αιθανόλης (%)		
	10%	12%	14%
8	16,8	14,8	15,2
24	40,7	42,0	43,4
48	61,1	57,8	57,5
72	61,4	58,6	61,6
96	67,0	64,8	66,1
120	64,9	64,2	66,3

Έτσι, η μέγιστη απόδοση παραγωγής αιθανόλης παρατηρείται στο τέλος της ζύμωσης για συγκέντρωση στερεών 14%.

7.2 Ζύμωση βιομάζας σε σύστημα ημιδιαλείποντος έργου

Η μέθοδος ζύμωσης σε σύστημα ημιδιαλείποντος έργου δημιουργήθηκε για να αντιμετωπιστούν κυρίως προβλήματα που προκύπτουν από τη χρήση μεγάλων συγκεντρώσεων στερεών που έχουν ως αποτέλεσμα τη σημαντική αύξηση του ιξώδους (και κατά συνέπεια προβλήματα στην ανάμειξη) και τη δημιουργία παρεμποδιστών που μπορεί να επηρεάσουν τη σωστή λειτουργία των κυτταρινολυτικών ενζύμων (όπως παρεμπόδιση από υψηλά σάκχαρα) ή των ζυμωτικών μικροοργανισμών (όπως η φουρφουράλη). Διάφοροι τύποι διεργασιών ημιδιαλείποντος έργου περιλαμβάνουν την απομάκρυνση μέρους της υγρής φάσης για πλήρη αξιοποίηση του ενζύμου της κυτταρινάσης, τεχνικές για μείωση των παρεμποδιστικών δράσεων ορισμένων ουσιών και τεχνικές ρύθμισης της τροφοδοσίας των στερεών για επίτευξη καλύτερης ανάμειξης και βελτίωση της ρεολογίας του όγκου της αντίδρασης, όπως η τεχνική που παρουσιάζεται στην παρούσα διπλωματική.

Αυτό το πείραμα περιγράφει τη ζύμωση της βιομάζας του αραβοσίτου σε σύστημα ημιδιαλείποντος έργου. Η διαφορά του συστήματος ημιδιαλείποντος έργου με το σύστημα διαλείποντος έργου είναι ότι κατά το στάδιο της προϋδρόλυσης των 12 h η συγκέντρωση των στερεών αυξανόταν σταδιακά ανά τακτά χρονικά διαστήματα μέχρι που έφτασε στα τελικά της επίπεδα στις 6 h προϋδρόλυσης. Τότε το σύστημα αφέθηκε για υδρόλυση για άλλες 6 h, οπότε και ξεκίνησε η ζύμωση από το μικροοργανισμό *S. cerevisiae*. Το πείραμα πραγματοποιήθηκε σε συγκεντρώσεις στερεών 16% w/w, 18% w/w και 20% w/w, οι οποίες συγκεντρώσεις θεωρείται ότι αντιστοιχούν σε συνθήκες ζύμωσης υψηλών στερεών (High Gravity). Για αυτό το λόγο, η προσθήκη των στερεών έγινε σταδιακά, προκειμένου να διευκολυνθεί η ενζυμική υδρόλυση και να υπάρξει μεγαλύτερη παραγωγή σακχάρων. Οι συνθήκες της διεργασίας σε συγκέντρωση ενζύμου, θερμοκρασίας και ανάδευση διατηρήθηκαν ίδιες με αυτές της ζύμωσης σε σύστημα διαλείποντος έργου σε όλα τα στάδια της διεργασίας και η δειγματοληψία πραγματοποιήθηκε στις χρονικές στιγμές: 12 h, 24 h, 48 h, 72 h, 96 h και 120 h. Η μέτρηση της αιθανόλης έγινε και εδώ με χρήση του συστήματος υγρής χρωματογραφίας υψηλής απόδοσης.

Αποτελέσματα

Πίνακας 7.5: Συγκέντρωση αιθανόλης για κάθε συγκέντρωση στερεών σε κάθε χρονική στιγμή

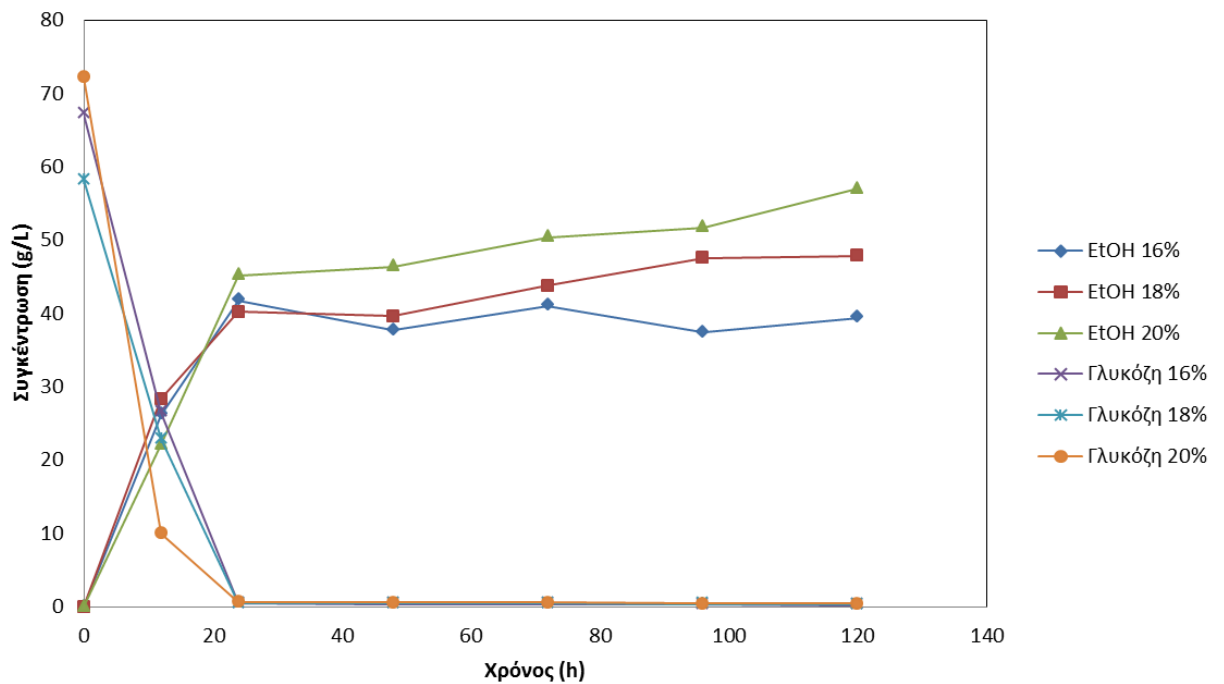
Χρόνος (h)	Συγκέντρωση αιθανόλης (g/L)		
	16%	18%	20%
12	26,2	28,3	22,2
24	41,8	40,2	45,2
48	37,8	39,7	46,5
72	41,1	43,8	50,5
96	37,4	47,6	51,8
120	39,4	47,9	57,1

Πίνακας 7.6: Συγκέντρωση γλυκόζης για κάθε συγκέντρωση στερεών σε κάθε χρονική στιγμή

Χρόνος (h)	Συγκέντρωση γλυκόζης (g/L)		
	16%	18%	20%
0	67,2	58,3	72,3
12	26,5	22,9	10,1
24	0,5	0,5	0,7
48	0,4	0,4	0,6
72	0,4	0,4	0,6
96	0,3	0,4	0,5
120	0,2	0,3	0,5

Από τις τιμές των παραπάνω πινάκων επαληθεύεται και σε αυτό το πείραμα η αύξηση και η πορεία της συγκέντρωσης της αιθανόλης και αντίστοιχα η μείωση της συγκέντρωσης της γλυκόζης. Τα παραπάνω συμπεράσματα απεικονίζονται και εποπτικά στο διάγραμμα 7.2

Ζύμωση ημιδιαλείποντος έργου- Χρόνος



Διάγραμμα 7.2: Χρονική εξέλιξη της αιθανόλης και της γλυκόζης για τη ζύμωση σε σύστημα ημιδιαλείποντος έργου

Από το παραπάνω διάγραμμα φαίνεται ότι η συγκέντρωση της αιθανόλης φτάνει σε υψηλότερα σημεία από αυτά των ζυμώσεων σε σύστημα διαλείποντος έργου για τις ίδιες συγκεντρώσεις. Ωστόσο, είναι αξιοσημείωτο το γεγονός ότι στο σύστημα ημιδιαλείποντος έργου η επίτευξη του πλατώ για τη συγκέντρωση της αιθανόλης πραγματοποιείται στις 24 h και η αύξησή της από εκεί και πέρα είναι ελάχιστη για κάθε συγκέντρωση στερεών, σε αντίθεση με το σύστημα διαλείποντος έργου όπου οι μέγιστες συγκεντρώσεις επιτυγχάνονται σε χρόνο 96 h. Αυτό το συμπέρασμα επαληθεύεται και από τις τιμές της παραγωγικότητας της αιθανόλης που απεικονίζονται στον πίνακα 7.6, οι οποίες σημειώνουν σημαντική πτώση από τη χρονική στιγμή των 24 h και μετά, τη στιγμή δηλαδή που έχει σχηματιστεί το πλατώ της συγκέντρωσης αιθανόλης.

Αποτελέσματα

Πίνακας 7.7: Παραγωγικότητα αιθανόλης για διαφορετικές συγκεντρώσεις στερεών στις διάφορες χρονικές στιγμές

Χρόνος (h)	Παραγωγικότητα αιθανόλης (g/L/h)		
	16%	18%	20%
12	2,19	2,36	1,85
24	1,74	1,68	1,88
48	0,79	0,83	0,97
72	0,57	0,61	0,70
96	0,39	0,50	0,54
120	0,33	0,40	0,48

Αντίστοιχα με το σύστημα διαλείποντος έργου, η απόδοση παραγωγής αιθανόλης υπολογίστηκε με τη χρήση της εξίσωσης (2) και παρουσιάζεται στον πίνακα 7.7.

Πίνακας 7.8: Ποσοστιαία απόδοση αιθανόλης στη ζύμωση σε σύστημα ημιδιαλείποντος έργου για κάθε χρονική στιγμή

Χρόνος (h)	Απόδοση αιθανόλης (%)		
	16%	18%	20%
12	32,1	34,8	27
24	51,9	49,9	56,3
48	46,7	49,2	57,9
72	50,9	54,5	63,1
96	46,3	59,3	64,8
120	48,8	59,8	71,7

Σε προηγούμενη έρευνά τους οι Katsimpouras, Zacharopoulou, et al. 2017 μελέτησαν τη ζύμωση σε συγκεντρώσεις στερεών αραβοσίτου 24% με χρήση αντιδραστήρα ελεύθερης πτώσης (free-fall mixer). Έδειξαν ότι για αντίδραση σε συγκέντρωση στερεών ίση με 20% με διαδικασία προϋδρόλυσης 12 h στον αντιδραστήρα ελεύθερης πτώσης η συγκέντρωση της αιθανόλης στις 12 h, 24 h και 120 h ζύμωσης ήταν 40,8 g/L, 54,2 g/L και 64,9 g/L αντίστοιχα, ενώ οι αντίστοιχες συγκεντρώσεις γλυκόζης για το σύστημα ημιδιαλείποντος έργου που εξετάστηκε ήταν 22,15 g/L, 45,22 g/L και 52,55 g/L. Τα αποτελέσματα αυτά αναδεικνύουν την εκκίνηση σχηματισμού πλατώ τη χρονική στιγμή των 24 h και για τις δύο μεθόδους, παρόλο που η μέθοδος του αντιδραστήρα ελεύθερης πτώσης οδηγεί σε μεγαλύτερες τελικές συγκεντρώσεις αιθανόλης. Αυτό συμβαίνει γιατί και οι δύο μέθοδοι εστιάζουν στην βελτιστοποίηση της ανάμειξης και της ρεολογίας της διεργασίας με σκοπό να διευκολυνθεί η υδρόλυση της κυτταρίνης και να αυξηθεί η συγκέντρωση της αιθανόλης. Οι Lei et al. (2014) πέτυχαν συγκέντρωση γλυκόζης 75,1 g/L μετά από στάδιο προϋδρόλυσης 12 h για συγκέντρωση στερεών 20% από απολιγνισμένα υπολείμματα αραβοσίτου (corn cob residue), οι Li et al. (2009), οι οποίοι πραγματοποίησαν SSF ζύμωση με σύστημα ημιδιαλείποντος έργου σε

προκατεργασμένη με φωσφορικό οξύ και ακετόνη βιομάζα, πέτυχαν συγκέντρωση αιθανόλης 55,5 g/L για ενεργότητα ενζύμου 25 FPU/g κυτταρίνης, ενώ οι Ramachandriya et al. (2013) πέτυχαν συγκέντρωση αιθανόλης 52,0 g/L από βιομάζα κόκκινου κέδρου συγκέντρωσης στερεών 20% με ενζυμικό φορτίο 31,2 FPU/g ξ. β. Παρατηρείται ότι στις περισσότερες περιπτώσεις για συγκέντρωση στερεών 20% σημειώνεται συγκέντρωση αιθανόλης από 50 έως 80 g/L, ανάλογα με τη φύση της πρώτης ύλης.

Σε αυτό το σημείο προκειμένου να εξεταστεί επακριβώς η διαφορά ανάμεσα στα συστήματα διαλείποντος και ημιδιαλείποντος έργου, πραγματοποιήθηκε πείραμα ζυμώσεων σε σύστημα διαλείποντος έργου για συγκεντρώσεις στερεών 16%, 18% και 20% για χρονικό διάστημα 24 h. Τα αποτελέσματα της συγκέντρωσης αιθανόλης σε αυτό το πείραμα παρουσιάζονται συγκεντρωτικά στον πίνακα 7.9 και παρέχουν μια πιο σαφή εικόνα για τις διαφορές ανάμεσα στα δύο συστήματα.

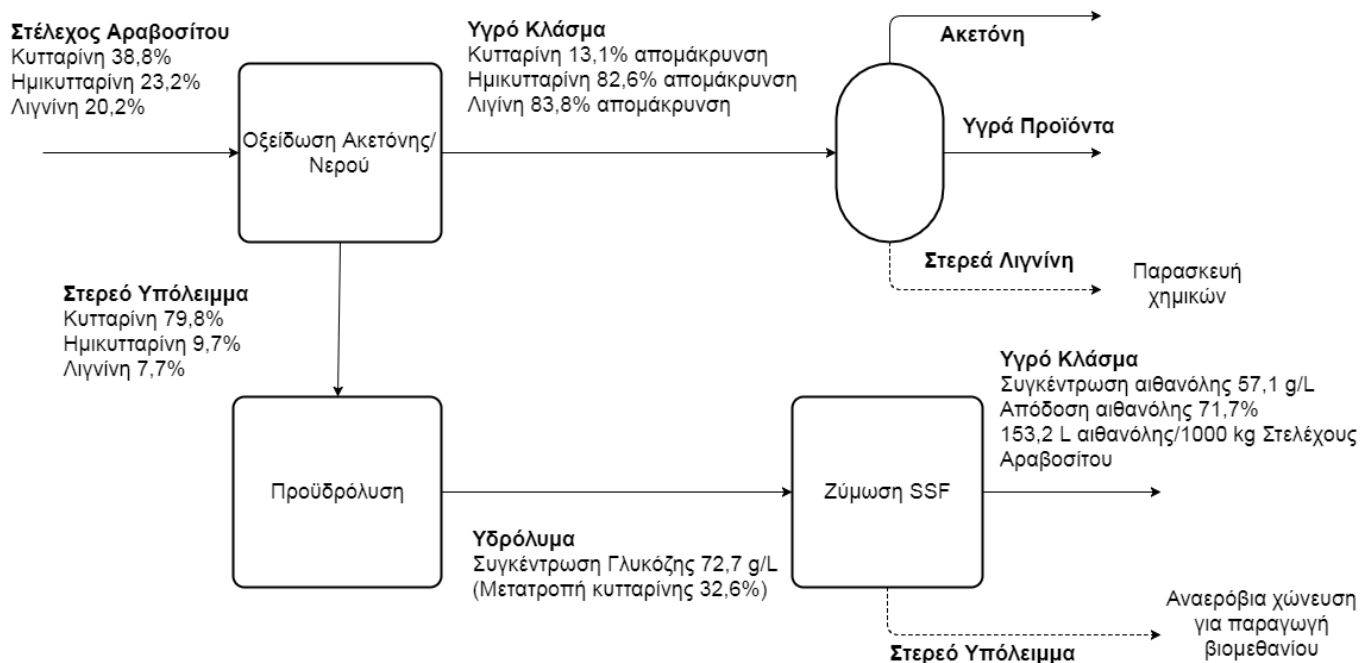
Πίνακας 7.9: Συγκεντρωτικός πίνακας αποτελεσμάτων αιθανόλης για τις 24 h

Συγκέντρωση Στερεών (%w/w)	Συγκέντρωση αιθανόλης (g/L)	Απόδοση αιθανόλης (%)	Παραγωγικότητα αιθανόλης (g/L/h)	
10	17,4	38,8	0,72	Διαλείποντος έργου
12	21,5	40,0	0,90	
14	25,9	41,4	1,08	
16	27,9	34,2	1,16	
18	33,4	35,2	1,39	
20	38,8	36,6	1,61	
16	41,8	51,9	1,74	Ημιδιαλείποντος έργου
18	40,2	49,9	1,68	
20	45,2	56,3	1,88	

Συγκεντρώνοντας όλα τα αποτελέσματα που μετρήθηκαν από όλα τα πειράματα για κάθε συγκέντρωση (πίνακας 7.9) συνάγεται το συμπέρασμα ότι η συγκέντρωση της αιθανόλης που παράγεται, αυξάνεται όσο αυξάνεται και η συγκέντρωση των στερεών ανεξάρτητα από το είδος της διεργασίας. Ακόμα, ανάμεσα στις δύο διαφορετικές διεργασίες μεγαλύτερες συγκεντρώσεις αιθανόλης για την ίδια συγκέντρωση στερεών (δείγματα συγκέντρωσης 16%-20%), μεγαλύτερη συγκέντρωση αιθανόλης εμφανίζουν τα δείγματα της διεργασίας ημιδιαλείποντος έργου. Αυτό πιθανώς να οφείλεται στο γεγονός ότι κατά το στάδιο της προϋδρόλυσης γινόταν σταδιακή τροφοδοσία με βιομάζα το οποίο συνεπάγεται καλύτερη ανάδευση, αποτελεσματικότερη υδρόλυση και κατ' επέκταση μεγαλύτερη συγκέντρωση σακχάρων. Τέλος, όπως επαληθεύτηκε από όλα τα παραπάνω διαγράμματα η διεργασία ημιδιαλείποντος έργου επιταχύνει την παραγωγή της αιθανόλης με αποτέλεσμα η επίτευξη του πλατώ να γίνεται στις 24 h, όπου η

Αποτελέσματα

συγκέντρωση της αιθανόλης ήταν αρκετά κοντά στην τελική, σε αντίθεση με τη διεργασία διαλείποντος έργου, όπου στις 24 h το πλατώ ξεκίνησε να σχηματίζεται, αλλά μέχρι το τέλος της ζύμωσης η συγκέντρωση της αιθανόλης αυξήθηκε σημαντικά. Αυτό, μπορεί να επαληθευτεί και από τις τιμές της παραγωγικότητας της αιθανόλης εκείνη τη χρονική στιγμή, οι οποίες είναι μεγαλύτερες για το σύστημα ημιδιαλείποντος έργου από αυτές του διαλείποντος έργου για τις συγκεντρώσεις στερεών 16% έως 20%.



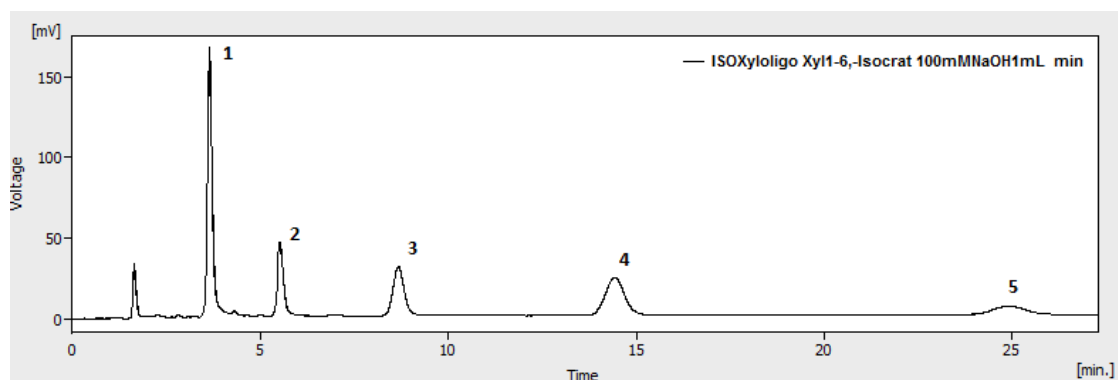
Διάγραμμα 7.3: Διάγραμμα ροής της συνολικής διεργασίας από την παραλαβή της πρώτης ύλης του αραβοσίτου μέχρι την τελική παραγωγή αιθανόλης

Σε αυτό το σημείο θα πρέπει να αναφερθεί ότι οι μετρήσεις που αναγράφονται σε όλους τους παραπάνω πίνακες για τις συγκεντρώσεις, τις παραγωγικότητες και τις αποδόσεις εμφανίζουν σφάλμα, αφού πραγματοποιήθηκαν εις διπλούν. Ωστόσο, σε κάθε περίπτωση το σφάλμα αποτέλεσε ποσοστό μικρότερο του 1% της κάθε μέτρησης, οπότε θεωρήθηκε αμελητέο και παραλείφθηκε.

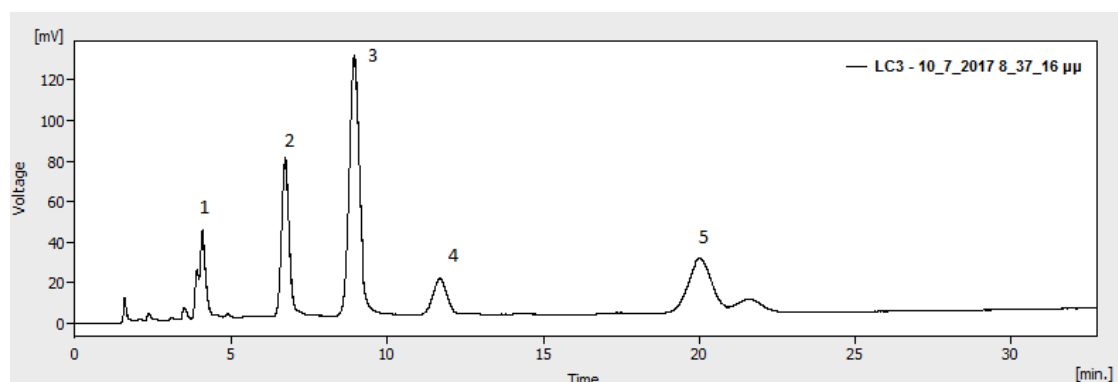
Κεφάλαιο 8: Παραγωγή ξυλοολιγοσακχαριτών

Σε αυτό το πείραμα εξετάστηκε η παραγωγή ξυλοολιγοσακχαριτών από προκατεργασμένα στελέχη αραβόσιτου με χρήση της ξυλανάσης *FoXyη* που παράχθηκε μέσω ετερόλογης έκφρασης από τον μικροοργανισμό *P. pastoris*. Συγκεκριμένα η μελέτη για την ανίχνευση των ξυλοολιγοσακχαριτών πραγματοποιήθηκε στο υπερκείμενο υγρό της αντίδρασης υδρόλυσης της βιομάζας με την ξυλανάση, το οποίο διαχωρίστηκε από το στερεό κλάσμα με διήθηση υπό κενό και αποθηκεύτηκε υπό κατάψυξη.

Ο ποιοτικός προσδιορισμός των ξυλοολιγοσακχαριτών στο υπερκείμενο υγρό της υδρόλυσης πραγματοποιήθηκε με χρήση διάταξης χρωματογραφίας εναλλαγής ανιόντων (ΗΡΑΕC), όπου εισήχθη ποσότητα 10 μ L δείγματος αραιωμένου 100 φορές για μέτρηση σε σύγκριση με πρότυπο δείγμα. Το πρότυπο δείγμα αποτελούσε μείγμα των ενώσεων ξυλόζη, ξυλοβιόζη, ξυλοτριόζη, ξυλοτετραόζη και ξυλοπεντόζη.



Διάγραμμα 8.1: Χρωματογράφημα πρότυπου δείγματος ξυλοολιγοσακχαριτών. Οι κορυφές περιγράφουν τις εξής ενώσεις: 1: ξυλόζη, 2: ξυλοβιόζη, 3: ξυλοτριόζη, 4: ξυλοτετραόζη, 5: ξυλοπεντόζη



Διάγραμμα 8.2: Χρωματογράφημα δείγματος υπερκείμενου υγρού. Οι κορυφές 1-5 περιγράφουν τις ενώσεις που βρίσκονται στο δείγμα

Αποτελέσματα

Από τα διαγράμματα 8.1 και 8.2 αν εξεταστούν οι χρόνοι των κορυφών 1-5 φαίνεται ότι είναι ίδιοι για την κορυφή 1 (4 λεπτά και στα δύο διαγράμματα) και παραπλήσιοι για τις υπόλοιπες κορυφές (Κορυφή 2: 6 και 7 λεπτά αντίστοιχα, κορυφή 3: 8 και 9 λεπτά αντίστοιχα, κορυφή 4: 14 και 12 λεπτά αντίστοιχα, κορυφή 5: 25 και 20 λεπτά αντίστοιχα). Ακόμα, φαίνεται ότι υπάρχει ένα μοτίβο που ακολουθείται για τους χρόνους κατακράτησης κάθε ουσίας και στα δύο διαγράμματα ακόμα και αν οι αποκλίσεις ανάμεσα στους χρόνους μεγαλώνουν για τις κορυφές 4 και 5. Έτσι, μπορεί να γίνει η υπόθεση ότι υπάρχουν ξυλοολιγοσακχαρίτες στο υπερκείμενο υγρό. Η απόκλιση δε των χρόνων κατακράτησης μπορεί πιθανώς να δικαιολογηθεί από το γεγονός ότι οι ξυλοολιγοσακχαρίτες του υπερκείμενου υγρού περιέχουν υποκαταστάτες, (όπως π.χ. το φερουλικό οξύ) σε αντίθεση με αυτούς του πρότυπου. Ακόμα, ένας άλλος πιθανός παράγοντας είναι οι ξυλοολιγοσακχαρίτες να μην είναι ολιγοσακχαρίτες αμιγώς της ξυλόζης αλλά να περιέχουν και διαφορετικές πεντόζες (όπως π.χ. αραβινόζη), ενώ το πρότυπο δείγμα περιέχει ολιγοσακχαρίτες που είναι ολιγομερή της ξυλόζης. Έτσι, με βάση αυτά τα δύο κριτήρια μπορεί να ερμηνευθεί η απόκλιση ανάμεσα στους χρόνους κατακράτησης για κάθε δείγμα.

Προκειμένου να επιτευχθεί ακριβέστερος προσδιορισμός των ενώσεων των δειγμάτων μπορούν να τα εξής:

1. Απομόνωση της κάθε κορυφής και αλκαλική υδρόλυση του δείγματος για σπάσιμο των δεσμών ανάμεσα στους άνθρακες της πεντόζης και τους υποκαταστάτες και επανάληψη της χρωματογραφίας.
2. Μετά την απομάκρυνση των υποκαταστατών μπορούν να πραγματοποιηθούν αντιδράσεις όξινης υδρόλυσης για τη διάσπαση του γλυκοζιδικού δεσμού ανάμεσα στα μονομερή και επανάληψη της χρωματογραφίας

Τα παραπάνω βήματα θα βοηθήσουν αφενός στην εξέταση της ύπαρξης υποκαταστατών στην αλυσίδα του ολιγομερούς, αφού μετά τη δραστηριότητα 1 αν οι ενώσεις είναι ίδιες με αυτές του προτύπου η απόκλιση στους χρόνους θα εξαληφθεί. Ακόμα, μετά τη δραστηριότητα 2 το δείγμα θα περιέχει αποκλειστικά μονοσακχαρίτες. Έτσι, αν το νέο χρωματογράφημα διαθέτει αποκλειστικά μια κορυφή σε χρόνο 4 min, τότε η μοναδική πεντόζη των ολιγοσακχαριτών είναι η ξυλόζη, ενώ αν διαθέτει και άλλες κορυφές τότε σημαίνει ότι υπάρχει και άλλος μονοσακχαρίτης (π.χ. αραβινόζη).

Οι Bowman et al. (2012) σε μελέτη τους ανίχνευσαν την ύπαρξη ξυλοολιγοσακχαριτών από switchgrass (*Panicum virgatum*) με χρήση μεθόδων υγρής χρωματογραφίας και φωτομετρίας μάζας και προσδιόρισαν τους υποκαταστάτες των πεντοζών. Οι Buruiana et al. (2017) σε μελέτη τους επαλήθευσαν και αυτοί, την ανίχνευση ξυλοολιγοσακχαριτών από στέλεχος αραβοσίτου.

ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ ΚΑΙ ΣΥΖΗΤΗΣΗ

Κεφάλαιο 9: Συμπεράσματα και συζήτηση

9.1 Σύνοψη αποτελεσμάτων – βιβλιογραφική επισκόπηση

Στην παρούσα διπλωματική εργασία μελετήθηκε στο πρώτο μέρος η παραγωγή βιοαιθανόλης από πρώτη ύλη στελέχη αραβοσίτου (Corn Stover) τα οποία είχαν υποστεί προκατεργασία υγρής οξείδωσης με μείγμα ακετόνης/νερού (AWO). Η πρώτη ύλη υπέστη ανάλυση σύστασης, ενζυμική υδρόλυση σε μικρή κλίμακα και ζύμωση σε μικρή κλίμακα για τον προσδιορισμό της σύστασης, την απελευθέρωση της γλυκόζης και την παραγωγή αιθανόλης αντίστοιχα.

Η ανάλυση σύστασης του δείγματος μετά την προκατεργασία συγκριτικά με την πρώτη ύλη, έδειξε μείωση του ποσοστού της ημικυτταρίνης και της λιγνίνης και σημαντική αύξηση του ποσοστού της κυτταρίνης. Η τελική περιεκτικότητα του υλικού σε κυτταρίνη, ημικυτταρίνη και λιγνίνη είναι 79,8%, 9,7% και 7,7% αντίστοιχα. Η απομάκρυνση της λιγνίνης υπολογίστηκε στο 83,8% και της ημικυτταρίνης στο 82,6%. Οι απομακρύνσεις αυτές επιτυγχάνουν αφ' ενός την αποδόμηση του φυσικού φράγματος που εμποδίζει την πρόσβαση των κυτταρινολυτικών ενζύμων στην κυτταρίνη και αφ' ετέρου την αποτροπή απορρόφησης των κυτταρινολυτικών ενζύμων στη μάζα της λιγνίνης (που συνεπάγεται μείωση της δράσης τους) (Kumar et al. 2009). Με αυτό τον τρόπο, διευκολύνεται η πρόσβαση των κυτταρινολυτικών ενζύμων στην κυτταρίνη και αυξάνεται η δράση τους, με αποτέλεσμα να βελτιώνεται η διεργασία της υδρόλυσης της κυτταρίνης.

Η μελέτη της ενζυμικής υδρόλυσης των στελεχών αραβοσίτου μελετήθηκε σε τρία στάδια. Στο πρώτο στάδιο, μελετήθηκε η επίδραση του ενζυμικού φορτίου στη συγκέντρωση της γλυκόζης (g/L) και στη μετατροπή της κυτταρίνης (%). Το πείραμα αυτό πραγματοποιήθηκε σε συγκέντρωση στερεών ίση με 10% w/w σε θερμοκρασία 50 °C, pH=5.0 και τα ενζυμικά φορτία ήταν 3, 6, 9, 12, 15 και 18 mg/g ξ. β. με βέλτιστο να επιλέγεται το φορτίο 9 mg/g ξ. β. βάσει αποτελεσματικότητας υδρόλυσης και χρησιμοποιούμενης ποσότητας ενζύμου. Συγκεκριμένα, βρέθηκε ότι με διπλασιασμό της ενζυμικής συγκέντρωσης (από 9 mg/g ξ. β. σε 18 mg/g ξ. β.) η τελική συγκέντρωση της γλυκόζης εμφάνισε αύξηση μόλις 4,5% (από 84,1 g/L σε 88,1 g/L). Έτσι, για εξοικονόμηση της ποσότητας του ενζύμου και μείωση του κόστους της υδρόλυσης ορίστηκε η συγκέντρωση των 9 mg/g ξ. β. ως η ιδανικότερη για τη λήψη αποδεκτών αποτελεσμάτων. Η ποσοστιαία μετατροπή της κυτταρίνης ακολούθησε παρόμοια πορεία με αυτή της γλυκόζης, αφού για συγκέντρωση ενζύμου ίση με 9 mg/g ξ. β. η μετατροπή της κυτταρίνης ήταν ίση με 85,4%, ενώ για τη διπλάσια συγκέντρωση ενζύμου 89,5%, επιβεβαιώνοντας πάλι την καταλληλότητα της χαμηλής συγκέντρωσης για το πείραμα της υδρόλυσης.

Συμπεράσματα και συζήτηση

Στο δεύτερο στάδιο, μελετήθηκε η επίδραση της συγκέντρωσης στερεών στην υδρόλυση. Οι υδρολύσεις πραγματοποιήθηκαν σε κωνικές φιάλες σε συγκεντρώσεις στερεών 8% w/w, 10% w/w, 12% w/w, 14% w/w και 16% w/w, ενώ η συγκέντρωση του ενζύμου ήταν 9 mg ενζύμου/g ξηρής βιομάζας, στις ίδιες συνθήκες με το πείραμα μελέτης ενζυμικού φορτίου. Οι μέγιστες συγκεντρώσεις γλυκόζης παρατηρήθηκαν στο τέλος της ενζυμικής υδρόλυσης με μέγιστη συγκέντρωση γλυκόζης 118,5 g/L για συγκέντρωση στερεών 16% w/w. Σε αυτό το πείραμα παρατηρήθηκε ότι η ποσοστιαία μετατροπή της κυτταρίνης μεταβάλλεται αντιστρόφως ανάλογα συγκριτικά με της συγκέντρωση των στερεών, αφού η μέγιστη μετατροπή στο τέλος της υδρόλυσης παρατηρήθηκε για συγκέντρωση στερεών 8% w/w (ίση με 86%). Αυτό πιθανώς να συμβαίνει διότι σε μεγαλύτερες συγκεντρώσεις στερεών η ανάδευση του όγκου της αντίδρασης είναι δυσκολότερη λόγω του αυξημένου ιξώδους, με αποτέλεσμα η κατανομή του ενζύμου στον όγκο της αντίδρασης να μην είναι ομοιόμορφη. Έτσι, ορισμένες περιοχές της κυτταρίνης της βιομάζας μπορεί να περιέχουν μικρότερη ποσότητα ενζύμου και να μην υδρολύονται οδηγώντας έτσι σε μικρότερα ποσοστά υδρόλυσης της κυτταρίνης. Οι (Ohgren et al. 2007) πέτυχαν απόδοση ενζυμικής υδρόλυσης 89%, σε δείγμα μετά από κατεργασία με έκρηξη ατμού στους 200° C για 10 min. Έτσι, αποδεικνύεται ότι τα ποσοστά μετατροπής της κυτταρίνης αυτής της εργασίας (που κυμαίνονται στο διάστημα 70%-90%) είναι αποδεκτά συγκριτικά με τις τιμές της βιβλιογραφίας.

Στο τρίτο στάδιο μελετήθηκε η επίδραση στην υδρόλυση της επεξεργασίας του υλικού με *FoXgn*. Το πείραμα διεξήχθη σε συγκεντρώσεις στερεών 10% και 16% για 12 h και το ενζυμικό φορτίο ήταν 28,8 mg ενζύμου/g ξ.β. και 14,4 mg ενζύμου/g ξ.β. αντίστοιχα. Η συγκέντρωση της γλυκόζης στο τέλος της αντίδρασης υπολογίστηκε σε 73,2 g/L για συγκέντρωση στερεών 10% και σε 83,6 g/L για συγκέντρωση στερεών 16%. Σε κάθε περίπτωση η ποιοτική πορεία αύξησης της συγκέντρωσης της γλυκόζης ήταν ίδια. Παρ' όλα αυτά, φαίνεται ότι στις 12 h η συγκέντρωση της γλυκόζης μετά από την επεξεργασία με *FoXgn* είναι κατά πολύ μεγαλύτερη από την αντίστοιχη συγκέντρωση γλυκόζης στο πείραμα μελέτης της συγκέντρωσης στερεών. Αυτό, πιθανώς να συμβαίνει διότι η διάσπαση της ημικυτταρίνης από την ξυλανάση οδήγησε σε απελευθέρωση μεγαλύτερου μέρους της κυτταρίνης με αποτέλεσμα η συγκέντρωση των σακχάρων να αυξηθεί. Ακόμα, παρατηρείται μια αύξηση του ποσοστού μετατροπής της κυτταρίνης μεγαλύτερη του 20% για τη συγκέντρωση στερεών του 10% w/w και 10% για τη συγκέντρωση στερεών του 16% w/w. Αυτό πιθανώς να οφείλεται στο γεγονός ότι η απομάκρυνση της ημικυτταρίνης οδήγησε σε αύξηση του ποσοστού της κυτταρίνης στο κλάσμα της βιομάζας και κατά συνέπεια στο ποσοστό μετατροπής της σε γλυκόζη.

Η μελέτη της ζύμωσης πραγματοποιήθηκε σε δύο στάδια. Στο πρώτο στάδιο πραγματοποιήθηκε ζύμωση σε σύστημα διαλείποντος έργου μετά από στάδιο προϋδρόλυσης των στελεχών αραβοσίτου για 12 h, όπου η ποσότητα του υλικού

τοποθετήθηκε εξ' ολοκλήρου στην αρχή της προϋδρόλυσης. Η ζύμωση πραγματοποιήθηκε για συγκεντρώσεις στερεών 10%, 12%, 14% για χρονικό διάστημα 120 h και η παραγωγή της αιθανόλης ακολούθησε παρόμοια ανοδική πορεία σε όλες τις περιπτώσεις και εμφάνισε πλατώ στις 72 h. Η μέγιστη παραγωγικότητα σημειώθηκε για κάθε συγκέντρωση στην αρχή της ζύμωσης και η μέγιστη συγκέντρωση αιθανόλης παρατηρήθηκε για συγκέντρωση στερεών 14% w/w ίση με 39,7 g/L. Η μέγιστη απόδοση της αιθανόλης παρατηρήθηκε για την ίδια συγκέντρωση στερεών ίση με 63,2%. Από τη μελέτη της παραγωγικότητας της αιθανόλης συνάγεται το συμπέρασμα ότι μετά τις 24 h ξεκινάει ο σχηματισμός πλατώ για τη συγκέντρωση της αιθανόλης, ενώ μετά τις 48 h οι τιμές της παραγωγικότητας είναι πολύ μικρές, γεγονός που μαρτυρά την επίτευξη του πλατώ. Αυτό μπορεί άλλωστε να επαληθευτεί και από τη συγκέντρωση της αιθανόλης μετά τις 48 h, η οποία εμφανίζει μικρή μεταβολή.

Στο δεύτερο στάδιο πραγματοποιήθηκε ζύμωση σε σύστημα ημιδιαλείποντος έργου, όπου πραγματοποιήθηκε σταδιακή εισαγωγή υλικού ανά τακτά χρονικά διαστήματα κατά το στάδιο της προϋδρόλυσης. Η μέθοδος αυτή χρησιμοποιήθηκε για την παραγωγή μεγαλύτερων συγκεντρώσεων αιθανόλης μέσω της αύξησης της συγκέντρωσης στερεών στο στάδιο της προϋδρόλυσης, αφού από τη βιβλιογραφία (Li et al. 2014) έχει βρεθεί ότι η μέθοδος του ημιδιαλείποντος έργου μπορεί να υδρολύσει μεγαλύτερες συγκεντρώσεις στερεών και να οδηγήσει σε μεγαλύτερες συγκεντρώσεις αιθανόλης. Η ζύμωση πραγματοποιήθηκε για συγκεντρώσεις στερεών 16% w/w, 18% w/w και 20% w/w για 120 h και η μέγιστη συγκέντρωση αιθανόλης ήταν 57,1 g/L για τη συγκέντρωση στερεών 20% w/w. Σε αυτό το πείραμα παρατηρήθηκε επίτευξη της τελικής συγκέντρωσης αιθανόλης σε διάστημα μόλις 24 h, γεγονός που μπορεί να οφείλεται στην καλύτερη υδρόλυση της βιομάζας (λόγω σταδιακής προσθήκης της βιομάζας και καλύτερης ανάδευσης) και τη μεγαλύτερη συγκέντρωση σακχάρων κατά το στάδιο της προϋδρόλυσης. Γι αυτό το λόγο, πραγματοποιήθηκαν ακόμα ζυμώσεις σε σύστημα διαλείποντος έργου για τις ίδιες συγκεντρώσεις στερεών (16% w/w, 18% w/w, 20% w/w) προκειμένου να εξακριβωθεί η επίδραση του συστήματος στη διεργασία. Το αποτέλεσμα ήταν ότι στις 24 h για συγκέντρωση στερεών 20% w/w (η οποία εμφάνισε τη μεγαλύτερη συγκέντρωση αιθανόλης και στις δύο περιπτώσεις) η συγκέντρωση αιθανόλης για το σύστημα διαλείποντος έργου ήταν 38,8 g/L, ενώ για το ημιδιαλείποντος έργου 45,2 g/L και οι παραγωγικότητες της αιθανόλης 1,61 g/L/h και 1,88 g/L/h αντίστοιχα. Έτσι, επαληθεύτηκε και σε αυτήν την περίπτωση ότι το σύστημα ημιδιαλείποντος έργου υπερτερεί του διαλείποντος έργου στο γεγονός ότι σε μικρότερο χρόνο εμφανίζει μεγαλύτερες συγκεντρώσεις αιθανόλης, οι οποίες μάλιστα είναι πολύ κοντά στις συγκεντρώσεις αιθανόλης στο τέλος της ζύμωσης (120 h).

Σε κάθε περίπτωση, από τη μελέτη της παραγωγικότητας της αιθανόλης στα πειράματα των ζυμώσεων, επιβεβαιώθηκε η σημασία της σωστής ανάδευσης για

Συμπεράσματα και συζήτηση

γρήγορη και αποτελεσματική ζύμωση λόγω της ουσιαστικής επίδρασής στην υδρόλυση της βιομάζας. Ακόμα, με βάση τον πίνακα 9.1 φαίνεται ότι η συγκέντρωση της αιθανόλης που επετεύχθη στο σύστημα ημιδιαλείποντος έργου για συγκέντρωση στερεών 20% και η απόδοση της αιθανόλης είναι αρκετά μεγάλες συγκριτικά με τα αποτελέσματα της βιβλιογραφίας για την ίδια συγκέντρωση στερεών και ξεπερνάει ακόμα και αποτελέσματα ζύμωσης προκατεργασμένων στελεχών αραβοσίτου για μεγαλύτερες συγκεντρώσεις στερεών, παρόλο που υιοθετήθηκε συμβατικό σύστημα ανάδευσης (κωνικές φιάλες). Έτσι, φαίνεται ότι η προκατεργασία της βιομάζας με τη μέθοδο της υγρής οξειδωσης με μείγμα ακετόνης/νερού μπορεί να οδηγήσει σε ικανοποιητικά αποτελέσματα σχετικά με την παραγωγή βιοαιθανόλης, ενώ ενδιαφέρον παρουσιάζει και η εξέταση εναλλακτικών συστημάτων ανάδευσης (όπως π.χ. αναδευτήρας ελεύθερης πτώσης) για την πραγματοποίηση της ζύμωσης που ενδεχομένως να οδηγήσει σε ακόμα μεγαλύτερες συγκεντρώσεις αιθανόλης.

Στο δεύτερο μέρος εξετάστηκε η παραγωγή ξυλοολιγοσακχαριτών από αντίδραση μεταξύ των προκατεργασμένων στελεχών αραβοσίτου και μιας ξυλανάσης της οικογένειας GH11 (*FoXyn*) του μικροοργανισμού *F. oxysporum*. Η παραγωγή του έγινε μέσω ετερόλογης έκφρασης στη μεθυλότροφη ζύμη *P. pastoris*. Μετά την παραγωγή του ενζύμου ακολούθησε μέτρηση της ενεργότητάς του η οποία υπολογίστηκε στα 120 U/mg και πραγματοποιήθηκε ενζυμική υδρόλυση της βιομάζας. Έτσι, απομονώθηκε το υπερκείμενο υγρό της υδρόλυσης και πραγματοποιήθηκε χρωματογραφία εναλλαγής ανιόντων σε αυτό. Από το χρωματογράφημα επιβεβαιώθηκε η παρουσία ξυλοολιγοσακχαριτών ποιοτικά, γεγονός το οποίο επαληθεύει τη δυνατότητα χρήσης της συγκεκριμένης ξυλανάσης για την παραγωγή τους από προκατεργασμένη βιομάζα.

Πίνακας 9.1: Συγκεντρωτικός πίνακας παραγωγής αιθανόλης από διαφορετικές προκατεργασίες

Υλικό	Προκατεργασία	Συγκέντρωση Στερεών (% w/w)	Συγκέντρωση αιθανόλης (g/L)	Απόδοση %	Αναφορά
Στέλεχος Αραβοσίτου	Οξειδωση Ακετόνης/Νερού	20	57,1	71,7	Παρούσα Εργασία
Στέλεχος αραβοσίτου	Έκρηξη ατμού	20	59,8	77,2	(Liu et al. 2014)
Στέλεχος αραβοσίτου	Υδροθερμική	24	41,9	51,3	(Katsimpour as et al. 2016)
Στέλεχος Αραβοσίτου	Έκρηξη ατμού	30	49,5	68,2	(Lu et al. 2010)
Στέλεχος αραβοσίτου	Organosolv	24	64,5	57	(Katsimpour as et al. 2017)
Άχυρο Σίτου	Έκρηξη ατμού	25	58,6	56,9	(Pablo Alvira et al. 2013)
Κόκκινος κέδρος	Όξινη θειική	20	52,0	67,6	(Ramachan driya et al. 2013)
Άχυρο Ρυζιού	Όξινη- Αλκαλική	13,8	58,7	73,4	(W.-L. Sun and Tao 2013)
Έλατο	Έκρηξη ατμού	25	47,8	72%	(Hoyer, Galbe, and Zacchi 2013)
Sweet sorghum bagasse	Υδροθερμική	18%	47,9	70,4	(Matsakas and Christakopoulos 2013)

9.2 Μελλοντικές προκλήσεις

Σε ότι αφορά στο κομμάτι των ζυμώσεων:

- Εξέλιξη μεθόδων προκατεργασίας ή συνδυασμού μεθόδων προκατεργασίας για αποτελεσματικότερη απομάκρυνση της λιγνίνης και της ημικυτταρίνης με σκοπό τη διευκόλυνση της ενζυμικής υδρόλυσης. Αυτό θα μπορούσε να οδηγήσει σε παραγωγή αιθανόλης μεγαλύτερης συγκέντρωσης, γεγονός που θα διευκόλυνε το διαχωρισμό της.
- Απομάκρυνση των παρεμποδιστών που προέρχονται από το στάδιο της προκατεργασίας και δυσχεραίνουν τη διεργασία της ζύμωσης.
- Αποτοξικοποίηση της διεργασίας με διάφορες μεθόδους για εξάλειψη των παρεμποδιστών της ζύμωσης π.χ. χρήση λακκασών για την απομάκρυνση των φαινολικών ενώσεων (Alvira et al. 2013)

Το υλικό που χρησιμοποιήθηκε στη διεργασία υπέστη πολλές πλύσεις με αποτέλεσμα απομακρυνθούν οι παρεμποδιστές στο υγρό κλάσμα της προκατεργασίας

Σε ότι αφορά στο κομμάτι παραγωγής των ξυλοολιγοσακχαριτών:

- Καθαρισμό του ενζύμου και μελέτη της συνεργιστικής δράσης του, αφού το ένζυμο χρησιμοποιήθηκε στην ακατέργαστη μορφή του
- Ταυτοποίηση των παραγόμενων ολιγοσακχαριτών και μελέτη της δυνατότητας χρήσης τους ως πρόσθετα τροφίμων (πρεβιοτικά).

ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

Βιβλιογραφία

- Aditiya, H.B. et al. 2016. "Second Generation Bioethanol Production: A Critical Review." *Renewable and Sustainable Energy Reviews* 66: 631–53.
<http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1364032116303434>.
- Agarwal, Avinash Kumar. 2007. "Biofuels (Alcohols and Biodiesel) Applications as Fuels for Internal Combustion Engines." *Progress in Energy and Combustion Science* 33(3): 233–71.
- Alberts B, Johnson A, Lewis J, et al. *Molecular Biology of the Cell*. 4th edition. New York: Garland Science; 2002. Available from:
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK21054/>
- Alvira, P., E. Tomás-Pejó, M. Ballesteros, and M. J. Negro. 2010. "Pretreatment Technologies for an Efficient Bioethanol Production Process Based on Enzymatic Hydrolysis: A Review." *Bioresource Technology* 101(13): 4851–61.
<http://dx.doi.org/10.1016/j.biortech.2009.11.093>.
- Alvira, Pablo et al. 2013. "Improving the Fermentation Performance of *Saccharomyces Cerevisiae* by Laccase during Ethanol Production from Steam-Exploded Wheat Straw at High-Substrate Loadings." *Biotechnology Progress* 29(1): 74–82. <http://dx.doi.org/10.1002/btpr.1666>.
- Avellar, Brecc K., and Wolfgang G. Glasser. 1998. "Steam-Assisted Biomass Fractionation. I. Process Considerations and Economic Evaluation." *Biomass and Bioenergy* 14(3): 205–18.
- Axelsson, Lisa et al. 2012. "Perspective: Jatropha Cultivation in Southern India: Assessing Farmers' Experiences." *Biofuels, Bioproducts and Biorefining* 6(3): 246–56.
- Balat, Mustafa. 2007. "Global Bio-Fuel Processing and Production Trends." *Energy Exploration & Exploitation* 25(3): 195–218.
<http://apps.isiknowledge.com.ezproxy.library.wisc.edu/WoS/CIW.cgi?SID=3E7mNbDhhdofh4EHIDn&Func=Abstract&doc=5/5>.
- Balat, Mustafa. 2011. "Production of Bioethanol from Lignocellulosic Materials via the Biochemical Pathway: A Review." *Energy Conversion and Management* 52(2): 858–75.
<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0196890410003791>.
- Balat, Mustafa, Havva Balat, and Cahide ??z. 2008. "Progress in Bioethanol Processing." *Progress in Energy and Combustion Science* 34(5): 551–73.
- Bone, E., A. Tamm, and M. Hill. 1976. "The Production of Urinary Phenols by Gut Bacteria and Their Possible Role in the Causation of Large Bowel Cancer." *American Journal of Clinical Nutrition* 29(12): 1448–54.
- Bowman, Michael J. et al. 2012. "Liquid Chromatography-Mass Spectrometry Investigation of Enzyme-Resistant Xylooligosaccharide Structures of Switchgrass Associated with Ammonia Pretreatment, Enzymatic Saccharification, and Fermentation." *Bioresource Technology* 110: 437–47.
<http://dx.doi.org/10.1016/j.biortech.2012.01.062>.

- Brownell, H H, E K Yu, and J N Saddler. 1986. "Steam-Explosion Pretreatment of Wood: Effect of Chip Size, Acid, Moisture Content and Pressure Drop." *Biotechnology and bioengineering* 28(6): 792–801.
- Buruiana, Cristian Teodor, Belén Gómez, Camelia Vizireanu, and Gil Garrote. 2017. "Manufacture and Evaluation of Xylooligosaccharides from Corn Stover as Emerging Prebiotic Candidates for Human Health." *LWT - Food Science and Technology* 77: 449–59.
- Cara, Cristóbal et al. 2008. "Conversion of Olive Tree Biomass into Fermentable Sugars by Dilute Acid Pretreatment and Enzymatic Saccharification." *Bioresource Technology* 99(6): 1869–76.
- Carvalho, Florbela, Luís C. Duarte, and Francisco M. Gírio. 2008. "Hemicellulose Biorefineries: A Review on Biomass Pretreatments." *Journal of Scientific and Industrial Research* 67(11): 849–64.
- Chandel, Anuj K, Silvio Silvério da Silva, and Om V Singh. 2013. "Detoxification of Lignocellulose Hydrolysates: Biochemical and Metabolic Engineering Toward White Biotechnology." *BioEnergy Research* 6(1): 388–401.
<https://doi.org/10.1007/s12155-012-9241-z>.
- Deutschmann, Rudolf, and Robert F.H. Dekker. 2012. "From Plant Biomass to Bio-Based Chemicals: Latest Developments in Xylan Research." *Biotechnology Advances* 30(6): 1627–40. <http://dx.doi.org/10.1016/j.biotechadv.2012.07.001>.
- Ebringerová, Anna. 2006. "Structural Diversity and Application Potential of Hemicelluloses." *Macromolecular Symposia* 232(2006): 1–12.
- Escobar, José C. et al. 2009. "Biofuels: Environment, Technology and Food Security." *Renewable and Sustainable Energy Reviews* 13(6–7): 1275–87.
- Galbe, M., and Guido Zacchi. 2002. "A Review of the Production of Ethanol from Softwood." *Applied Microbiology and Biotechnology* 59(6): 618–28.
- Gaurav, N. et al. 2017. "Utilization of Bioresources for Sustainable Biofuels: A Review." *Renewable and Sustainable Energy Reviews* 73(January): 205–14.
- Gibson, G R, and M B Roberfroid. 1995. "Dietary Modulation of the Human Colonic Microbiota: Introducing the Concept of Prebiotics." *The Journal of nutrition* 125(6): 1401–12.
- Gírio, F M et al. 2010. "Hemicelluloses for Fuel Ethanol: A Review." *Bioresource Technology* 101(13): 4775–4800.
<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0960852410001744>.
- Gong, C, M J Goundalkar, B M Bujanovic, and T E Amidon. 2012. "Evaluation of Different Sulfur-Free Delignification Methods for Hot-Water Extracted Hardwood." *Journal of Wood Chemistry and Technology* 32(2): 93–104.
<http://www.scopus.com/inward/record.url?eid=2-s2.0-84858251146&partnerID=40&md5=32e10f0da507c8ab35c23811fda9930e>.
- Hahn-Hagerdal, B et al. 2006. "Bio-Ethanol--the Fuel of Tomorrow from the Residues of Today." *Trends in biotechnology* 24(12): 549–56.

Βιβλιογραφία

- Hawkins, Gary M, and Joy Doran-Peterson. 2011. "A Strain of *Saccharomyces Cerevisiae* Evolved for Fermentation of Lignocellulosic Biomass Displays Improved Growth and Fermentative Ability in High Solids Concentrations and in the Presence of Inhibitory Compounds." *Biotechnology for biofuels* 4(1): 49. <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=3256112&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>.
- Hayes, Daniel J. 2009. "An Examination of Biorefining Processes, Catalysts and Challenges." *Catalysis Today* 145(1–2): 138–51.
- Hoyer, Kerstin, Mats Galbe, and Guido Zacchi. 2013. "The Effect of Prehydrolysis and Improved Mixing on High-Solids Batch Simultaneous Saccharification and Fermentation of Spruce to Ethanol." *Process Biochemistry* 48(2): 289–93. <http://dx.doi.org/10.1016/j.procbio.2012.12.020>.
- Huijgen, Wouter J J, Johannes H Reith, and Herman den Uil. 2010. "Pretreatment and Fractionation of Wheat Straw by an Acetone-Based Organosolv Process." *Industrial & Engineering Chemistry Research* 49(20): 10132–40. <http://dx.doi.org/10.1021/ie101247w>.
- Ishola, Mofoluwake M et al. 2013. "Simultaneous Saccharification, Filtration and Fermentation (SSFF): A Novel Method for Bioethanol Production from Lignocellulosic Biomass." *Bioresource Technology* 133: 68–73. <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0960852413001624>.
- Itoh, Hiromichi et al. 2003. "Bioorganosolve Pretreatments for Simultaneous Saccharification and Fermentation of Beech Wood by Ethanolysis and White Rot Fungi." *Journal of biotechnology* 103(3): 273–80.
- Jafari, Yadollah, Hamid Amiri, and Keikhosro Karimi. 2016. "Acetone Pretreatment for Improvement of Acetone, Butanol, and Ethanol Production from Sweet Sorghum Bagasse." *Applied Energy* 168: 216–25. <http://dx.doi.org/10.1016/j.apenergy.2016.01.090>.
- Katsimpouras, Constantinos, Maria Zacharopoulou, et al. 2017. "Sequential High Gravity Ethanol Fermentation and Anaerobic Digestion of Steam Explosion and Organosolv Pretreated Corn Stover." *Bioresource Technology* 244(August): 1129–36. <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0960852417314268>.
- Katsimpouras, Constantinos, Paul Christakopoulos, and Evangelos Topakas. 2016. "Acetic Acid-Catalyzed Hydrothermal Pretreatment of Corn Stover for the Production of Bioethanol at High-Solids Content." *Bioprocess and Biosystems Engineering* 39(9): 1–9.
- Katsimpouras, Constantinos, Konstantinos G Kalogiannis, Aggeliki Kalogianni, and Angelos A Lappas. 2017. "Production of High Concentrated Cellulosic Ethanol by Acetone / Water Oxidized Pretreated Beech Wood." *Biotechnology for Biofuels* 10(54): 1–16.
- Kim, Sehoon, and Mark T Holtzaple. 2005. "Lime Pretreatment and Enzymatic Hydrolysis of Corn Stover." *Bioresource technology* 96(18): 1994–2006.
- Kim, Tae Hyun, Frank Taylor, and Kevin B Hicks. 2008. "Bioethanol Production from Barley Hull Using SAA (Soaking in Aqueous Ammonia) Pretreatment."

- Bioresource technology* 99(13): 5694–5702.
- Klinke, Helene B, Birgitte K Ahring, Anette S Schmidt, and Anne Belinda Thomsen. 2002. “Characterization of Degradation Products from Alkaline Wet Oxidation of Wheat Straw.” *Bioresource technology* 82(1): 15–26.
- Kootstra, A. Maarten J, Hendrik H. Beeftink, Elinor L. Scott, and Johan P M Sanders. 2009. “Comparison of Dilute Mineral and Organic Acid Pretreatment for Enzymatic Hydrolysis of Wheat Straw.” *Biochemical Engineering Journal* 46(2): 126–31.
- Koppram, Rakesh, Elia Tomás-Pejó, Charilaos Xiros, and Lisbeth Olsson. 2014. “Lignocellulosic Ethanol Production at High-Gravity: Challenges and Perspectives.” *Trends in Biotechnology* 32(1): 46–53.
- Kumar, Gupta Praveen, Agrawal Pushpa, and Hegde Prabha. 2012. “A Review on Xylooligosaccharides.” *International Research Journal of Pharmacy* 3(8): 71–74. www.irjponline.com.
- Kumar, R. and Wyman, C. E. (2009), Cellulase adsorption and relationship to features of corn stover solids produced by leading pretreatments. *Biotechnol. Bioeng.*, 103: 252–267. doi:10.1002/bit.22258
- Kumar, Parveen, Diane M Barrett, Michael J Delwiche, and Pieter Stroeve. 2009. “Methods for Pretreatment of Lignocellulosic Biomass for Efficient Hydrolysis and Biofuel Production.” *Industrial & Engineering Chemistry Research* 48(8): 3713–29. <http://dx.doi.org/10.1021/ie801542g>.
- Larsen, J et al. 2008. “The IBUS Process – Lignocellulosic Bioethanol Close to a Commercial Reality.” *Chemical Engineering & Technology* 31(5): 765–72. <http://dx.doi.org/10.1002/ceat.200800048>.
- Lavarack, B P, G J Griffin, and D Rodman. 2002. “The Acid Hydrolysis of Sugarcane Bagasse Hemicellulose to Produce Xylose, Arabinose, Glucose and Other Products.” *Biomass and Bioenergy* 23(5): 367–80. <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0961953402000661>.
- Lei, Cheng, Jian Zhang, Lin Xiao, and Jie Bao. 2014. “An Alternative Feedstock of Corn Meal for Industrial Fuel Ethanol Production: Delignified Corncob Residue.” *Bioresource Technology* 167: 555–59. <http://dx.doi.org/10.1016/j.biortech.2014.06.005>.
- Li X, Lu J, Zhao J, Qu Y (2014) Characteristics of Corn Stover Pretreated with Liquid Hot Water and Fed-Batch Semi-Simultaneous Saccharification and Fermentation for Bioethanol Production. *PLOS ONE* 9(4): e95455. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0095455>
- Li, Hui et al. 2009. “Simultaneous Saccharification and Fermentation of Lignocellulosic Residues Pretreated with Phosphoric Acid-Acetone for Bioethanol Production.” *Bioresource Technology* 100(13): 3245–51. <http://dx.doi.org/10.1016/j.biortech.2009.01.021>.
- Li, Qiang et al. 2009. “Improving Enzymatic Hydrolysis of Wheat Straw Using Ionic Liquid 1-Ethyl-3-Methyl Imidazolium Diethyl Phosphate Pretreatment.”

Βιβλιογραφία

- Bioresource technology* 100(14): 3570–75.
- Limayem, Alya, and Steven C. Ricke. 2012. "Lignocellulosic Biomass for Bioethanol Production: Current Perspectives, Potential Issues and Future Prospects." *Progress in Energy and Combustion Science* 38(4): 449–67. <http://dx.doi.org/10.1016/j.pecs.2012.03.002>.
- Liu, Z Lewis, Patricia J Slininger, and Steve W Gorsich. 2005. "Enhanced Biotransformation of Furfural and Hydroxymethylfurfural by Newly Developed Ethanogenic Yeast Strains." *Applied biochemistry and biotechnology* 121–124: 451–60. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15917621>.
- Liu, Zhi-Hua et al. 2014. "Simultaneous Saccharification and Fermentation of Steam-Exploded Corn Stover at High Glucan Loading and High Temperature." *Biotechnology for Biofuels* 7(1): 167. <http://biotechnologyforbiofuels.biomedcentral.com/articles/10.1186/s13068-014-0167-x>.
- Lu, Yifeng et al. 2010. "Influence of High Solid Concentration on Enzymatic Hydrolysis and Fermentation of Steam-Exploded Corn Stover Biomass." *Applied Biochemistry and Biotechnology* 160(2): 360–69. <https://doi.org/10.1007/s12010-008-8306-0>.
- Martín, Carlos, Mette H. Thomsen, Henrik Hauggaard-Nielsen, and Anne Belinda Thomsen. 2008. "Wet Oxidation Pretreatment, Enzymatic Hydrolysis and Simultaneous Saccharification and Fermentation of Clover-Ryegrass Mixtures." *Bioresource Technology* 99(18): 8777–82.
- Matsakas, Leonidas, and Paul Christakopoulos. 2013. "Optimization of Ethanol Production from High Dry Matter Liquefied Dry Sweet Sorghum Stalks." *Biomass and Bioenergy* 51(0): 91–98. <http://dx.doi.org/10.1016/j.biombioe.2013.01.007>.
- Matthews, Stella. 2016. "Structural Changes of Rice Straw Pre-Treated with *Paenibacillus* and *Aspergillus Fumigatus*."
- Medronho, Bruno, and Björn Lindman. 2015. "Brief Overview on Cellulose Dissolution/regeneration Interactions and Mechanisms." *Advances in Colloid and Interface Science* 222: 502–8. <http://dx.doi.org/10.1016/j.cis.2014.05.004>.
- Mohamed, Mohamad Azuwa et al. 2017. "An Overview on Cellulose-Based Material in Tailoring Bio-Hybrid Nanostructured Photocatalysts for Water Treatment and Renewable Energy Applications." *International Journal of Biological Macromolecules* 103: 1232–56. <http://dx.doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2017.05.181>.
- Mosier, Nathan, Charles Wyman, et al. 2005. "Features of Promising Technologies for Pretreatment of Lignocellulosic Biomass." *Bioresource Technology* 96(6): 673–86.
- Mosier, Nathan, Richard Hendrickson, et al. 2005. "Optimization of pH Controlled Liquid Hot Water Pretreatment of Corn Stover." *Bioresource Technology* 96(18 SPEC. ISS.): 1986–93.
- Mussatto, Solange I., and Ismael M. Mancilha. 2007. "Non-Digestible

- Oligosaccharides: A Review." *Carbohydrate Polymers* 68(3): 587–97.
- Olsson, Lisbeth, and Bärbel Hahn-Hägerdal. 1996. "Fermentation of Lignocellulosic Hydrolysates for Ethanol Production." *Enzyme and Microbial Technology* 18(5): 312–31. <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/0141022995001573>.
- Palonen, Hetti et al. 2004. "Evaluation of Wet Oxidation Pretreatment for Enzymatic Hydrolysis of Softwood." *Applied biochemistry and biotechnology* 117(1): 1–17.
- Papatheofanous, M. G. et al. 1995. "Two-Stage Acid-Catalyzed Fractionation of Lignocellulosic Biomass in Aqueous Ethanol Systems at Low Temperatures." *Bioresource Technology* 54(3): 305–10.
- Parisutham, Vinuselvi, Tae Hyun Kim, and Sung Kuk Lee. 2014. "Feasibilities of Consolidated Bioprocessing Microbes: From Pretreatment to Biofuel Production." *Bioresource Technology* 161: 431–40. <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0960852414004192>.
- Ramachandriya, Karthikeyan D. et al. 2013. "Effect of High Dry Solids Loading on Enzymatic Hydrolysis of Acid Bisulfite Pretreated Eastern Redcedar." *Bioresource Technology* 147: 168–76. <http://dx.doi.org/10.1016/j.biortech.2013.08.048>.
- Ren, Jun-Li, and Run-Cang Sun. 2010. "Chapter 4 - Hemicelluloses BT - Cereal Straw as a Resource for Sustainable Biomaterials and Biofuels." In Amsterdam: Elsevier, 73–130. <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/B9780444532343000043>.
- Saha, Badal C., Loren B. Iten, Michael A. Cotta, and Y. Victor Wu. 2005. "Dilute Acid Pretreatment, Enzymatic Saccharification and Fermentation of Wheat Straw to Ethanol." *Process Biochemistry* 40(12): 3693–3700.
- Saini, Jitendra Kumar, Reetu Saini, and Lakshmi Tewari. 2015. "Lignocellulosic Agriculture Wastes as Biomass Feedstocks for Second-Generation Bioethanol Production: Concepts and Recent Developments." *3 Biotech* 5(4): 337–53. <http://dx.doi.org/10.1007/s13205-014-0246-5>.
- Samanta, A. K. et al. 2015. "Xylooligosaccharides as Prebiotics from Agricultural by-Products: Production and Applications." *Bioactive Carbohydrates and Dietary Fibre* 5(1): 62–71. <http://dx.doi.org/10.1016/j.bcdf.2014.12.003>.
- Da Silva, Ayla Sant Ana et al. 2010. "Milling Pretreatment of Sugarcane Bagasse and Straw for Enzymatic Hydrolysis and Ethanol Fermentation." *Bioresource Technology* 101(19): 7402–9.
- Singh, Anoop et al. 2010. "Key Issues in Life Cycle Assessment of Ethanol Production from Lignocellulosic Biomass: Challenges and Perspectives." *Bioresource Technology* 101(13): 5003–12. <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0960852409015673>.
- Singh, Ramkrishna D., Jhumur Banerjee, and Amit Arora. 2015. "Prebiotic Potential of Oligosaccharides: A Focus on Xylan Derived Oligosaccharides." *Bioactive Carbohydrates and Dietary Fibre* 5(1): 19–30. <http://dx.doi.org/10.1016/j.bcdf.2014.11.003>.

Βιβλιογραφία

- Sun, W.-L., and W.-Y. Tao. 2013. "Simultaneous Saccharification and Fermentation of Rice Straw Pretreated by a Sequence of Dilute Acid and Dilute Alkali at High Dry Matter Content." *Energy Sources, Part A: Recovery, Utilization, and Environmental Effects* 35(8): 741–52.
<http://dx.doi.org/10.1080/15567036.2010.514649>.
- Sun, Ye, and Jiayang Cheng. 2002. "Hydrolysis of Lignocellulosic Materials for Ethanol Production : A Review Q." *Bioresource technology* 83(1): 1–11.
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12058826>.
- Taha, Mohamed et al. 2016. "Commercial Feasibility of Lignocellulose Biodegradation: Possibilities and Challenges." *Current Opinion in Biotechnology* 38: 190–97. <http://dx.doi.org/10.1016/j.copbio.2016.02.012>.
- Taherzadeh, Mohammad J., and Keikhosro Karimi. 2008. 9 International Journal of Molecular Sciences *Pretreatment of Lignocellulosic Wastes to Improve Ethanol and Biogas Production: A Review*.
- Varga, Eniko, Kati Reczey, and Guido Zacchi. 2004. "Optimization of Steam Pretreatment of Corn Stover to Enhance Enzymatic Digestibility." *Applied biochemistry and biotechnology* 113–116: 509–23.
- Viikari, L., J. Vehmaanperä, and A. Koivula. 2012. "Lignocellulosic Ethanol: From Science to Industry." *Biomass and Bioenergy* 46: 13–24.
- Volynets, Bohdan, Farhad Ein-Mozaffari, and Yaser Dahman. 2017. "Biomass Processing into Ethanol: Pretreatment, Enzymatic Hydrolysis, Fermentation, Rheology, and Mixing." *Green Processing and Synthesis* 6(1): 1–22.
- Wang, Jing, Baoguo Sun, Yanping Cao, and Chengtao Wang. 2010. "Wheat Bran Feruloyl Oligosaccharides Enhance the Antioxidant Activity of Rat Plasma." *Food Chemistry* 123(2): 472–76. <http://dx.doi.org/10.1016/j.foodchem.2010.05.033>.
- Wyman, Charles E. 1999. "BIOMASS ETHANOL: Technical Progress, Opportunities, and Commercial Challenges." *Annual Review of Energy and the Environment* 24(1): 189–226. <https://doi.org/10.1146/annurev.energy.24.1.189>.
- Wyman Charles E., Dale Bruce E., Elander Richard T., Holtzapple Mark, Ladisch Michael R., Lee Y.Y. 2005. "Coordinated Development of Leading Biomass Pretreatment Technologies." *Bioresource Technology* 96(18): 1959–66.
<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0960852405000635>.
- Yang, Le, K. Seshan, and Yongdan Li. 2016. "A Review on Thermal Chemical Reactions of Lignin Model Compounds." *Catalysis Today*.
<http://dx.doi.org/10.1016/j.cattod.2016.11.030>.
- Zabed, H. et al. 2017. "Bioethanol Production from Renewable Sources: Current Perspectives and Technological Progress." *Renewable and Sustainable Energy Reviews* 71(January): 475–501. <http://dx.doi.org/10.1016/j.rser.2016.12.076>.
- Zabed, H., J. N. Sahu, A. N. Boyce, and G. Faruq. 2016. "Fuel Ethanol Production from Lignocellulosic Biomass: An Overview on Feedstocks and Technological Approaches." *Renewable and Sustainable Energy Reviews* 66: 751–74.
<http://dx.doi.org/10.1016/j.rser.2016.08.038>.

- Zhang, Jian, and Jie Bao. 2012. "A Modified Method for Calculating Practical Ethanol Yield at High Lignocellulosic Solids Content and High Ethanol Titer." *Bioresource Technology* 116: 74–79. <http://dx.doi.org/10.1016/j.biortech.2012.03.100>.
- Zhao, Xuebing, Keke Cheng, and Dehua Liu. 2009. "Organosolv Pretreatment of Lignocellulosic Biomass for Enzymatic Hydrolysis." *Applied microbiology and biotechnology* 82(5): 815–27.
- Χριστακόπουλος Π., Τόπακας Ε. 2015. *Βιοτεχνολογική Παραγωγή Βιοκαυσίμων*, Αθήνα, Εκδόσεις Ε.Μ.Π.

