



ΕΘΝΙΚΟ ΜΕΤΣΟΒΙΟ ΠΟΛΥΤΕΧΝΕΙΟ



ΣΧΟΛΗ ΧΗΜΙΚΩΝ ΜΗΧΑΝΙΚΩΝ

Τομέας Σύνθεσης και Ανάπτυξης Βιομηχανικών
Διαδικασιών (IV)

ΔΙΠΛΩΜΑΤΙΚΗ ΕΡΓΑΣΙΑ

Αξιολόγηση της κυτταρικής βιομάζας και του ενζυμικού συστήματος του μύκητα *Fusarium oxysporum* στην ενοποιημένη διεργασία παράγωγης βιοαιθανόλης από υδροθερμικά προκατεργασμένο άχυρο.

Γιαννακούλη Δήμητρα

Υπ. Καθηγητής : Παύλος Χριστακόπουλος

ΑΘΗΝΑ, 2012

Πρόλογος

Με την ολοκλήρωση της εργασίας θα ήθελα να ευχαριστήσω όλους όσοι συνέβαλλαν στην διεκπεραίωση της.

Θα ήθελα, καταρχήν, να απευθύνω τις ευχαριστίες μου στον επιβλέποντα καθηγητή της εργασίας μου κ. Χριστακόπουλο Παύλο, που με την καθοδήγηση του και τις πολύτιμες συμβουλές τους συνείσφερε ουσιαστικά στην ολοκλήρωση της παρούσας εργασίας.

Επίσης θα ήθελα να ευχαριστήσω θερμά τον Υπ. Διδάκτορα Θωμά Πάσχο και τον Διδάκτορα Χάρη Ξηρό, για τη συνεργασία τους καθ' όλη τη διάρκεια της εκπόνησης της διπλωματικής εργασίας. Η βοήθεια τους, οι γνώσεις τους, και οι συμβουλές τους ήταν καθοριστικές για την ομαλή ολοκλήρωσή της.

Τέλος, θα ήθελα να ευχαριστήσω όλους του Υπ. Διδάκτορες και τους ανθρώπους του εργαστηρίου βιοτεχνολογίας που με υποδέχτηκαν φιλικά και ήταν πάντα πρόθυμοι να συνεργαστούν και να βοηθήσουν.

Abstract

The thesis research was conducted in the Laboratory of Biotechnology, in the School of Chemical Engineering, National Technical University from March 2011 until November 2011. The purpose of this study was the development of the fungus *Fusarium oxysporum* in submerged culture reactor and the simultaneous production of *lignocellulosic* enzymes and cells and the study of the effect of the fungus in fermentation of pretreated and prohydrolysed straw (PPWS) (using enzymes or cells or both) to produce ethanol.

The development of the fungus was conducted in a submerged culture shaking bioreactor of 20 liters (16 liters operating volume). The activity of *lignocellulosic* enzymes produced by the crop was at expected levels. The aim of the prohydrolysis of wheat straw by using commercial enzymes was to break the structure of cellulose and hemicellulose of the straw and to obtain the release of sugars. By measuring the viscosity of the initial and the final mixture we commented the decrease from 10000cP to 3000 cP.

Then the fermentation of prohydrolysed straw was placed by using enzymes from the reactor and the fungus *Fusarium oxysporum*. Enzymes help to a further hydrolysis of cellulose to the yeast (*Saccharomyces cerevisiae*). *Fusarium oxysporum* has the ability to metabolise more sugar into ethanol. The results of ethanol production were satisfactory in contrast with the corresponding results of subsequent experiments based on the identical experimental procedure but instead of the enzymes from the reactor we used the cells of *Fusarium oxysporum*.

In the study of the fungus *Fusarium oxysporum* during the fermentation of PPWS using enzymes and cells, we applied the two-factor-two-level response surface analysis (Factorial Experimental Design) and we observed positive linear effects on growth and fermentation of ethanol production with the main contributor, the enzymes. This analysis is represented by the following equation:

$$\text{EtOH (g / L)} = 43,3475 + 1,3285 * \text{FPU / g DM} + 0,1179 * \text{Cells (mg / gDM)}$$

Περιεχόμενα

Πρόλογος.....	2
Abstract	3
Περιεχόμενα	4
Πίνακες.....	6
Εικόνες	6
Διαγράμματα	7
Περίληψη.....	8
Θεωρητικό Μέρος	9
ΚΕΦΑΛΑΙΟ 1: Βιοαιθανόλη.....	10
1.1 Εισαγωγή	10
1.2 Βιομάζα	10
1.3 Βιοκαύσιμα	12
1.4 Βιοαιθανόλη	15
ΚΕΦΑΛΑΙΟ 2: Παραγωγή βιοαιθανόλης	17
2.1 Γενικά	17
2.2 Άχυρο σιταριού: παραγωγή.....	18
2.3 Το άχυρο σιταριού ως πιθανή πρώτη ύλη για την 2 ^η γενιά βιοαιθανόλης.....	19
2.4 Προεπεξεργασία του αχύρου σιταριού.....	19
2.4.1 Φυσικά	20
2.4.2 Φυσικοχημικά	20
2.4.3 Χημική Προεπεξεργασία	20
2.4.5 Βιολογική προεπεξεργασία.....	21
2.5 Υδρόλυση	22
2.6 Ζύμωση.....	24
2.6.1 Μέθοδοι ζύμωσης.....	25
2.6.2 Τεχνολογίες παραγωγής αιθανόλης	26
2.7 Μελλοντικές προοπτικές – συμπεράσματα	29

Κεφάλαιο 3: Πρώτες ύλες και μικροοργανισμοί.....	31
3.1 Πρώτες ύλες για την παραγωγή αιθανόλης.....	31
3.2 Λιγνινοκυτταρινούχα υλικά.....	33
Κυτταρίνη	34
Ημικυτταρίνη.....	35
Λιγνίνη	36
3.3 Υδροθερμικά προκατεργασμένο άχυρο σίτου (hydrothermally Pretreated Wheat Straw - PWS)	38
3.3.1 Παραγωγή	38
3.3.2 Σύσταση	39
3.3.3 Χρήσεις	40
3.4 Ο μύκητας <i>Fusarium oxysporum</i>	40
Πειραματικό Μέρος	43
Κεφάλαιο 4: Υλικά και μέθοδοι.....	44
Μετρήσεις αιθανόλης.....	44
Πηγές άνθρακα	45
Χημικά και διαλύματα	45
Μικροοργανισμοί	45
Αποστείρωση.....	45
Εμβόλιο βιοαντιδραστήρα	46
Βιοαντιδραστήρας	46
Παραλαβή κυττάρων.....	47
Μέτρηση πρωτεϊνών (Lowry method).....	47
Προϋδρόλυση- Προκατεργασία αχύρου.....	48
Factorial Experimental Design.....	53
Μετρήσεις ενζυμικών ενεργοτήτων.....	54
Κεφάλαιο 5: Αποτελέσματα – Σχολιασμός	55
5.1 Ανάπτυξη του μύκητα <i>Fusarium oxysporum</i> σε βιοαντιδραστήρα βυθισμένης καλλιέργειας για την παραγωγή ενζύμων.	55
5.2 Διεργασία της προϋδρόλυσης αχύρου σίτου.....	58
5.3 Μελέτη του μύκητα <i>Fusarium oxysporum</i> στη ζύμωση του PPWS (Pro-hydrolyded Pre-treated Wheat Straw) με τη χρήση ενζύμων.....	62

5.4 Μελέτη του μύκητα <i>Fusarium oxysporum</i> στη ζύμωση του PPWS (Pro-hydrolyded Pre-treated Wheat Straw) με τη χρήση κυττάρων.....	64
5.5 Factorial Experimental Design	66
Μελέτη του μύκητα <i>Fusarium oxysporum</i> στη ζύμωση του PPWS (Pro-hydrolyded Pre-treated Wheat Straw) με τη χρήση ενζύμων και κυττάρων	66
Κεφάλαιο 6: Συμπεράσματα και Προτάσεις	69
Βιβλιογραφία.....	71

Πίνακες

Πίνακας 1: Ιδιότητες της βιοαιθανόλης.....	16
Πίνακας 2: Χρήση αιθανόλης ως καύσιμο	16
Πίνακας 3: Διαφορετικά υλικά για την παραγωγή βιοαιθανόλης και η συγκριτική τους παραγωγική δυνατότητα	32
Πίνακας 4: The coded levels for the parameters examined on the factorial design.....	53
Πίνακας 5: Αποτελέσματα από τη διαδικασία συμπύκνωσης των ενζύμων στους δύο αντιδραστήρες.....	56
Πίνακας 6: Αποτελέσματα ενζυμικού μίγματος.....	57

Εικόνες

Εικόνα 1: Οι πιο κοινές μέθοδοι προεπεξεργασίας με άχυρο σιταριού και τα πιθανά τους αποτελέσματα	21
Εικόνα 2: Τεχνολογίες παραγωγής αιθανόλης [Lynd et al. 2002]	27
Εικόνα 3: Πηγές σακχάρων για την παραγωγή αιθανόλης. 1 καλλιέργειες 2 λιγνινοκυτταρινούχα υλικά. Τα βέλη υποδεικνύουν την υδρόλυση (μόνο τα μονομερή που προκύπτουν από την υδρόλυση, και που υποδεικνύονται από τα μαύρα βέλη, μπορούν να ζυμωθούν). G γλυκόζη, Gal γαλακτόζη, F φρουκτόζη, Man μαννόζη, X ξυλόζη, Ara αραβινόζη, Other L-ραμνόζη, L- φουκόζη, ουρονικά οξέα [Zaldivar et al., 2001].....	31
Εικόνα 4 :Απεικόνιση του δευτερογενούς κυτταρικού τοιχώματος [Boudet et al., 2003].	34
Εικόνα 5:Σχεδιάγραμμα της στερεοδιάταξης της κυτταρίνης. Η δομή σταθεροποιείται με δεσμούς υδρογόνου μεταξύ γειτονικών μονάδων γλυκόζης της ίδιας αλυσίδας αλλά και μεταξύ παράλληλων αλυσίδων [Gadd, 2001].....	35

Εικόνα 6 : Σχηματική απεικόνιση της δομής της ημικυτταρίνης [Puls and Schuseil, 1993].....	36
Εικόνα 7: Σχηματική απεικόνιση της δομής της λιγνίνης [Lee, 1997].....	37
Εικόνα 8: Σχηματική παράσταση της πιλοτικής μονάδας που χρησιμοποιείται για την κατεργασία του WS [Thomsen et al., 2006].	39
Εικόνα 9: <i>Fusarium oxysporum</i>	41
Εικόνα 10:Υγρός χρωματογράφος υψηλής πίεσης (HPLC) Shimadzu	44
Εικόνα 11:Διάγραμμα παρουσίασης του αντιδραστήρα ρευστοποίησης (mixer)	50
Εικόνα 12: mixer	51
Εικόνα 13 : Το μοτέρ.....	52
Εικόνα 14: Εργαστηριακοί βιοαντιδραστήρες βυθισμένης καλλιέργειας που χρησιμοποιήθηκαν για την παραγωγή ενζύμων από τον <i>F. oxysporum</i>	56
Εικόνα 15: Άχυρο μαζί με τα εμπορικά ένζυμα και το ρυθμιστικό διάλυμα.....	58
Εικόνα 16:Λίγο πριν θέσουμε σε λειτουργία το mixer.....	59
Εικόνα 17:Κατά τη διάρκεια της διεργασίας στο διάστημα των 6h.....	59
Εικόνα 18:Κατά τη διάρκεια της διεργασίας στο διάστημα των 6h.....	60
Εικόνα 19:Στο τέλος της διεργασίας.....	60
Εικόνα 20: Η παραλαβή του μίγματος.....	61
Εικόνα 21: Effect of <i>F. oxysporum</i> cells and enzymes on ethanol production during SSF experiments (26% dry PWS). Contour Plot.....	67

Διαγράμματα

Διάγραμμα 1: Γραφική απεικόνιση των units ενζύμων που παράγονται ανά ml σε σχέση με τον χρόνο σε κάθε αντιδραστήρα.....	55
Διάγραμμα 2: Γραφική απεικόνιση των αποτελεσμάτων παραγωγής αιθανόλης (EtOH) στο πείραμα με τη χρήση ενζύμων του <i>Fusarium oxysporum</i>	62
Διάγραμμα 3: Γραφική απεικόνιση των αποτελεσμάτων παραγωγής αιθανόλης (EtOH) στο πείραμα με τη χρήση κυττάρων του <i>Fusarium oxysporum</i>	64
Διάγραμμα 4: Διάγραμμα συσχέτισης των δύο παραγόντων (cells και enzymes) στην παραγωγή αιθανόλης.....	66

Περίληψη

Η παρούσα διπλωματική εργασία εκπονήθηκε στο εργαστήριο βιοτεχνολογίας, της Σχολής Χημικών Μηχανικών του Εθνικού Μετσόβιου Πολυτεχνείου από τον Μάρτιο του 2011 έως και τον Νοέμβριο του 2011. Σκοπός της εργασίας ήταν η ανάπτυξη του μύκητα *Fusarium oxysporum* σε αντιδραστήρα βυθισμένης καλλιέργειας και η ταυτόχρονη παραγωγή λιγνινοκυτταρινολυτικών ενζύμων, η παραγωγή κυττάρων του καθώς και η μελέτη της επίδρασης του μύκητα στην ζύμωση του προϋδρολυμένου και προκατεργασμένου αχύρου (PPWS) (με τη χρήση ενζύμων ή κυττάρων ή και των δύο μαζί) για την παραγωγή αιθανόλης.

Η ανάπτυξη του μύκητα έγινε σε αναδευόμενο βιοαντιδραστήρα βυθισμένης καλλιέργειας 20 λίτρων (λειτουργικός όγκος 16 λίτρα). Οι ενεργότητες των λιγνινοκυτταρινούχων ενζύμων που παράχθηκαν από την καλλιέργεια ήταν στα αναμενόμενα επίπεδα. Πραγματοποιήθηκε προϋδρόλυση του αχύρου σιταριού με τη χρήση εμπορικών ενζύμων με σκοπό την διάσπαση της δομής της κυτταρίνης και της ημικυτταρίνης του αχύρου ώστε να επιτευχθεί η απελευθέρωση σακχάρων (ολιγοσακχαριτών). Έγινε μέτρηση του ιξώδους του αρχικού και του τελικού μίγματος και παρατηρήθηκε μείωση από τα 10000cP στα 3000 cP .

Στη συνέχεια πραγματοποιήθηκε ζύμωση του προϋδρολυμένου αχύρου με τη χρήση των ενζύμων από τον αντιδραστήρα και τον μύκητα *Fusarium oxysporum*. Τα ένζυμα βοήθησαν στην περαιτέρω υδρόλυση της κυτταρίνης ώστε η ζύμη (*Saccharomyces cerevisiae*) και ο *Fusarium oxysporum* να έχουν τη δυνατότητα να μεταβολίσουν περισσότερα σάκχαρα σε αιθανόλη. Τα αποτελέσματα παραγωγής αιθανόλης ήταν ικανοποιητικά σε αντίθεση με τα αντίστοιχα αποτελέσματα του επόμενου πειράματος που διεξήχθη με την ακριβώς ίδια πειραματική διαδικασία αλλά αντί για τα ένζυμα από τον αντιδραστήρα χρησιμοποιήθηκαν τα κύτταρα του *Fusarium oxysporum*.

Τέλος διεξήχθη η μελέτη του μύκητα *Fusarium oxysporum* στη ζύμωση του PPWS με τη χρήση ενζύμων και κυττάρων και έγινε δύο παραγόντων-δύο επιπέδων επιφανειακή ανάλυση και παρατηρήθηκε μια γραμμική θετική επίδραση στη ζύμωση και αύξηση της παραγωγής αιθανόλης με κύριο παράγοντα συμβολής σε αυτό τα ένζυμα. Αυτή η ανάλυση εκπροσωπείται από μία εξίσωση της μορφής:

$$\text{EtOH (g/L)} = 43,3475 + 1,3285 \cdot \text{FPU/g DM} + 0,1179 \cdot \text{Cells (mg/gDM)}.$$

Θεωρητικό Μέρος

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 1: Βιοαιθανόλη

1.1 Εισαγωγή

Η συνεχής χρήση των φυσικών καυσίμων έτσι ώστε να καλυφθεί η παγκόσμια ζήτηση ενέργειας, οδηγεί σε αυξημένες συγκεντρώσεις του CO₂ στην ατμόσφαιρα και κατ' επέκταση στην παγκόσμια αύξηση της θερμοκρασίας [Yu et al., 2003; Demirbas et al., 2004]. Συγκεκριμένα, η καύση των φυσικών καυσίμων είναι υπεύθυνη για το 73% της παραγωγής του CO₂, που αποτελεί το σημαντικότερο αέριο του θερμοκηπίου (GHG) [Wildenborg and Lokhorst, 2005].

Η παγκόσμια υπερθέρμανση έχει αυξήσει το ενδιαφέρον για την ανάπτυξη μεθόδων που θα μετριάσουν τις εκπομπές των αερίων του θερμοκηπίου. Ένα μεγάλο μέρος της τρέχουσας προσπάθειας να ελεγχθούν τέτοιες εκπομπές εστιάζεται στις ακόλουθες τεχνολογίες: (α) μείωση της κατανάλωσης ενέργειας, (β) αύξηση της αποδοτικότητας της ενεργειακής μετατροπής ή αξιοποίησή της, (γ) χρήση καυσίμων με μικρότερη περιεκτικότητα σε άνθρακα, (δ) ενίσχυση των φυσικών δεξαμενών για το CO₂ και (ε) συλλογή και αποθήκευση του CO₂. Η μείωση της χρήσης των φυσικών καυσίμων θα μείωνε αρκετά το ποσό του παραχθέντος CO₂, καθώς επίσης και θα μείωνε τα επίπεδα των ρύπων [Demirbas, 2006]. Δεδομένου ότι η ανησυχία για την παγκόσμια θέρμανση καθώς και οι τιμές των συμβατικών καυσίμων (κυρίως του πετρελαίου και του φυσικού αερίου) αυξάνονται, καθώς και ότι τα αποθέματα πετρελαίου είναι περιορισμένα και είναι μονοπώλιο μερικών χωρών και ο υπόλοιπος κόσμος εξαρτάται από αυτές, η αναζήτηση των ανανεώσιμων πηγών ενέργειας που μειώνουν τις εκπομπές του CO₂ αποτελεί ένα θέμα εκτεταμένης προσοχής.

1.2 Βιομάζα

Η βιομάζα έχει αναγνωριστεί ως μια σημαντική παγκόσμια ανανεώσιμη πηγή ενέργειας για να συμβάλει στην μείωση της χρήσης ορυκτών καυσίμων. Επιπλέον, εμφανίζεται να είναι ένα ελκυστικό υλικό τροφοδοσίας για τρεις κύριους λόγους. Κατ' αρχάς, είναι μια ανανεώσιμη πηγή που θα μπορούσε να αναπτυχθεί στο μέλλον. Δεύτερον, δε ρυπαίνει το περιβάλλον, καθώς δεν απελευθερώνει διοξείδιο του άνθρακα (CO₂) και έχει πολύ χαμηλή περιεκτικότητα σε θείο. Τρίτον, από οικονομικής πλευράς εμφανίζεται να είναι πιο προσιτή, από τη στιγμή που οι τιμές του ορυκτού καυσίμου αυξάνονται συνεχώς [Cadenas and Cabezudo, 1998].

Η βιομάζα, με διάφορες θερμοχημικές (πυρόλυση, αεριοποίηση, καύση) και βιοχημικές - βιολογικές (ζύμωση, αναερόβια χώνευση) διεργασίες, μετατρέπεται σε χρήσιμες μορφές ενέργειας, για την κάλυψη διαφόρων αναγκών όπως η παραγωγή ηλεκτρικής και θερμικής ενέργειας, καθώς και η παραγωγή υγρών ή αερίων καυσίμων (βιοκαυσίμων).

Γενικά, ως βιομάζα ορίζεται η ύλη που έχει βιολογική (οργανική) προέλευση. Πρακτικά, στον όρο βιομάζα εμπεριέχεται οποιοδήποτε υλικό προέρχεται άμεσα ή έμμεσα από το φυτικό κόσμο. Πιο συγκεκριμένα, σ' αυτήν περιλαμβάνονται:

- Οι φυτικές ύλες που προέρχονται είτε από φυσικά οικοσυστήματα, όπως π.χ. τα αυτοφυή φυτά και δάση, είτε από τις ενεργειακές καλλιέργειες (έτσι ονομάζονται τα φυτά που καλλιεργούνται ειδικά με σκοπό την παραγωγή βιομάζας για παραγωγή ενέργειας) γεωργικών και δασικών ειδών, όπως π.χ. το σιταρι το σόργο το σακχαρούχο, το καλάμι, ο ευκάλυπτος κ.ά.
- τα υποπροϊόντα και κατάλοιπα της φυτικής, ζωικής, δασικής και αλιευτικής παραγωγής, όπως π.χ. τα άχυρα, στελέχη αραβόσιτου, στελέχη βαμβακιάς, κλαδοδέματα, κλαδιά δένδρων, φύκη, οι κληματίδες κ.ά.
- τα υποπροϊόντα που προέρχονται από τη μεταποίηση ή επεξεργασία των υλικών αυτών, όπως π.χ. τα ελαιοπυρηνόξυλα, υπολείμματα εκκοκκισμού βαμβακιού, το πριονίδι κ.ά.
- το βιολογικής προέλευσης μέρος των αστικών λυμάτων και σκουπιδιών. Η βιομάζα αποτελεί μία δεσμευμένη και αποθηκευμένη μορφή της ηλιακής ενέργειας και είναι αποτέλεσμα της φωτοσυνθετικής δραστηριότητας των φυτικών οργανισμών.

Η βιομάζα αποτελεί μια σημαντική, ανεξάντλητη και φιλική προς το περιβάλλον πηγή ενέργειας, η οποία είναι δυνατό να συμβάλλει σημαντικά στην ενεργειακή επάρκεια, αντικαθιστώντας τα συνεχώς εξαντλούμενα αποθέματα ορυκτών καυσίμων (πετρέλαιο, άνθρακας, φυσικό αέριο κ.ά.). Η χρήση της βιομάζας ως πηγής ενέργειας δεν είναι νέα. Σ' αυτήν, εξάλλου, συγκαταλέγονται τα καυσόξυλα και οι ξυλάνθρακες που, μέχρι το τέλος του περασμένου αιώνα, κάλυπταν το 97% των ενεργειακών αναγκών της χώρας.

Η μεγάλη ευελιξία της βιομάζας ως πρώτη ύλη είναι εμφανής από το φάσμα των υλικών που μπορούν να μετατραπούν σε διάφορα στερεά, υγρά και αέρια καύσιμα που χρησιμοποιούν βιολογικές και διαδικασίες θερμοχημικής μετατροπής.

Από τη στιγμή που σχηματίζεται η βιομάζα, μπορεί πλέον κάλλιστα να χρησιμοποιηθεί ως πηγή ενέργειας.

Υπάρχει πλέον η δυνατότητα να χρησιμοποιήσουμε αποτελεσματικά τη βιομάζα για την παραγωγή σύγχρονων ενεργειακών φορέων, όπως της ηλεκτρικής ενέργειας και υγρών καυσίμων για τη βελτίωση της αναποτελεσματικότητας που συνδέεται με τα παραδοσιακά καύσιμα βιομάζας όπως το ξύλο και το κάρβουνο. Ένα πρόγραμμα παραγωγής βιομάζας για να είναι πετυχημένο θα πρέπει να είναι βιώσιμο και οικονομικά αποδεκτό, λαμβάνοντας υπόψη όλες τις δαπάνες και τα οφέλη, συμπεριλαμβανομένων των περιβαλλοντικών και υγειονομικών πτυχών.

1.3 Βιοκαύσιμα

Τα βιοκαύσιμα πρώτης γενιάς μπορεί να συμπληρώνουν τα καύσιμα, αλλά θέτουν σε κίνδυνο φυσικούς πόρους και οτιδήποτε είναι υψίστης αξίας για την ανθρώπινη ευημερία. Στην πραγματικότητα, εάν η παραγωγή και η χρήση των βιοκαυσίμων μπορεί να έχει αρνητικές ή θετικές επιπτώσεις για το περιβάλλον και την κοινωνία εξαρτάται από διάφορους αλληλένδετους παράγοντες.

Η οικονομική δραστηριότητα και η ενεργειακή απαίτηση τείνουν να αυξηθούν σημαντικά στις επόμενες δεκαετίες. Συγχρόνως η ενεργειακή ασφάλεια, η οικονομική ανάπτυξη και η προστασία του περιβάλλοντος έχουν γίνει τρία επαναλαμβανόμενα και πολύ συνδυασμένα πολιτικά θέματα. Η καύση ορυκτών καυσίμων θεωρείται ως σημαντικότερη αιτία της ανθρωπογενούς αλλαγής κλίματος που έχει σοβαρές επιπτώσεις στις εθνικές οικονομίες και τις διεθνείς αγορές. Κατά συνέπεια η ανάπτυξη ανανεώσιμων πηγών και φιλικών προς το περιβάλλον ενεργειών έχει γίνει ένα αναπόσπαστο τμήμα των στρατηγικών ενεργειών στις αναπτυσσόμενες και αναπτυσσόμενες χώρες.

Ίσως, ο πιο αμφιλεγόμενος ενεργειακός φορέας είναι η πρώτη γενιά βιοκαυσίμων, δηλ., το βιοντίζελ και η βιοαιθανόλη από τις φέρουσες συγκομιδές σακχάρων, αμύλου και ελαίου ή τα ζωικά.»

Διάφορα ζητήματα που σχετίζονται με την αειφορία των βιοκαυσίμων δείχνουν ότι τα βιοκαύσιμα πρέπει να είναι:

- καθαροί παρόχοι ενέργειας
- περιβαλλοντικά βιώσιμα
- οικονομικά ανταγωνιστικά
- και να μην ανταγωνίζονται την παραγωγή τροφίμων

Τα υγρά βιολογικά καύσιμα μπορούν να χρησιμοποιηθούν ως πρόσθετες ουσίες και σε μερικές περιπτώσεις μπορούν να αντικαταστήσουν τα συμβατικά καύσιμα μεταφορών (IEA, 2004). Τα βιολογικά καύσιμα μπορούν επίσης να χρησιμοποιηθούν και για άλλους λόγους όπως η αγροτική ηλεκτροδότηση (FAO, 2009). Οι δύο πιο κοινές μορφές υγρών βιολογικών καυσίμων είναι βιοαιθανόλη και βιοντήζελ [Alexandros Gasparatos et al.2011].

Η Βραζιλία είναι ηγέτης στην εισαγωγή των βιολογικών καυσίμων ως καύσιμα μεταφορών από τα μέσα της δεκαετίας του '70 και το πρόγραμμα pro-Alcool. Για διάφορους αλληλένδετους λόγους το βραζιλιάνο πείραμα κρίνεται ως οικονομική και ενεργειακά ασφαλής επιτυχία (π.χ., Abramovay,2008; Fischer et al., 2009) και διάφορες άλλες χώρες προσπαθούν να μιμηθούν την επιτυχία της Βραζιλίας. Αυτήν την περίοδο, διάφορες χώρες ανά τον κόσμο χρησιμοποιούν το συνδυασμό των βιολογικών καυσίμων σε διαφορετικές αναλογίες στα συμβατικά καύσιμα μεταφορών.

Η βιοαιθανόλη μπορεί να ληφθεί από τη ζύμωση των πλούσιων συγκομιδών σακχάρων ή αμύλου όπως το καλαμπόκι, το ζαχαροκάλαμο, η μανιόκα, το σακχαρότευτλο, ο σίτος και οι μελάσες [Fischer et al., 2009]. Η βιοαιθανόλη είναι κατά πολύ το πιο ευρέως παραγόμενο βιολογικό καύσιμο σε παγκόσμια κλίμακα, με το περισσότερο να παράγεται στις ΗΠΑ (από το καλαμπόκι), Βραζιλία (από το ζαχαροκάλαμο), Κίνα (από καλαμπόκι) και Ινδία (από τις μελάσες) (IEA, 2010).

Το βιοντήζελ παράγεται μέσω μετεστεροποίησης των ζωικών και φυτικών λιπών [Fischer et al., 2009] με τα πιο επικρατόντα αέρια πετροχημικής βιομηχανίας συμπεριλαμβανομένου του συναπόσπορου, σόγια, σπόρος ηλίανθων, φοίνικας, πετρέλαιο και Jatropha. Πολυάριθμοι άλλοι ελαιόσποροι είναι ή έχουν τη δυνατότητα να χρησιμοποιούνται ως αέρια πετροχημικής βιομηχανίας βιοντήζελ. Αυτήν την περίοδο ο μεγαλύτερος παραγωγός και ο καταναλωτής του βιοντήζελ είναι η ΕΕ (κυρίως από το συναπόσπορο) ενώ οι αναδυόμενοι φορείς είναι η Βραζιλία (από τη σόγια), η Αργεντινή (από τη σόγια) και η Μαλαισία/Ινδονησία (από το πετρέλαιο φοινικών). Αυτήν την περίοδο υπάρχει επίσης

ιδιαίτερη προσοχή στην παραγωγή του βιοντήζελ από *Jatropha* στην Ινδία, την Κίνα και διάφορα έθνη της νότιας Σαχάρας.

Μια βασική εκτίμηση σχετικά με τη βιωσιμότητα των βιολογικών καυσίμων είναι εάν παρέχουν τα κέρδη καθαρής ενέργειας σε σύγκριση με τα συμβατικά ορυκτά καύσιμα. Η ενεργειακή απόδοση της επένδυσης και η αποταμίευση επί τοις εκατό στην απολιθωμένη ενέργεια κατά τη διάρκεια ολόκληρου του κύκλου ζωής των βιολογικών καυσίμων θεωρούνται βασικοί δείκτες της βιωσιμότητας των βιολογικών καυσίμων.

Μια άλλη μετανάλυση [de Vries et al. (2010)] δείχνει ότι η παραγωγή βιολογικών καυσίμων από το ζαχαροκάλαμο (βιοαιθανόλη), το γλυκό σόργο (βιοαιθανόλη) και τον ελαιοφοίνικα (biodiesel) παρείχε το σημαντικό ενεργειακό κέρδος όταν συγκρίνεται με τα τυποποιημένα καύσιμα μεταφορών. Τα βιολογικά καύσιμα από το σακχαρότευτλο (βιοαιθανόλη), τη μανιόκα (βιοαιθανόλη), το συναπόσπορο (βιοντήζελ) και τη σόγια (βιοντήζελ) είχαν τα επόμενα υψηλότερα ενεργειακά κέρδη ενώ τα βιολογικά καύσιμα από το καλαμπόκι (βιοαιθανόλη) και τον σίτο (βιοαιθανόλη) εξέθεσαν τα χαμηλότερα ενεργειακά κέρδη [de Vries et al., 2010].

Ένας άλλος παράγοντας που αφορά τα βιοκαύσιμα πρώτης γενιάς είναι και το νερό. Η συνολική απαίτηση για νερό στην παραγωγή βιοκαυσίμων πρώτης γενιάς, ιδίως για τις αρδευόμενες πρώτες ύλες, είναι αρκετά μικρό σε σύγκριση με το αντίστοιχο νερό για την παραγωγή τροφίμων [Alexandros Gasparatos et al., 2011]. Ωστόσο η εξάπλωση της χρήσης βιοκαυσίμων θα μπορούσε να οδηγήσει σε αυξημένη κατανάλωση νερού (π.χ., de Fraiture et al, 2008; Berndes, 2002). Αυτό μπορεί να οδηγήσει σε ανταγωνισμό μεταξύ των τροφίμων και της παραγωγή βιοκαυσίμων όχι μόνο για τη γη και την εργασία, αλλά για το νερό.

Ταυτόχρονα η ενεργειακή ασφάλεια είναι μια από τις κύριες κινητήριες δυνάμεις της παραγωγής βιοκαυσίμων σε διάφορες περιοχές του κόσμου. Στην πραγματικότητα, πολλές χώρες φαίνεται να έχουν ξεκινήσει τα προγράμματα τους για τα βιοκαύσιμα ως απάντηση στους φόβους για την ενεργειακή ασφάλεια. Τα βιοκαύσιμα πρώτης γενιάς που είναι καθαροί πάροχοι ενέργειας μπορεί να παρέχουν μια αξιόπιστη και ανανεώσιμη πηγή ενέργειας. Η Βραζιλία είναι ένα τέτοιο παράδειγμα, όπου η βιοαιθανόλη από ζαχαροκάλαμο αποτελεί ένα σημαντικό τμήμα του συνόλου της κατανάλωσης καυσίμων για τις μεταφορές στη χώρα εν μέρει λόγω των σημαντικών κερδών της ενέργειας (IEA, 2010).

Η παραγωγή βιοκαυσίμων και η χρήση μπορεί πράγματι να επηρεάσει αρκετούς τύπους τομέων του οικοσυστήματος αρνητικά ή θετικά: (π.χ. καύσιμα, τα τρόφιμα, γλυκό νερό), (π.χ., η ρύθμιση του κλίματος, της ποιότητας των ρυθμίσεων αέρα). Την ίδια ώρα η παραγωγή βιοκαυσίμων είναι ένας παράγοντας της αγροτικής ανάπτυξης που επηρεάζει

την πρόσβαση στην ενέργεια (ενεργειακή ασφάλεια), την πρόσβαση στα τρόφιμα (επισιτιστική ασφάλεια), και την υγεία. Ως εκ τούτου η παραγωγή βιοκαυσίμων και η χρήση τους μπορεί να επηρεάσει άμεσα και έμμεσα όλες τις πτυχές της ανθρώπινης ευημερίας.

1.4 Βιοαιθανόλη

Η βιοαιθανόλη ($\text{CH}_3\text{CH}_2\text{OH}$ ή $\text{E}2\text{OH}$) είναι ένα άχρωμο διαυγές υγρό βιοκαύσιμο που μπορεί να παραχθεί από διάφορα αποθεματικά υλικά βιομάζας και τεχνολογίες μετατροπής. Η βιοαιθανόλη είναι ένα ελκυστικό εναλλακτικό καύσιμο επειδή είναι ένας ανανεώσιμος πόρος και η χρήση του μειώνει την κατανάλωση ακατέργαστου πετρελαίου και κατ' επέκταση την περιβαλλοντική ρύπανση [Lang et al., 2001].

Η χρήση της βιοαιθανόλης σαν καύσιμο έχει μια τόσο μακρά ιστορία όσο και το ίδιο το αυτοκίνητο. Άρχισε με τη χρήση της αιθανόλης στην εσωτερική μηχανή. Τα μίγματα αιθανόλης καυσίμων είναι επιτυχώς χρησιμοποιήσιμα σε όλους τους τύπους οχημάτων και μηχανών που λειτουργούν με βενζίνη. Με τις κρίσεις του πετρελαίου της δεκαετίας του '70, η αιθανόλη καθιερώθηκε ως εναλλακτικό καύσιμο [Balat, 2005]. Το 1975, μόνο $76 \cdot 10^3$ λίτρα βιομηχανικής αιθανόλης παρήχθησαν από ζύμωση συγκρινόμενη με $7.95 \cdot 10^6$ λίτρα αιθανόλης από σύνθεση [Akpan et al., 2005]. Τη δεκαετία του '80, η χρήση της βιοαιθανόλης παγκοσμίως αυξήθηκε σημαντικά.

Η βιοαιθανόλη έχει έναν υψηλό αριθμό οκτανίου, ευρύτερα όρια ευφλεκτότητας, υψηλότερη ταχύτητα φλόγας και υψηλότερες θερμοότητες εξάτμισης από ότι η βενζίνη. Αυτές οι ιδιότητες επιτρέπουν μια υψηλότερη αναλογία συμπίεσης και έναν πιο σύντομο χρόνο ανάφλεξης οι οποίες οδηγούν στα θεωρητικά πλεονεκτήματα αποδοτικότητας σε μια εσωτερική μηχανή [Balat, 2007]. Επιπλέον, η αιθανόλη έχει μια υψηλή περιεκτικότητα σε οξυγόνο που υπονοεί μικρότερη ποσότητα απαραίτητης πρόσθετης ουσίας. Το αυξημένο ποσοστό του οξυγόνου επιτρέπει μια καλύτερη οξείδωση των υδρογονανθράκων της βενζίνης με την επακόλουθη μείωση των εκπομπών του μονοξειδίου του άνθρακα και των αρωματικών ενώσεων.

Τα μειονεκτήματα της βιοαιθανόλης περιλαμβάνουν τη χαμηλότερη ενεργειακή πυκνότητα από αυτή της βενζίνης (η βιοαιθανόλη έχει 66% της ενέργειας από αυτή που έχει η βενζίνη), τη δυνατότητα οξείδωσης, τη χαμηλή φωτεινότητα φλόγας, τη χαμηλότερη πίεση ατμού (που καθιστά τις κρύες ενάρξεις των μηχανών δυσκολότερες), τη δυνατότητα ανάμιξης με το νερό, και την τοξικότητα στα οικοσυστήματα [MacLean and Lave , 2003].

Οι σημαντικότερες ιδιότητες της αιθανόλης παρουσιάζονται στον παρακάτω πίνακα:

Ιδιότητες	Αιθανόλη
Αριθμός εξαδεκανίου	8
Αριθμός οκτανίου	107
Θερμοκρασία αυτανάφλεξης (K)	606
Λανθάνουσα θερμότητα εξάτμισης (MJ/Kg)	0.91
Χαμηλή θερμοαντική αξία (MJ/Kg)	26.7
Πίνακας 1: Ιδιότητες της βιοαιθανόλης	

Πηγή: Balat, 2007

Η παραγωγή αιθανόλης έχει αυξηθεί μέσω της εφαρμογής ερευνητικών και βιομηχανικών προγραμμάτων σε πολλές χώρες τα τελευταία χρόνια (Πίνακας 2). Όλο και σημαντικότερο ποσοστό της αγροτικής παραγωγής στρέφεται στα βιοκαύσιμα στα πλαίσια μιας προσπάθειας μείωσης των εισαγωγών πετρελαίου και μείωσης της ατμοσφαιρικής ρύπανσης. Περίπου το 9% της αιθανόλης παράγεται συνθετικά, και έτσι το υπόλοιπο 91% της παγκόσμιας παραγωγής της αιθανόλης βασίζεται στη ζύμωση [Wheeler et al., 1991]. Τέλος, να σημειωθεί ότι το 73% της παραχθείσας αιθανόλης παγκοσμίως αντιστοιχεί στην αιθανόλη καυσίμων, το 17% στην αιθανόλη ποτοποιίας και το 10% στη βιομηχανική αιθανόλη.

Χώρα	Υλικό	ποσοστό αιθανόλης στο μίγμα βενζίνης %v/v
Βραζιλία	Ζαχαροκάλαμο	24
Ηνωμένες Πολιτείες	Καλαμπόκι	10
Καναδάς	Καλαμπόκι, σιτάρι, κριθάρι	7.5-10
Κολομβία	Ζαχαροκάλαμο	10
Ισπανία	Σιτάρι, κριθάρι	-
Γαλλία	καρότευτλο, σιτάρι, καλαμπόκι	-
Σουηδία	Σιτάρι	5
Κίνα	Σιτάρι, καλαμπόκι	-
Ινδία	Ζαχαροκάλαμο	5
Ταϊλάνδη	Ζαχαροκάλαμο, ρύζι	10
Πίνακας 2: Χρήση αιθανόλης ως καύσιμο		

Πηγή: Murray, 2005; Berg, 2004.

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 2: Παραγωγή βιοαιθανόλης

2.1 Γενικά

Το άχυρο σίτου είναι ένα από τα γεωργικά υπολείμματα σε αφθονία με χαμηλή εμπορική αξία. Μια εναλλακτική χρήση του άχυρου σίτου είναι η αξιοποίηση του για την παραγωγή βιοαιθανόλης. Ωστόσο, το κόστος παραγωγής με βάση την τρέχουσα τεχνολογία εξακολουθεί να είναι πολύ υψηλό και εμποδίζει την εμπορευματοποίηση της διαδικασίας. Τα τελευταία χρόνια, η πρόοδος έχει σημειωθεί στην ανάπτυξη πιο αποτελεσματικών διαδικασιών προεπεξεργασίας και υδρόλυσης του άχυρου που οδηγεί σε υψηλότερη απόδοση των σακχάρων. Με βάση τον τύπο της μέθοδου προεπεξεργασίας, μετά από ενζυματική υδρόλυση του άχυρο σίτου επιτεύχθηκε μια απόδοση ζάχαρης 74 - 99,6% της μέγιστης θεωρητικής. Διάφορα βακτήρια, ζυμομύκητες και μύκητες έχουν διερευνηθεί με αιθανόλη και η απόδοση κυμαίνεται από 65% έως 99% της θεωρητικής αξίας. Μέχρι στιγμής, τα καλύτερα αποτελέσματα όσον αφορά την απόδοση αιθανόλης, είναι με τελική συγκέντρωση και παραγωγικότητα αιθανόλης που ελήφθησαν από τη χρήση του *Saccharomyces cerevisiae*. Μερικά ανασυνδυασμένα βακτήρια και ζύμες έχουν δείξει ενθαρρυντικά αποτελέσματα και εξετάζονται σε εμπορική κλίμακα. Το άχυρο σίτου από *biorefinery* επεξεργασία θα μπορούσε να είναι η βραχυπρόθεσμη λύση για καθαρή, αποδοτική και οικονομικά εφικτή παραγωγή βιοαιθανόλης, καθώς και υψηλής προστιθέμενης αξίας προϊόντα [Farid Talebnia et al., 2009].

Η παγκόσμια ζήτηση για ενέργεια συνεχίζει να αυξάνεται λόγω της ταχείας αύξησης του ανθρώπινου πληθυσμού και την αύξηση της βιομηχανικής ευημερίας στις αναπτυσσόμενες χώρες. Η μεγάλη ενεργειακή ζήτηση εξακολουθεί να παρέχεται από τα συμβατικά ορυκτά καύσιμα όπως το πετρέλαιο, ο άνθρακας και το φυσικό αέριο. Η αξιοποίηση των ορυκτών καυσίμων κατά τη διάρκεια του περασμένου αιώνα και έπειτα έχει αυξήσει δραματικά το επίπεδο των "αερίων του θερμοκηπίου" στην ατμόσφαιρα (Ballesteros et al., 2006). Αυτά τα γεγονότα μαζί με την αναπόφευκτη μείωση του παγκόσμιου ενεργειακού εφοδιασμού, και την ασταθή αγορά πετρελαίου έχουν ενεργοποιήσει το ενδιαφέρον της κοινωνίας για αναζήτηση εναλλακτικών καυσίμων, όπως αναφέραμε. Η αιθανόλη θεωρείται ως κατάλληλη εναλλακτική λύση στα ορυκτά καύσιμα, είτε ως αποκλειστικό καύσιμο στα αυτοκίνητα με ειδικές μηχανές ή ως πρόσθετο σε μείγματα καυσίμων χωρίς απαίτηση τροποποίησης του κινητήρα (για ανάμειξη μέχρι 30%). Σήμερα, η βιοαιθανόλη είναι το κυρίαρχο βιοκαύσιμο και η παγκόσμια παραγωγή του εμφάνισε ανοδική τάση τα τελευταία 25 χρόνια με απότομη αύξηση από το 2000. Η παγκόσμια παραγωγική ικανότητα το 2005 και 2006 ήταν περίπου 45 και 49 δισεκατομμύρια λίτρα ετησίως αντίστοιχα και η συνολική παραγωγή το 2015 αναμένεται να φτάσει πάνω από 115 δισεκατομμύρια λίτρα (Licht, 2006).

Η ζάχαρη και το άμυλο προερχόμενα από υλικά όπως το ζαχαροκάλαμο και οι σπόροι είναι δύο ομάδες πρώτων υλών που χρησιμοποιούνται σήμερα ως βασικοί πόροι για την παραγωγή αιθανόλης. Η τρίτη ομάδα είναι τα λιγνοκυτταρινούχα υλικά που συνιστούν την πλέον βιώσιμη επιλογή για την παραγωγή αιθανόλης. Η αυξανόμενη ζήτηση για τρόφιμα, όπως και για ενέργεια, (λαμβάνοντας υπόψη την προτεραιότητα της ανάγκης για τρόφιμα ορισμένων υποανάπτυκτων κοινωνιών) θα μπορούσε να κάνει τις πρώτες δύο ομάδες των πρώτων υλών ενδεχομένως λιγότερο ανταγωνιστικές σε σύγκριση με τα λιγνοκυτταρινούχα υλικά (Taherzadeh και Karimi, 2007). Τα λιγνοκυτταρινούχα υλικά που προέρχονται από ενεργειακές καλλιέργειες, γεωργικά υπολείμματα και υπολείμματα ξύλου, αποτελούν την πιο "πλούσια" παγκόσμια ανανεώσιμη πηγή βιομάζας (Lin και Tanaka, 2006). Μεταξύ των γεωργικών υπολειμμάτων, το άχυρο σίτου είναι η μεγαλύτερη πρώτη ύλη βιομάζας στην Ευρώπη και η δεύτερη μεγαλύτερη στον κόσμο μετά από το άχυρο ρυζιού (Kim και Dale, 2004). Περίπου το 21% των τροφίμων στον κόσμο εξαρτάται από την καλλιέργεια σιταριού και η παγκόσμια παραγωγή της πρέπει να αυξηθεί για να ικανοποιήσει την αυξανόμενη ζήτηση της ανθρώπινης κατανάλωσης (Ortiz et al., 2008). Ως εκ τούτου, το άχυρο σίτου θα χρησιμεύσει ως ένα μεγάλο δυναμικό πρώτης ύλης για την παραγωγή αιθανόλης στην Ευρώπη του 21ου αιώνα.

2.2 Άχυρο σιταριού: παραγωγή

Το σιτάρι (*Triticum aestivum* L.) είναι η πιο ευρέως αναπτυσσόμενη καλλιέργεια, που παράγεται σε πάνω από 115 έθνη κάτω από ένα ευρύ φάσμα περιβαλλοντικών συνθηκών. Κατά τα τελευταία 100 χρόνια, οι αποδόσεις του σιταριού έχουν αυξηθεί και η ετήσια παγκόσμια παραγωγή σιταριού το 2008 εκτιμήθηκε σε πάνω από 650 Tg (Atwell, 2001). Υποθέτοντας ότι το υπόλειμμα / καλλιέργεια ετησίως παράγεται σε ποσοστό 1,3 περίπου για 850 Tg καταλοίπων σίτου.

Η παγκόσμια μέση απόδοση του σίτου είναι περίπου $2,4 \text{ Mg ha}^{-1}$ και ως εκ τούτου, περίπου 430 Tg από άχυρο σίτου ετησίως είναι διαθέσιμα για παραγωγή περίπου 120 GL βιοαιθανόλης. Αυτός ο όγκος της αιθανόλης μπορεί να αντικαταστήσει περίπου 93 (± 3) GL της βενζίνης, όταν λαμβάνονται υπόψη οι διαφορές τους σε ογκομετρικό ενεργειακό περιεχόμενο και ο αριθμός οκτανίων (Otero et al., 2007). Πολλές έρευνες έχουν δείξει ότι κάτω από σωστή μικρορύθμιση των παραμέτρων του κινητήρα, τα μίγματα αιθανόλης-βενζίνης θα οδηγήσουν σε βελτιωμένη απόδοση του κινητήρα και σε μείωση των εκπομπών διοξειδίου του άνθρακα (Bayraktar, 2005; Wu et al., 2004). Έτσι, η μετατροπή από την καύση του άχυρο σίτου σε αιθανόλη λόγω πλεονάσματος άχυρο σίτου φαίνεται να είναι μια πολλά υποσχόμενη προσέγγιση για την απόκτηση ενέργειας από υπολείμματα βιομάζας και εν μέρει μειώνει την εξάρτηση από ορυκτά καύσιμα, ενώ παράλληλα συμβάλλει στο φαινόμενο του θερμοκηπίου και τη βελτίωση της ποιότητας των αερίων της ατμόσφαιρας.

2.3 Το άχυρο σιταριού ως πιθανή πρώτη ύλη για την 2^η γενιά βιοαιθανόλης

Το άχυρο σίτου, όπως οποιαδήποτε άλλη βιομάζα λιγνοκυτταρινούχας σύνθεσης είναι ένα πολύπλοκο μίγμα από κυτταρίνη, ημικυτταρίνη και λιγνίνη, σαν τρία βασικά συστατικά μιας μικρής ποσότητας από διαλυτά υποστρώματα (γνωστά ως εκχυλίσματα) και τέφρα. Η συνολική χημική σύνθεση του σιταριού διαφέρει ελαφρώς ανάλογα με είδος του σιταριού, το έδαφος, και τις κλιματικές συνθήκες που καλλιεργείται. Το περιεχόμενο της κυτταρίνης, της ημικυτταρίνης και της λιγνίνης στο άχυρο σίτου είναι της τάξης του 33-40, 20-25, και 15-20 (% w / w) αντίστοιχα (Prasad et al., 2007). Τα στελέχη της κυτταρίνης ομαδοποιούνται και συνδέονται 'σφικτά' με τέτοιο τρόπο ώστε ούτε νερό ούτε ένζυμο να διεισδύσει μέσα στη δομή (Laureano-Perez et al, 2005; Wu et al., 2004). Η ημικυτταρίνη εξυπηρετεί στη σύνδεση μεταξύ λιγνίνης και ινών κυτταρίνης και εύκολα υδρολύεται από αραιό οξύ ή βάση και ένζυμο. Η λιγνίνη ομοιοπολικά συνδέεται με την κυτταρίνη και την ξυλάνη (κυρίαρχο πολυμερές υδατανθράκων στο άχυρο σίτου), έτσι ώστε οι αλληλεπιδράσεις μεταξύ λιγνίνης- κυτταρίνης- εξάνης να ασκούν μεγάλη επιρροή στην πεπτικότητα των λιγνοκυτταρινούχων υλικών (Laureano-Perez et al., 2005). Λόγω αυτής της πολυπλοκότητας της δομής των λιγνοκυτταρινούχων, η παραγωγή αιθανόλης από άχυρο σίτου απαιτεί τουλάχιστον τέσσερις φάσεις επεξεργασίας: την προεπεξεργασία, την υδρόλυση, την ζύμωση και την απόσταξη. Σε αντίθεση με την σακχαρόζη ή το άμυλο, η λιγνοκυτταρινούχα βιομάζα όπως το άχυρο σίτου πρέπει να είναι προεπεξεργασμένη για να «γίνει προσβάσιμη» η κυτταρίνη για τον αποτελεσματικό ενζυματικό αποπολυμερισμό.

2.4 Προεπεξεργασία του άχυρου σιταριού

Η προεπεξεργασία έχει ως στόχο να βελτιώσει το ποσοστό παραγωγής καθώς και τη συνολική απόδοση των απελευθερωμένων σακχάρων στο βήμα της υδρόλυσης (Hendriks και Zeeman, 2009). Μια σειρά από μεθόδους προεπεξεργασίας έχουν αναπτυχθεί και εφαρμόσται για το άχυρο σίτου. Η συνολική απόδοση της διαδικασίας προεπεξεργασίας συνδέεται με την καλή ισορροπία μεταξύ του σχηματισμού χαμηλών αναστολέων και της υψηλής πεπτικότητας των υποστρωμάτων. Οι προεπεξεργασίες κατατάσσονται σε δομικές, φυσικοχημικές, χημικές και βιολογικές (Εικ. 1). Οι μέθοδοι που εφαρμόζονται συνήθως χρησιμοποιούν συνδυασμό διαφόρων αρχών, όπως η μηχανική, μαζί με θερμικές και χημικές επιδράσεις προκειμένου να επιτευχθεί υψηλή απόδοση απελευθέρωσης σακχάρων, χαμηλή παραγωγή τοξικών ουσιών και χαμηλή κατανάλωση ενέργειας.

2.4.1 Φυσικά

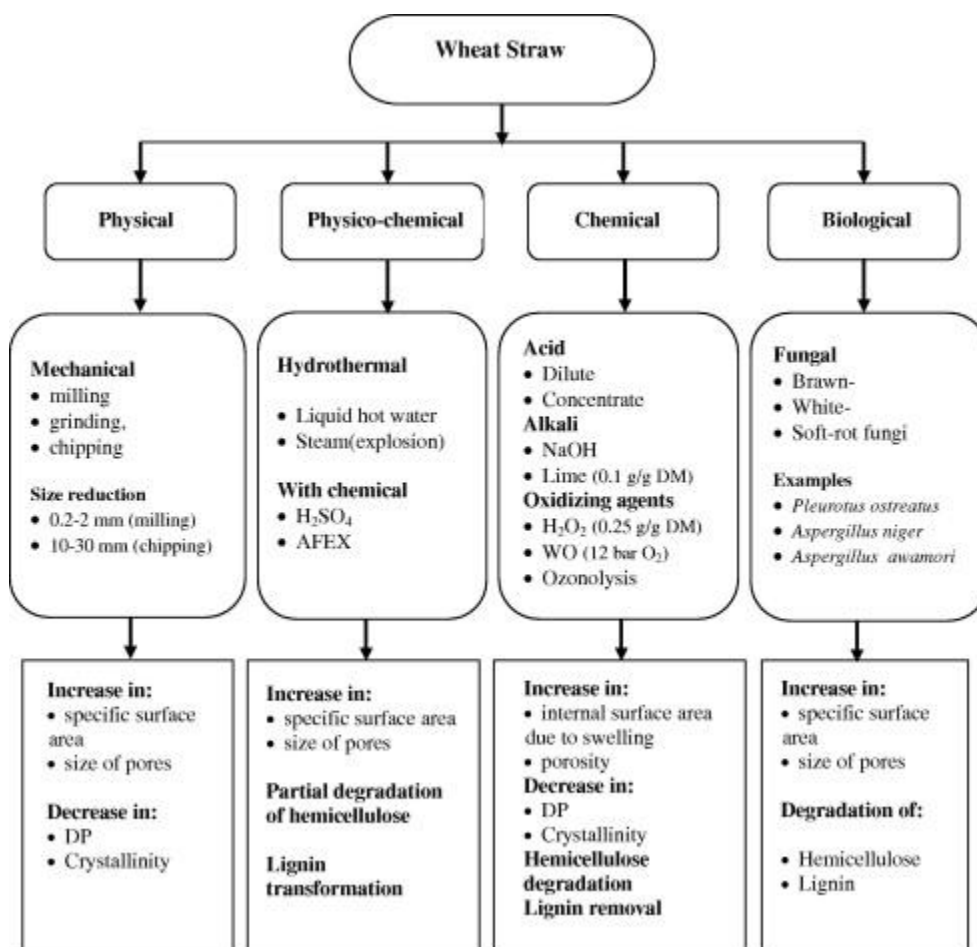
Το πρώτο βήμα στη χρήση άχυρου σίτου για την παραγωγή αιθανόλης είναι το μέγεθος μείωσης μέσω της άλεσης, της λείανσης ή του ξεφλουδίσματος (Εικ. 1) η οποία μπορεί να βελτιώσει την αποτελεσματικότητα των παρακάτω μετατροπών. Ωστόσο, η χρήση του σε πολύ μικρά σωματίδια μπορεί να μην είναι επιθυμητή λόγω της υψηλής κατανάλωσης ενέργειας κατά το στάδιο του αλέσματος όπως επίσης να έχει αρνητική επίδραση στην επόμενη μέθοδο προεπεξεργασίας. Το αρχικό και το τελικό μέγεθος των σωματιδίων, η υγρασία και οι ιδιότητες των υλικών είναι μεταξύ των μεταβλητών που επηρεάζουν τόσο την κατανάλωση ενέργειας όσο και την αποτελεσματικότητα της περαιτέρω επεξεργασίας. Το μικρότερο μέγεθος των σωματιδίων και η υψηλή υγρασία στο περιεχόμενο του άχυρου θα οδηγήσει σε υψηλότερη ενεργειακή κατανάλωση.

2.4.2 Φυσικοχημικά

Η διαλυτοποίηση των συστατικών λιγνίνης εξαρτώνται από τη θερμοκρασία, το pH και την περιεκτικότητα σε υγρασία. Σε λιγνοκυτταρινούχα υλικά όπως το άχυρο σίτου, η ημικυτταρίνη είναι το πιο θερμο-χημικό ευαίσθητο κλάσμα. Οι ενώσεις ημικυτταρίνης αρχίζουν να διαλυτοποιούνται στο νερό σε θερμοκρασία υψηλότερη από 150 °C και μεταξύ των διαφόρων μονομερών, η ξυλάνη μπορεί να εξαχθεί πιο εύκολα (Hendriks and Zeeman, 2009)(Εικ.1).

2.4.3 Χημική Προεπεξεργασία

Η χημική προεπεξεργασία του άχυρου σίτου χρησιμοποιεί διάφορες χημικές ουσίες όπως οξέα, αλκάλια και οξειδωτικά π.χ. υπεροξείδιο και όζον (Εικ.1). Μεταξύ αυτών των μεθόδων, η αραιή όξινη προεπεξεργασία χρησιμοποιεί H_2SO_4 και είναι η πιο ευρέως χρησιμοποιούμενη μέθοδος. Ανάλογα με το είδος των χρησιμοποιούμενων χημικών, η προεπεξεργασία θα μπορούσε να έχει διαφορετικά αποτελέσματα στα δομικά στοιχεία λιγνίνης. Η αλκαλική προεπεξεργασία, οζονόλυση, το υπεροξείδιο και η υγρή οξειδωτική προεπεξεργασία είναι περισσότερο αποτελεσματικές στην αφαίρεση λιγνίνης, ενώ η αραιή όξινη προεπεξεργασία είναι πιο αποτελεσματική στην διαλυτοποίηση ημικυτταρίνης (Galbe and Zacchi, 2002; Sánchez and Cardona, 2008; Tomas-Pejo et al, 2008). Ιδιαίτερη κατηγορία προεπεξεργασίας άχυρου σίτου αποτελεί η **βιολογική προεπεξεργασία**.



Εικόνα 1: Οι πιο κοινές μέθοδοι προεπεξεργασίας με άχυρο σιταριού και τα πιθανά τους αποτελέσματα

2.4.5 Βιολογική προεπεξεργασία

Η βιολογική προεπεξεργασία αποτελείται από τη χρήση μικροοργανισμών όπως οι μύκητες για επιλεκτική υποβάθμιση της λιγνίνης και της ημικυτταρίνης. Η υποβάθμιση της λιγνίνης συμβαίνει μέσω της δράσης των αντίστοιχων ενζύμων, όπως υπεροξειδάσες και laccase (Εικ.1) (Okano et al., 2005). Οι κατάλληλοι μύκητες για τη βιολογική προεπεξεργασία θα πρέπει να έχουν άμεση σχέση με τη λιγνίνη και να την υποβαθμίζουν πιο γρήγορα από ό, τι τα συστατικά υδατανθράκων. Η βιολογική προεπεξεργασία είναι ασφαλής και φιλική προς το περιβάλλον σε σύγκριση με άλλες μεθόδους προεπεξεργασίας. Ωστόσο, η ταχύτητα της αντίδρασης υδρόλυσης είναι πολύ χαμηλή και χρειάζεται μια μεγάλη βελτίωση για να είναι εμπορικά εφαρμόσιμη. Ο Hatakka (1983) διερεύνησε την προεπεξεργασία του άχυρου σίτου με 19 white-rot μύκητες και διαπίστωσε

ότι το 35% του άχυρο σίτου μετατράπηκε σε αναγωγικά σάκχαρα μετά από πέντε εβδομάδες προκατεργασίας με *Pleurotus ostreatus* (σε σύγκριση με το μόλις 12% της μετατροπής μη επεξεργασμένου άχυρο). Πέντε διαφορετικοί μύκητες αξιολογήθηκαν για την προεπεξεργασία του άχυρου σιταριού σε μια μελέτη που εκπονήθηκε από τους Patel et al.(2007). Η προεπεξεργασία με *Aspergillus niger* και *Aspergillus awamori* έδειξε τα καλύτερα αποτελέσματα όσον αφορά την απόδοση των συνολικών σακχάρων και της αιθανόλης μετά τη ζύμωση.

2.5 Υδρόλυση

Η υδρόλυση χρησιμοποιώντας τα κατάλληλα ένζυμα αποτελεί την πιο αποτελεσματική μέθοδο για να απελευθερωθούν απλά σάκχαρα από κυτταρινικές ύλες. Η υδρόλυση κυτταρίνης καταλύεται από μια κατηγορία ενζύμων που είναι γνωστά ως κυτταρινάσες. Τα ένζυμα αυτά μπορούν να παραχθούν από μύκητες, όπως ο *Trichoderma reesei* και ο *A. niger* ή βακτήρια, όπως το *Clostridium cellulovorans* (Arai et al., 2006). Οι περισσότερες έρευνες για τις εμπορική παραγωγή κυτταρινάσης έχουν επικεντρωθεί σε μύκητες, όπου η πλειοψηφία των σχετικών βακτηρίων είναι αναερόβια με πολύ χαμηλούς ρυθμούς ανάπτυξης. Τουλάχιστον τρεις μεγάλες ομάδες ενζύμων ονόματι ενδο-γλυκανάσης, εξω-γλυκανάσης και β-γλυκοσιδάση εμπλέκονται στην υδρόλυση της κυτταρίνης σε γλυκόζη και η δράση τους είναι συνεργιστική. Η ενδο-γλυκανάση επιτίθεται σε περιοχές χαμηλής κρυσταλλικότητας ινών κυτταρίνης και δημιουργεί ελεύθερα άκρα αλυσίδας. Η εξω-γλυκανάση υποβαθμίζει περαιτέρω το μόριο αφαιρώντας κομμάτια κελλοβιόζης από τις ελεύθερες άκρες της αλυσίδας, το οποίο στη συνέχεια διασπάται σε γλυκόζη από τη δράση της β-γλυκοσιδάσης. Η ενζυματική υδρόλυση μπορεί να επηρεαστεί από τις συγκεντρώσεις του υποστρώματος και του τελικού προϊόντος, την ενζυμική δραστηριότητα και τις συνθήκες αντίδρασης. Η β-γλυκοσιδάση διαδραματίζει σημαντικό ρόλο στη διαδικασία της υδρόλυσης, καθώς η κελλοβιόζη είναι ένα τελικό προϊόν αναστολέας πολλών κυτταρινασών συμπεριλαμβανομένων τόσο των εξω- όσο και των ενδο-γλυκανασών (Galbe and Zacchi, 2002; Rabinovich et al., 2002). Η β-γλυκοσιδάση, με τη σειρά της, αναστέλλεται από την γλυκόζη και η ενζυματική υδρόλυση είναι έτσι ευαίσθητη στην συγκέντρωση του υποστρώματος. Επιπλέον, η προεπεξεργασία των κυτταρινικών υλικών και οι συνθήκες υδρόλυσης όπως η θερμοκρασία και το pH είναι μεταξύ των παραγόντων που επηρεάζουν την αποτελεσματικότητα της ενζυματικής υδρόλυσης. Οι περισσότερες κυτταρινάσες παρουσιάζουν βέλτιστη δραστηριότητα σε θερμοκρασίες και pH εύρους των 45-55°C και 4-5, αντίστοιχα (Galbe και Zacchi, 2002).

Η δράση των κυτταρινολυτικών ενζύμων συμβαίνει μέσω των τριών βημάτων της προσρόφησης, της βιοαποικοδόμησης και της εκρόφησης. Η δραστηριότητα των κυτταρινουσών μειώνεται κατά την υδρόλυση και πιστεύεται ότι η μη αναστρέψιμη προσρόφηση του ενζύμου στην κυτταρίνη είναι εν μέρει υπεύθυνη για αυτή την απενεργοποίηση. Η προσθήκη των επιφανειοδραστικών ουσιών μπορεί να βελτιώσει την ενζυμική μετατροπή κυτταρίνης σε σάκχαρα μονομερών (Eriksson et al. 2002). Διάφοροι μηχανισμοί έχουν προταθεί για το θετικό αποτέλεσμα του επιφανειοδραστικού στην ενζυμική υδρόλυση. Το επιφανειοδραστικό θα μπορούσε να αλλάξει ή να τροποποιήσει τη φύση των ιδιοτήτων της επιφάνειας της κυτταρίνης, να μειώσει την μη αναστρέψιμη δέσμευση της κυτταρινάσης στην κυτταρίνη, να εμποδίσει την ενζυμική μετουσίωση. Οι μη ιονικές επιφανειοδραστικές ουσίες, όπως η Tween 20 φαίνεται να είναι οι πιο αποτελεσματικές για την ενίσχυση της ενζυμικής υδρόλυσης (Kristensen et al, 2007; Tabka et al, 2006.). Ο Kristensen et al. (2007) ερεύνησε τις επιπτώσεις των διαφόρων μη ιονικών επιφανειοδραστικών στην ενζυματική υδρόλυση σε πέντε διαφορετικούς τύπους προεπεξεργασίας άχυρου σιταριού. Όλα τα προεπεξεργασμένα δείγματα έδειξαν αυξημένη μετατροπή κυτταρίνης με την προσθήκη διαφορετικών τασιενεργών. Η μεγαλύτερη αύξηση στη μετατροπή της κυτταρίνης κατά την ενζυματική υδρόλυση ήταν 70% που λαμβάνεται με επεξεργασμένο με θειικό οξύ άχυρο και με το Berol 08 ως τασιενεργό. Η βέλτιστη συγκέντρωση επιφανειοδραστικών ήταν περίπου 0,05 g / g ξηρής μάζας και διαπιστώθηκε ότι ήταν παρόμοια, ανεξάρτητα από τον τύπο προεπεξεργασίας.

Η χρήση του ενζύμου κυτταρινάση συμπληρώνεται με άλλα ένζυμα που μπορούν να αυξήσουν το ποσοστό της ενζυματικής υδρόλυσης. Είναι γνωστό ότι η συζευγμένη δράση των κυτταρινασών και των ημικυτταρινασών οδηγεί σε υψηλότερη τελική παραγωγή σακχάρων. Το κυρίαρχο πολυμερές ημικυτταρίνης σε άχυρο σίτου είναι η ξυλάνη που αποτελείται από τη δομή D-ξυλόζης με διαφορετικές ομάδες συμπεριλαμβανομένης της L-αραβινόζης, D-γαλακτόζης, ακετυλο, feruloyl, p-coumaroyl και γλυκουρονικό οξύ υπολειμμάτων (Mazeau et al., 2005).

Συνοψίζοντας τα καλύτερα αποτελέσματα όσον αφορά την απόδοση γλυκόζης, ελήφθησαν αυτά με το μίγμα από κυτταρίνη, ξυλανάση και FAE σε 50°C ανακτώντας το 81% του μέγιστου ποσού της γλυκόζης. Η ενζυμική σακχαροποίηση του προεπεξεργασμένου άχυρου σίτου που χρησιμοποιεί διαφορετικές μεθόδους ήταν ικανοποιητική όσον αφορά την απόδοση των σακχάρων. Ένα μίγμα από μύκητες και ένζυμα κυτταρινάσης και β-γλυκοσιδάσης φαίνεται να είναι αρκετό για την αποτελεσματική σακχαροποίηση του άχυρου σίτου μετά από προεπεξεργασία σε χαμηλό pH. Η προσθήκη ενζύμου ημικυτταρινασών (ξυλανάση) θα μπορούσε να βελτιώσει τις τελικές αποδόσεις των σακχάρων, όπου σημαντικό μέρος της ημικυτταρίνης παραμένει σε

στερεό υπόλειμμα ή με τη μορφή των διαλυτών ολιγομερών μετά από προεπεξεργασία σε υψηλές τιμές pH.

2.6 Ζύμωση

Ένας σημαντικός παράγοντας που αποτρέπει τη βιομηχανική χρήση λιγνίνης για την παραγωγή βιοαιθανόλης είναι η αδυναμία των μικροοργανισμών να ζυμώσουν αποτελεσματικά (με υψηλή απόδοση και υψηλό ποσοστό) το σύνολο των σακχάρων που απελευθερώνονται κατά τη διάρκεια της προεπεξεργασίας και της υδρόλυσης. Όσον αφορά την εμπορική παραγωγή αιθανόλης, ο ιδανικός μικροοργανισμός πρέπει να έχει ευρεία χρήση υποστρώματος, υψηλή απόδοση και παραγωγικότητα αιθανόλης, την ανοχή στους αναστολείς, την κυτταρινολυτική δραστηριότητα και την ικανότητα για τη ζύμωση της ζάχαρης σε υψηλές θερμοκρασίες (Hahn-Hagerdal et al., 2007). Οι πιο γνωστοί μικροοργανισμοί για την παραγωγή αιθανόλης από εξόζες είναι ο σακχαρομύκητας *Saccharomyces cerevisiae* και το βακτήριο *Zymomonas mobilis* (Claassen et al., 1999) προσφέροντας υψηλές αποδόσεις αιθανόλης (90 - 97% της θεωρητικής) και υψηλής ανοχής σε αιθανόλη μέχρι περίπου 10% (w / v) σε μέσο ζύμωσης. Η απόδοση αιθανόλης του 99% με βάση την αρχική συγκέντρωση της γλυκόζης, λήφθηκε πρόσφατα με το μητρικό στέλεχος *S. cerevisiae*. (Jorgensen, 2009). Κύριο μειονέκτημα των γηγενών στελεχών του *S. cerevisiae* και *Z. Mobilis* είναι η αδυναμία τους να χρησιμοποιήσουν την ξυλόζη, το κύριο C5 σάκχαρο που προέρχεται από την ημικυτταρίνη. Άλλοι γνωστοί μικροοργανισμοί που ζυμώνουν ξυλόζη σε αιθανόλη, όπως τα εντερικά βακτήρια και οι *Pichia stipitis*, *Candida shehatae*, and *Pachysolen tannophilus* (Chandel et al., 2007; Lin and Tanaka, 2006) χαρακτηρίζονται από χαμηλές αποδόσεις αιθανόλης και την τάση τους να αφομοιώσουν εκ νέου την παραγωγή αιθανόλης (Karakashev et al., 2007). Για να ξεπεραστεί αυτό το μειονέκτημα, έχουν αναπτυχθεί τα γενετικά τροποποιημένα στελέχη του *S. Cerevisiae* που μπορούν να ζυμώσουν και τα δύο, εξόζες και πεντόζες (Karhumaa et al., 2007). Ωστόσο, τα στελέχη, έδειξαν χαμηλή παραγωγικότητα σε σχέση με τη μετατροπή ξυλόζης σε αιθανόλη (Watanabe et al., 2007).

Λαμβάνοντας υπόψη τα οφέλη από τη διαδικασία ζύμωσης σε υψηλές θερμοκρασίες συμπεριλαμβανομένων και υψηλών ρυθμών παραγωγής, την ευκολότερη ανάκτηση των προϊόντων, τη χρήση ενός ευρέος φάσματος υποστρωμάτων και του χαμηλού κινδύνου μόλυνσης έχει προταθεί η ζύμωση αιθανόλης με διάφορα αυστηρά αναερόβια θερμοφιλά βακτήρια, όπως το *Clostridium* sp. και *Thermoanaerobacter* sp. Η ζύμωση αιθανόλης από υδρολυμένο άχυρο σίτου ως πρώτη ύλη έχει μελετηθεί ευρέως με διαφορετικούς μικροοργανισμούς, όπως ζύμες, βακτήρια και μύκητες, *P. stipitis*, της *Kluyveromyces marxianus* (Tomas-Pejoet al., 2009) και ανασυνδυασμένα στελέχη της *S. cerevisiae* (Panagiotou και Olsson, 2007). Μέχρι στιγμής τα καλύτερα αποτελέσματα σε σχέση με την

απόδοση αιθανόλης είναι με τους μη προσαρμοσμένους ζυμομύκητες. Τέλος, έχουν επίσης υπόψη για την παραγωγή αιθανόλης, τα ανασυνδυασμένα βακτήρια με διαγραφές των γονιδίων που ευθύνονται για την παραγωγή των υποπροϊόντων [Farid Talebnia et al., 2009].

2.6.1 Μέθοδοι ζύμωσης

Η βυθισμένη (Submerged) ζύμωση θεωρείται ο πιο οικονομικός τρόπος για την παραγωγή εξωκυτταρικών ενζύμων [Kapich et al. 2004], και ίσως για αυτό το λόγο, το 90% περίπου της βιομηχανικής παραγωγής πραγματοποιείται με αυτό τον τρόπο [Hölker et al. 2004]. Μια άλλη μέθοδος είναι η ζύμωση στερεάς κατάστασης (Solid State Fermentation), στην οποία η ζύμωση ενός στερεού υποστρώματος πραγματοποιείται σε χαμηλά επίπεδα υγρασίας ή δραστηριότητας νερού [Shuler and Kargi 2005], σε αντίθεση με την βυθισμένη ζύμωση, συνθήκες που ευνοούν ιδιαίτερα την ανάπτυξη των μυκήτων [Lee 1997, Haltrich et al. 1996]. Η μέθοδος αυτή αν και έχει πολλά πλεονεκτήματα οικονομικής και οικολογικής σημασίας συγκριτικά με την βυθισμένη ζύμωση, έχει χρησιμοποιηθεί σε πολύ μικρό βαθμό μέχρι τώρα, λόγω κάποιων προβλημάτων που προκύπτουν κατά τη διάρκεια της διεργασίας, όπως η σταδιακή ανάπτυξη βαθμίδων θερμοκρασίας, pH, υγρασίας, συγκέντρωσης υποστρώματος ή pO_2 , που είναι δύσκολο να ρυθμιστούν υπό συνθήκες περιορισμένης διαθεσιμότητας νερού [Hölker et al. 2004].

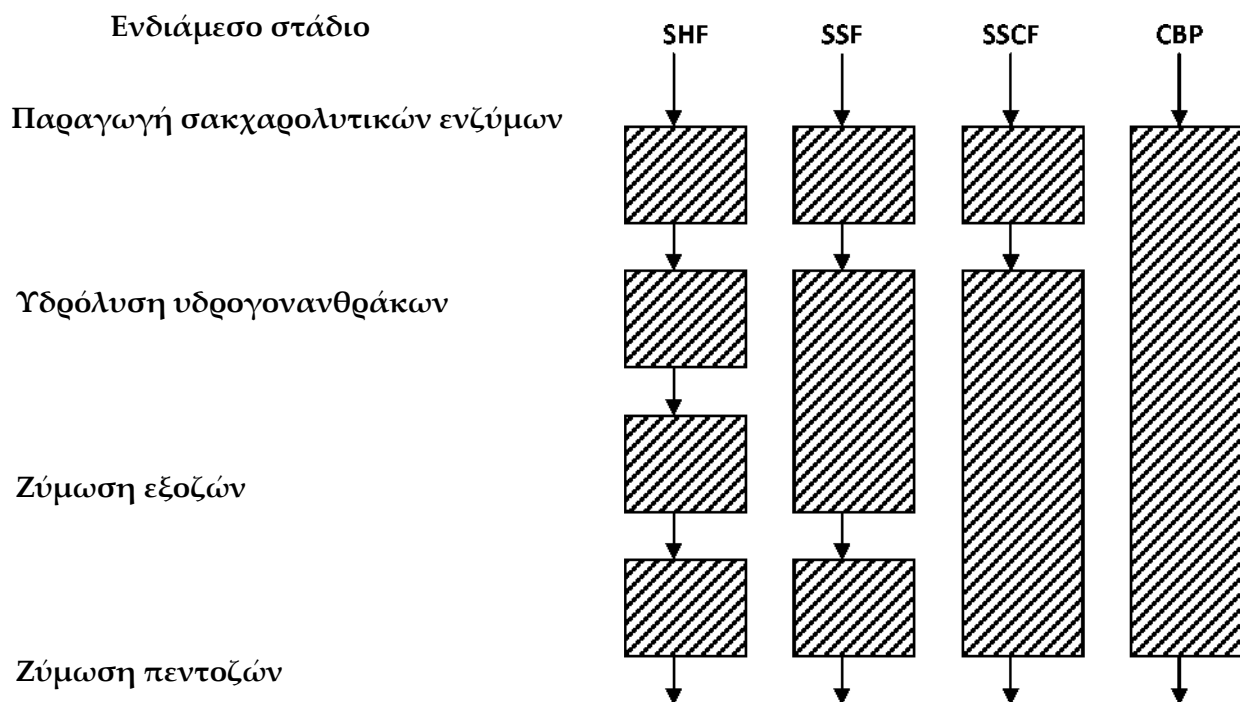
Ένα σημαντικό πλεονέκτημα της βυθισμένης ζύμωσης για την παραγωγή ενζύμων σε βιομηχανική κλίμακα είναι η χρήση γενετικά τροποποιημένων μικροοργανισμών, ειδικά προσαρμοσμένων σε τέτοιου είδους συνθήκες. Βέβαια, σχεδόν όλα από αυτά τα ένζυμα θα μπορούσαν να παραχθούν σε ζύμωση στερεάς κατάστασης, χρησιμοποιώντας φυσικούς μικροοργανισμούς. Ιδιαίτερο ενδιαφέρον έχει το γεγονός ότι μύκητες, ζύμες και βακτήρια που έχουν εξεταστεί σε ζυμώσεις στερεάς κατάστασης, παρουσίασαν διαφορετικές στρατηγικές μεταβολισμού υπό συνθήκες βυθισμένης ζύμωσης [Hölker et al. 2004]. Για παράδειγμα, η καλλιέργεια των νηματοειδών μυκήτων σε στερεά υποστρώματα (οι οποίοι έχουν χρησιμοποιηθεί περισσότερο λόγω της ικανότητας τους αφενός να παράγουν ένα μεγάλο εύρος εξωκυτταρικών ενζύμων και αφετέρου να αναπτύσσονται σε περίπλοκα στερεά υποστρώματα) [Gkargkas et al. 2004] διαφέρει από την ανάπτυξη σε υγρή καλλιέργεια ως προς την εξωκυτταρική εντόπιση των εκκρινόμενων πρωτεϊνών [Biesebeke et al. 2005].

Αν και μια άμεση σύγκριση μεταξύ της βυθισμένης και της στερεάς κατάστασης ζύμωσης είναι πολύ δύσκολο να γίνει λόγω της διαφορετικής συνύπαρξης των μικροβιακών καλλιέργειών που χρησιμοποιούνται στις δύο τεχνολογίες, οι μικροοργανισμοί που σχετίζονται με τη ζύμωση στερεάς καλλιέργειας πλεονεκτούν διότι αναπτύσσονται σε ένα σχεδόν φυσικό περιβάλλον, δηλαδή σε χαμηλά επίπεδα δραστηριότητας νερού και με

στερεή υποστήριξη για ανάπτυξη [Hölker et al.2004]. Η μέθοδος αυτή λειτουργεί όπως μια ημιδιαλείποντος έργου καλλιέργεια με γρήγορη οξυγόνωση αλλά με χαμηλή παροχή σακχάρων, και επιπλέον έχει το πρόσθετο πλεονέκτημα ότι είναι μια στατική διεργασία χωρίς έξοδα παραγωγής μηχανικής ενέργειας. Ωστόσο, προκειμένου αυτό το σύστημα να χρησιμοποιηθεί σε μεγάλης κλίμακας διεργασίες θα πρέπει να ξεπεραστούν τα προβλήματα ετερογένειας [Hölker et al.2004]. Η βυθισμένη ζύμωση από την άλλη, πλεονεκτεί όσον αφορά τον έλεγχο της διεργασίας και την εύκολη ανάκτηση των εξωκυτταρικών ενζύμων και των μυκηλίων, τα οποία όμως είναι λιγότερο σταθερά από αυτά της ζύμωσης στερεάς κατάστασης [Sandhya et al. 2005]. Η βυθισμένη ζύμωση λειτουργεί όπως ένα ομοιογενές σύστημα με σημαντικές δαπάνες σε ενέργεια προκειμένου να καλύψει όσο το δυνατό γρηγορότερα τις μεγάλες απαιτήσεις σε οξυγόνο. Σε τέτοιου είδους διεργασίες, πρέπει να χρησιμοποιείται αυτοματοποιημένη ημιδιαλείποντος έργου παροχή των υποστρωμάτων, για να αποφεύγεται η καταβολική καταστολή.

2.6.2 Τεχνολογίες παραγωγής αιθανόλης

Η διεργασία βιομετατροπής της λιγνοκυτταρινούχου βιομάζας σε αιθανόλη περιλαμβάνει τέσσερα διαφορετικά στάδια: **την παραγωγή σακχαρολυτικών ενζύμων** (κυτταρινάσες και ημικυτταρινάσες), **την υδρόλυση των υδρογονανθράκων που περιέχονται στη βιομάζα σε απλούστερα σάκχαρα**, **τη ζύμωση των εξοζών** (γλυκόζη, μαννόζη και γαλακτόζη) και **τη ζύμωση των πεντοζών** (ξυλόζη και αραβινόζη) [Lynd et al 2005]. Ανάλογα με το βαθμό που αυτά τα στάδια αλληλοσυνδέονται, διακρίνονται οι παρακάτω τεχνολογίες παραγωγής αιθανόλης:



Εικόνα 2: Τεχνολογίες παραγωγής αιθανόλης [Lynd et al. 2002]

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

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

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

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

Συγκριτικά με την ξεχωριστή υδρόλυση και ζύμωση (SHF), η ταυτόχρονη σακχαροποίηση και ζύμωση έχει τα ακόλουθα πλεονεκτήματα: (1) αύξηση του ρυθμού υδρόλυσης, λόγω μετατροπής των σακχάρων που παρεμποδίζουν την δράση των κυτταρινασών (2) μικρότερες απαιτήσεις σε ένζυμα (3) μεγαλύτερη παραγωγή προϊόντος (4) μείωση της χρονικής διάρκειας της διεργασίας (5) μικρότερος κίνδυνος μόλυνσης του μέσου καλλιέργειας από ανεπιθύμητους μικροοργανισμούς λόγω της παρουσίας της αιθανόλης (6) μείωση στο κόστος επένδυσης λόγω χρήσης μικρότερου αριθμού αντιδραστήρων [Zaldivar et al.2001, Sun and Cheng 2002, Szczodrak and Fiedurek 1995, Ballesteros et al.2004]. Ωστόσο, είναι απαραίτητος ένας συμβιβασμός όσον αφορά τη θερμοκρασία που θα διεξαχθεί η σακχαροποίηση και η ζύμωση της κυτταρίνης [Ballesteros et al. 2004].

➤ **Άμεση μικροβιακή μετατροπή (Direct Microbial Conversion, DMC ή Consolidated Bioprocessing, CBP)**

Με τη μέθοδο αυτή, όλα τα απαραίτητα στάδια βιομετατροπής του κυτταρινούχου υλικού σε αιθανόλη, δηλαδή η παραγωγή των σακχαρολυτικών ενζύμων (κυτταρινάσες, ημικυτταρινάσες), η υδρόλυση του υποστρώματος σε απλούστερα σάκχαρα (πεντόζες και εξόζες) και η ζύμωση αυτών των σακχάρων σε αιθανόλη, πραγματοποιούνται σε ένα μόνο στάδιο.

Η βασική διαφορά της άμεσης μικροβιακής μετατροπής από τις προηγούμενες μεθόδους είναι η απουσία ξεχωριστού σταδίου για την παραγωγή σακχαρολυτικών ενζύμων, γεγονός που έχει σαν αποτέλεσμα την απαλοιφή του κόστους που σχετίζεται με αυτό το στάδιο. Σε αντίθεση με τις άλλες μεθόδους, ολόκληρη η ποσότητα της πρώτης ύλης είναι διαθέσιμη για την παραγωγή υδρολυτικών ενζύμων. Υπάρχει ακόμα η δυνατότητα χρήσης κυτταρινασών με μεγάλη ειδική ενεργότητα και είναι εφικτή η συνέργια ενζύμου-

μικροοργανισμού. Το αποτέλεσμα είναι η αύξηση του ρυθμού υδρόλυσης και η περαιτέρω μείωση του κόστους επένδυσης λόγω μείωσης του όγκου του αντιδραστήρα. Επιπλέον, με τη μέθοδο αυτή μπορεί να επιτευχθεί μεγαλύτερη παραγωγή του επιθυμητού προϊόντος, καθώς και βελτίωση της σταθερότητας των καλλιιεργειών και των στελεχών που χρησιμοποιούνται [Lynd et al. 2002, Lynd et al.2005].

Η χρήση του *Fusarium oxysporum* στην άμεση μικροβιακή μετατροπή παρουσιάζει ιδιαίτερο ενδιαφέρον, αφενός λόγω της ικανότητας του μύκητα να παράγει το απαραίτητο σύστημα ενζύμων για την υδρόλυση λιγνοκυτταρινούχων υποστρωμάτων και αφετέρου λόγω της ικανότητας του να ζυμώνει κατευθείαν το υπόστρωμα σε αιθανόλη.

2.7 Μελλοντικές προοπτικές – συμπεράσματα

Δεδομένου ότι η τιμή των πρώτων υλών αιθανόλης (π.χ. καλαμπόκι) εκτιμάται να αυξηθεί, τα λιγνοκυτταρινούχα υλικά παραμένουν η μόνη βιώσιμη λύση για να χρησιμεύσει ως ανανεώσιμη πρώτη ύλη για την παραγωγή αιθανόλης. Παρά την χαμηλή αξία των πρώτων υλών που χρησιμοποιούνται για την παραγωγή αιθανόλης, η τιμή του καυσίμου δεύτερης γενιάς (αιθανόλη) εξακολουθεί να είναι υψηλή λόγω των τεχνολογικών εμποδίων που συναντώνται στα διάφορα στάδια της διαδικασίας. Η προεπεξεργασία εκτιμάται ότι αντιπροσωπεύει το 33% του συνολικού κόστους (Tomas-Rejo et al., 2008). Οι τρέχουσες μέθοδοι προεπεξεργασίας για λιγνοκυτταρινούχα υλικά είναι εντάσεως κεφαλαίου. Μια οικονομική σύγκριση έδειξε ότι η χρήση χαμηλού κόστους αντιδραστήρων για την προεπεξεργασία αντισταθμίζονται από το υψηλότερο κόστος του καταλύτη και την ανάκτηση αιθανόλης (Eggeman και Elander, 2005). Το επόμενο σημαντικό τεχνικό εμπόδιο είναι το κόστος των ενζύμων. Κοινές συνεργασίες και επενδύσεις πραγματοποιήθηκαν με στόχο την αύξηση της αποτελεσματικότητας των ενζύμων, την ανάπτυξη νέων τεχνολογιών για υψηλό σταθερό χειρισμό και τη μείωση του κόστους με ένζυμο από πολλές πτυχές. Novozymes AS παρουσιάζονται ως δεύτερης γενιάς λιγνοκυτταρινούχα ένζυμα, γνωστά ως Cellic CTec και Cellic HTec τα οποία φέρεται να είναι ένα βασικό βήμα προς την παράδοση στο εμπόριο ενζύμων για τη βιώσιμη κυτταρινική παραγωγή αιθανόλης. Αυτά τα ένζυμα απαιτούν το ένα τρίτο της δόσης της πρώτης γενιάς ενζύμων, Celluclast, για να επιτευχθεί 80% μετατροπή, και συνεργάζεται με ένα ευρύ φάσμα πρώτων υλών και προ-επεξεργασιών. Η υψηλή συγκέντρωση στερεών μπορεί να μειώσει σημαντικά το κόστος της κυτταρινικής αιθανόλης (Galbe και Zacchi, 2002). Λόγω του τρέχοντος περιορισμού των στερεών φόρτωσης στην ενζυματική υδρόλυση και τα στάδια ζύμωσης, η προκύπτουσα συγκέντρωση αιθανόλης είναι συνήθως χαμηλή

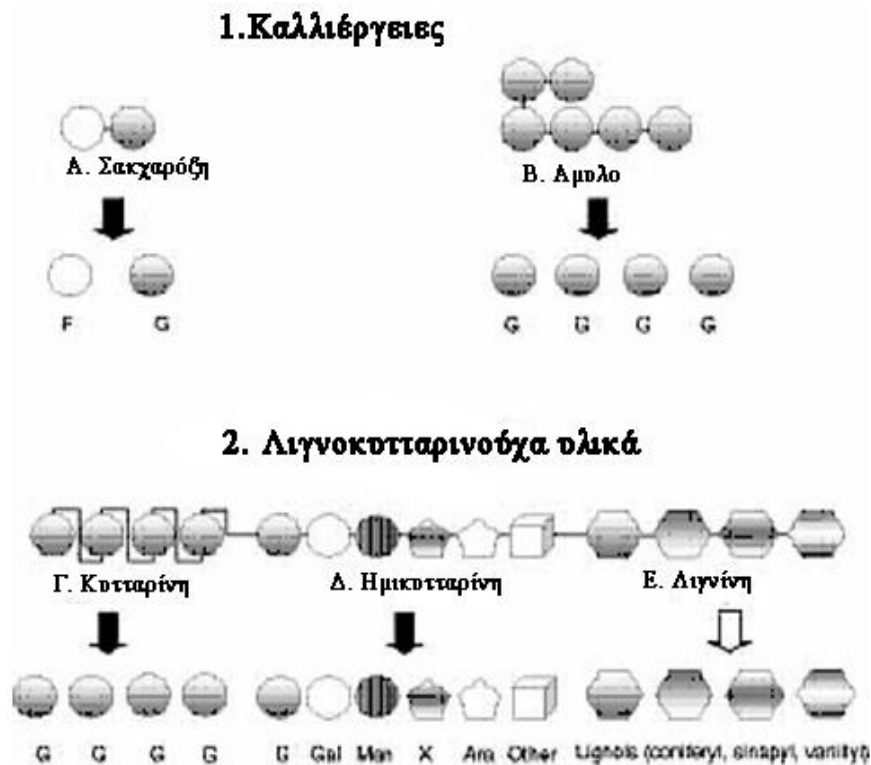
πράγμα που αυξάνει δραματικά το κόστος της απόσταξης.Επιπλέον, η οικονομία της λιγνοκυτταρινικής αιθανόλης θα μπορούσε να έχει βελτιωθεί με ταυτόχρονη ζύμωση εξοζών και πεντοζών στο βήμα της ζύμωσης.

Τα τελευταία χρόνια, οι διάφορες ιδέες biorefinery έχουν εισαχθεί ως λύση για την καθαρή, αποδοτική και οικονομικά εφικτή χρήση των λιγνοκυτταρινούχων υλικών. Το διωλιστήριο πετρελαίου είναι ένα εργοστάσιο που επεξεργάζεται καλλιέργειες που παράγουν ένα ευρύ φάσμα προϊόντων, συμπεριλαμβανομένων των εξαρτημάτων υψηλής αξίας,καύσιμα μεταφορών και άμεση ενέργεια (Ragauskas et al.2006).Το άχυρο σίτου θα μπορούσε να μετατραπεί σε μια ποικιλία κεριών υψηλής αξίας και έναν αριθμό ενεργειακών και χημικών προϊόντων. Τα φυσικά κεριά έχουν ένα ευρύ φάσμα βιομηχανικών χρήσεων στα καλλυντικά, τα προσωπικά προϊόντα φροντίδας, επιστρώνοντας μια παγκόσμια αγορά χιλιάδων τόνων . Με την περαιτέρω μείωση στο κόστος των ενζύμων για την υδρόλυση και τη σύγχρονη τεχνολογία (όπως οι νέες εγκαταστάσεις αιθανόλης) η δεύτερη γενιά της αιθανόλης θα αποκτήσουν τη δυνατότητα να ανταγωνιστούν σε μεγάλη κλίμακα με τη βενζίνη χωρίς επιδοτήσεις στο άμεσο μέλλον.

Κεφάλαιο 3: Πρώτες ύλες και μικροοργανισμοί

3.1 Πρώτες ύλες για την παραγωγή αιθανόλης

Τα σάκχαρα αποτελούν μια μεγάλη ποικιλία για την παραγωγή βιοαιθανόλης, συμπεριλαμβανομένων των ενεργειακών καλλιέργειών και των λιγνινοκυτταρινούχων υλικών. Πάνω από το 90% της παγκόσμιας παραγωγής αιθανόλης προέρχεται από την εφαρμογή συγκεκριμένων καλλιέργειών (το 60% από ζαχαροκάλαμο και ζαχαρότευτλο, ενώ το υπόλοιπο 40% κυρίως από άμυλο αραβοσίτου) [Berg, 1999]. Καλλιέργειες όπως ζαχαροκάλαμος και ζαχαρότευτλο περιέχουν σακχαρόζη που υδρολύεται στα μονομερή συστατικά της, δηλαδή σε φρουκτόζη και γλυκόζη. Άλλες καλλιέργειες, όπως τα δημητριακά, περιέχουν άμυλο, το οποίο διασπάται σε απλούστερα σάκχαρα. Το ζαχαροκάλαμο προτιμάται σαν πρώτη ύλη για την παραγωγή αιθανόλης στη Βραζιλία, στην Ινδία και στην Νότια Αφρική, ενώ το καλαμπόκι χρησιμοποιείται στις ΗΠΑ και το ζαχαρότευτλο στη Γαλλία [Zaldivar et al., 2001].



Εικόνα 3: Πηγές σακχάρων για την παραγωγή αιθανόλης. 1 καλλιέργειες 2 λιγνινοκυτταρινούχα υλικά. Τα βέλη υποδεικνύουν την υδρόλυση (μόνο τα μονομερή που προκύπτουν από την υδρόλυση, και που υποδεικνύονται από τα μαύρα βέλη, μπορούν να ζυμωθούν). G γλυκόζη, Gal γαλακτόζη, F φρουκτόζη, Man μαννόζη, X ξυλόζη, Ara αραβινόζη, Other L-ραμνόζη, L- φουκόζη, ουρονικά οξέα [Zaldivar et al., 2001].

Γενικά, οι πρώτες ύλες για την παραγωγή βιοαιθανόλης μπορούν να ταξινομηθούν σε τρεις τύπους: (i) σακχαρούχα υλικά, (ii) αμυλούχα υλικά και (iii) λιγνινοκυτταρινούχα υλικά. Διαφορετικά υλικά που μπορούν να χρησιμοποιηθούν για την παραγωγή βιοαιθανόλης και η συγκριτική τους παραγωγική δυνατότητα δίνεται στον πίνακα 1 [Kumar et al., 2006].

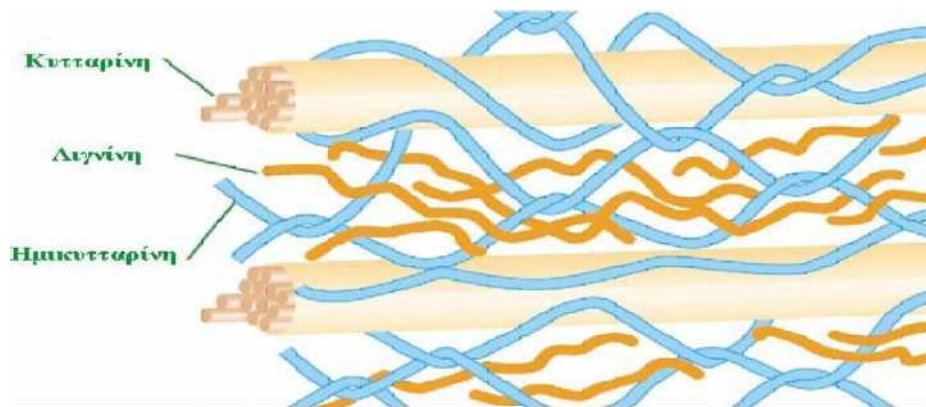
Υλικό	Παραγωγή βιοαιθανόλης (1/ton)
Ζαχαροκάλαμο	70
Ζαχαρότευτλο	110
Γλυκιά πατάτα	125
Πατάτα	110
Μανιόκα (Cassava)	180
Καλαμπόκι	360
Ρύζι	430
Κριθάρι	250
Σιτάρι	340
Γλυκό σόργο	60
Υπολείμματα εκχύλισης σακχάρου και άλλη κυτταρική βιομάζα	280
Πίνακας 3: Διαφορετικά υλικά για την παραγωγή βιοαιθανόλης και η συγκριτική τους παραγωγική δυνατότητα	

Πηγή: Kumar et al., 2006.

3.2 Λιγνινοκυτταρινούχα υλικά

Τα λιγνινοκυτταρινούχα υλικά, όπως τα γεωργικά υπολείμματα (άχυρο σίτου, στελέχη, κλαδιά, φύλλα), τα υπολείμματα επεξεργασίας γεωργικών προϊόντων (υπολείμματα εκκοκκισμού βαμβακιού, πυρηνόξυλο, πυρήνες φρούτων κ.λ.π.) το ξύλο και οι ενεργειακές συγκομιδές, αποτελούν ένα ελκυστικό υλικό για την παραγωγή καυσίμων βιοαιθανόλης δεδομένου ότι διαθέτουν μεγάλο ποσοστό σε ζυμώσιμους υδρογονάνθρακες και είναι ο αφθονότερος αναπαραγωγίσιμος πόρος στη γη. Η λιγνινοκυτταρινούχος βιομάζα θα μπορούσε να παραγάγει μέχρι 442 δισεκατομμύρια λίτρα βιοαιθανόλης το χρόνο [Bohlmann, 2006]. Το άχυρο ρυζιού είναι ένα από τα άφθονα λιγνινοκυτταρινούχα απόβλητα στον κόσμο. Παράγονται ετησίως περίπου 731 εκατομμύρια τόνοι, το οποίο διανέμεται στην Αφρική (20.9 εκατομμύρια τόνοι), την Ασία (667.6 εκατομμύρια τόνοι), την Ευρώπη (3.9 εκατομμύρια τόνοι), την Αμερική (37.2 εκατομμύρια τόνοι) και την Ωκεανία (1.7 εκατομμύρια τόνοι). Αυτό το ποσό αχύρου ρυζιού μπορεί ενδεχομένως να παραγάγει 205 δισεκατομμύρια λίτρα βιοαιθανόλης το χρόνο, το οποίο είναι το μεγαλύτερο ποσό από ένα ενιαίο απόθεμα βιομάζας. Οι λιγνινοκυτταρινούχες συγκομιδές αποτελούν ένα σημαντικό απόθεμα, λόγω της υψηλής παραγωγής τους, του χαμηλού κόστους τους, της καταλληλότητας τους για το χαμηλής ποιότητας έδαφος καθώς και για τις χαμηλές περιβαλλοντικές επιδράσεις [Karimi et al., 2006].

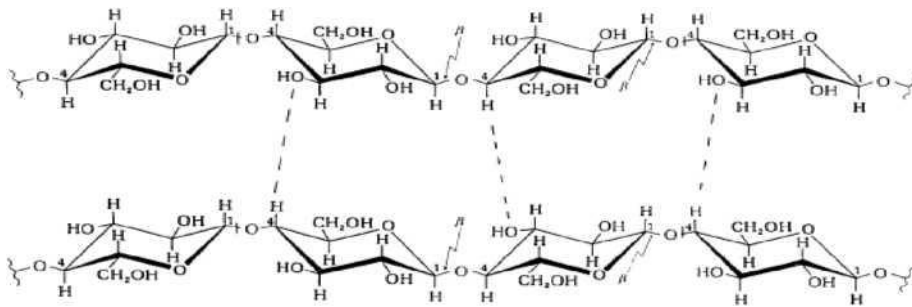
Η σύσταση των λιγνινοκυτταρινούχων υλικών διαφοροποιείται ανάλογα με τη προέλευση τους. Σε γενικές γραμμές όμως, αποτελούνται κυρίως από κυτταρίνη (~45% του ξηρού βάρους), ημικυτταρίνη (~30% ξηρού βάρους) και λιγνίνη (~25% ξηρού βάρους) [Zaldivar et al., 2001].



Εικόνα 4 :Απεικόνιση του δευτερογενούς κυτταρικού τοιχώματος [Boudet et al., 2003].

Κυτταρίνη

Η κυτταρίνη είναι η πιο διαδεδομένη οργανική ένωση στη βιόσφαιρα και συμπεριλαμβάνει περισσότερο από τον μισό οργανικό άνθρακα. Περίπου 10^{15} Kg κυτταρίνης συντίθενται και αποικοδομούνται στη γη κάθε χρόνο. Η κυτταρίνη είναι ένα μη διακλαδισμένο πολυμερές καταλοίπων γλυκόζης, ενωμένων με β-1,4 γλυκοζιτικούς δεσμούς, με επαναλαμβανόμενη δομική μονάδα την κελλοβιόζη, με μοριακό βάρος περίπου 400000, το οποίο και αντιστοιχεί σε 2800 μονάδες γλυκόζης [Stryer, 1994]. Η σύζευξη των γειτονικών μορίων κυτταρίνης με δεσμούς υδρογόνου, καθώς και η επίδραση των δυνάμεων van der Waals, έχουν σαν αποτέλεσμα την παράλληλη ευθυγράμμιση της και το σχηματισμό κρυσταλλικής δομής [Zhang and Lynd, 2004]. Η δομή αυτή, καθώς και το γεγονός ότι περιβάλλεται από λιγνίνη, ημικυτταρίνη, άμυλο, πηκτίνη και μεταλλικά στοιχεία έχουν σαν αποτέλεσμα το σχηματισμό ενός εξαιρετικά σταθερού πολυσακχαρίτη, με μεγάλη αντοχή σε εφελκυσμό και ιδιαίτερα ανθεκτικό στην υδρόλυση. Η κυτταρίνη μπορεί να υδρολυθεί είτε χημικά με αραιό ή πυκνό οξύ, είτε ενζυμικά [Zaldivar et al., 2001].

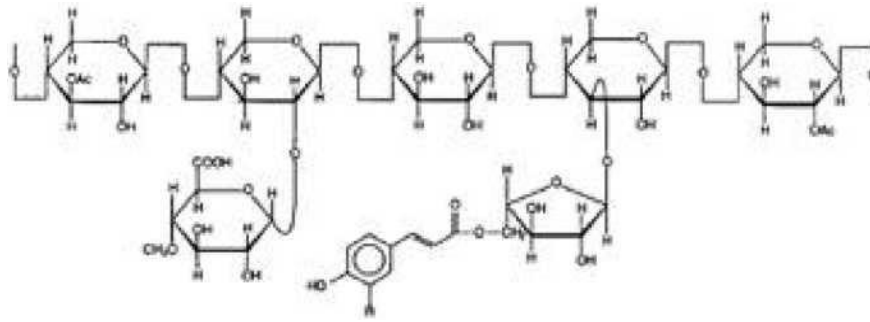


Εικόνα 5: Σχεδιάγραμμα της στερεοδιάταξης της κυτταρίνης. Η δομή σταθεροποιείται με υδρογόνου μεταξύ γειτονικών μονάδων γλυκόζης της ίδιας αλυσίδας αλλά και μεταξύ παρ' αλυσίδων [Gadd, 2001].

Ημικυτταρίνη

Η ημικυτταρίνη είναι ένα ιδιαίτερα διακλαδισμένο ετεροπολυμερές αποτελούμενο από σάκχαρα όπως οι εξόζες (D-γαλακτόζη, L-γαλακτόζη, D-μαννόζη, L-ραμνόζη, L-φουκόζη), οι πεντόζες (D-ξυλόζη, L-αραβινόζη) και τα ουρονικά οξέα (D-γλυκουρινικό οξύ) [Brigham et al., 1996]. Η σύσταση της ημικυτταρίνης εξαρτάται από την πηγή της πρώτης ύλης [Wiselogle et al., 1996].

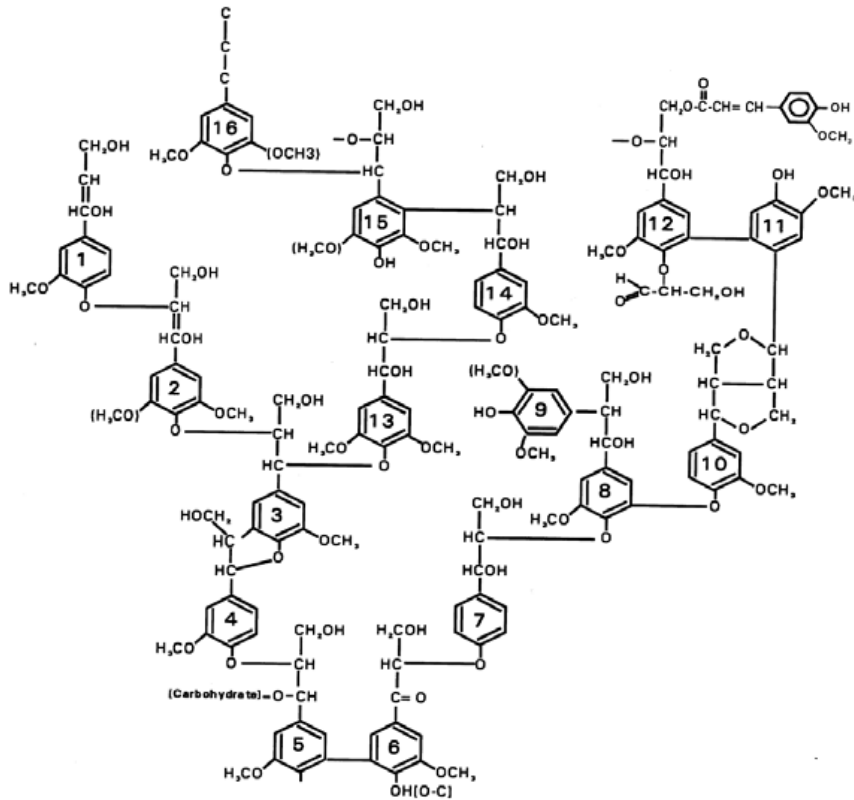
Σε αντίθεση με την κυτταρίνη, που είναι κρυσταλλική και ανθεκτική στην υδρόλυση, η ημικυτταρίνη έχει μια τυχαία και άμορφη δομή, γεγονός που οδηγεί στην ευκολότερη υδρόλυση της [Aristidou and Penttila, 2000]. Οι αραβινοξυλάνες, από τους πλέον σημαντικούς πολυσακχαρίτες αυτής της κατηγορίας, διαδραματίζουν βασικό ρόλο στο φυτικό κυτταρικό τοίχωμα. Βρίσκονται κυρίως στο δευτερογενές κυτταρικό τοίχωμα και λειτουργούν σαν κόλλα, σχηματίζοντας ομοιοπολικούς και μη δεσμούς με τη λιγνίνη, τη κυτταρίνη και τα άλλα πολυμερή [Polizeli et al., 2005]. Οι αραβινοξυλάνες αποτελούνται από μια αλυσίδα μονάδων ξυλόζης, ενωμένων με β-1,4 γλυκοζιτικούς δεσμούς, με υποκαταστάτη κυρίως κατάλοιπα α-L-αραβινοφουρανόζης στις θέσεις C(O)-2, C(O)-3 ή και στις δύο [Sorensen et al., 2005].



Εικόνα 6 : Σχηματική απεικόνιση της δομής της ημικυτταρίνης [Puls and Schuseil, 1993].

Λιγνίνη

Η λιγνίνη είναι το πιο διαδεδομένο αρωματικό πολυμερές στη φύση [Zaldivar et al., 2001]. Αποτελείται από μονάδες ρ-υδροξυφαινυλοπροπανίου, που προκύπτουν από την αφυδάτωση τριών αλκοολών, trans-ρ-κουμαρική αλκοόλη, trans-ρ- κονιφερική αλκοόλη και trans-ρ-σιναπτική αλκοόλη, ενωμένες με C-C ή C-O-C δεσμούς [Roehrer, 2001; Zaldivar et al., 2001].



Εικόνα 7: Σχηματική απεικόνιση της δομής της λιγνίνης [Lee, 1997].

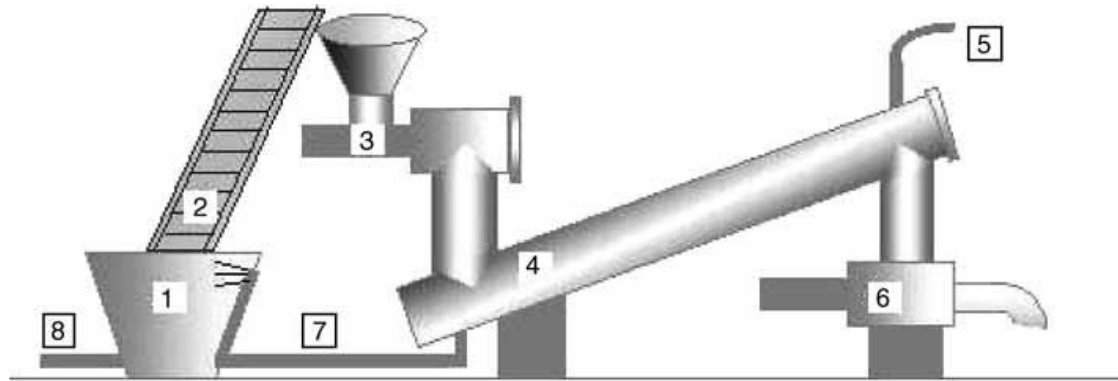
Στο φυτικό κυτταρικό τοίχωμα η λιγνίνη σχηματίζει ένα προστατευτικό περίβλημα γύρω από τις ίνες κυτταρίνης και ενώνεται ομοιοπολικά με την ημικυτταρίνη [Gadd, 2001]. Αναγκαία προϋπόθεση για την υδρόλυση αυτών των πολυσακχαριτών είναι η αποικοδόμηση της λιγνίνης. Ωστόσο, η υδροφοβικότητα που τη χαρακτηρίζει, καθώς και η περίπλοκη, ευμετάβλητη δομή που διαθέτει, την καθιστούν εξαιρετικά ανθεκτική στη χημική και ενζυμική αποικοδόμηση [Aro et al., 2005; Lee, 1997]. Βιολογικά, διασπάται από πολύ λίγους μικροοργανισμούς, κυρίως μύκητες, παρέχοντας μεγαλύτερης αξίας προϊόντα όπως οργανικά οξέα, αρωματικές αλδεΐδες, κετόνες και βανιλίνη [Hamelinck et al., 2003; Boudet et al., 2003].

3.3 Υδροθερμικά προκατεργασμένο άχυρο σίτου (hydrothermally Pretreated Wheat Straw - PWS)

Η παραγωγή υδροθερμικά προκατεργασμένου άχυρου σίτου εντάσσεται στο πρόγραμμα IBUS (Integrated Biomass Utilization System) της ΕΕ, που στόχο έχει την ανάπτυξη οικονομικών διαδικασιών για τη συμπαραγωγή βιοαιθανόλης και ηλεκτρισμού, οι οποίες βασίζονται στη συνδυαστική αξιοποίηση βιομάζας [Thomsen et al., 2006]. Η επιλογή της υδροθερμικής κατεργασίας έγινε με βάση το δεδομένο ότι η συγκεκριμένη κατεργασία μπορεί να πραγματοποιηθεί χωρίς την προσθήκη χημικών και οξυγόνου, γεγονός που την καθιστά δυνατή λύση για προκατεργασία μεγάλων ποσοτήτων άχυρου [Thomsen et al., 2008].

3.3.1 Παραγωγή

Η πιλοτική μονάδα που χρησιμοποιείται (Εικόνα 8) έχει δυναμικότητα 100 kg/h [Thomsen et al. 2006]. Το άχυρο τροφοδοτείται σε ένα δοχείο όπου διαβρέχεται με νερό σε θερμοκρασία 80 °C για 6 min [Jørgensen et al., 2007]. Στη συνέχεια, οδηγείται στην είσοδο του αντιδραστήρα μέσω ενός ταινιόδρομου, ο οποίος στραγγίζει αρκετό από το ελεύθερο νερό του άχυρου, εξασφαλίζοντας έτσι, την αντίθετη φορά ροή νερού μέσα στον αντιδραστήρα. Η εισαγωγή της βιομάζας στον αντιδραστήρα πραγματοποιείται με μια ειδικά σχεδιασμένη αντλία. Ο εν λόγω αντιδραστήρας περιλαμβάνει κοχλιόδρομο με τον οποίο το άχυρο μεταφέρεται ανοδικά, ενώ νερό που εισάγεται από την κορυφή του, κινούμενο με αντίθετη φορά, αποσκοπεί στην εκχύλιση [Thomsen et al., 2006]. Το άχυρο παραμένει στον αντιδραστήρα στους 195 °C για 12 min, ενώ η ροή νερού μέσα από αυτόν είναι 250 L/h [Jørgensen et al., 2007]. Η κατεργασμένη, πλέον, βιομάζα απομακρύνεται από το αντιδραστήρα με τη βοήθεια αντλίας [Thomsen et al., 2006].



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

Εικόνα 8: Σχηματική παράσταση της πιλοτικής μονάδας που χρησιμοποιείται για την κατεργασία του WS [Thomsen et al., 2006].

3.3.2 Σύσταση

Το στερεό υλικό, που προκύπτει από την παραπάνω διαδικασία, είναι πλούσιο σε κυτταρίνη και δίνει μεγάλες αποδόσεις σε γλυκόζη μετά από ενζυμική υδρόλυσή του. Αντίθετα, η περιεκτικότητά του σε ημικυτταρίνη είναι σε χαμηλά επίπεδα λόγω της θερμικής της διάσπασης. Τέλος, το περιεχόμενό του σε λιγνίνη παρουσιάζει αύξηση, σε σχέση με το ακατέργαστο υλικό, λόγω της μη απομάκρυνσης της ήδη υπάρχουσας, καθώς και λόγω των ενώσεων που σχηματίστηκαν από τη διάσπαση της ημικυτταρίνης. Η λιγνίνη, μάλιστα, έδειξε να μην εμποδίζει τη δράση των κυτταρινολυτικών ενζύμων κατά την ενζυμική υδρόλυση [Thomsen et al., 2008]. Μειονέκτημα αποτελεί ο σχηματισμός παρεμποδιστών, όπως καρβοξυλικά οξέα και φουρφουράλες, που σε κάποιες περιπτώσεις δυσκολεύουν, ή ακόμα και αποκλείουν τη δυνατότητα ζύμωσης [Thomsen et al., 2006].

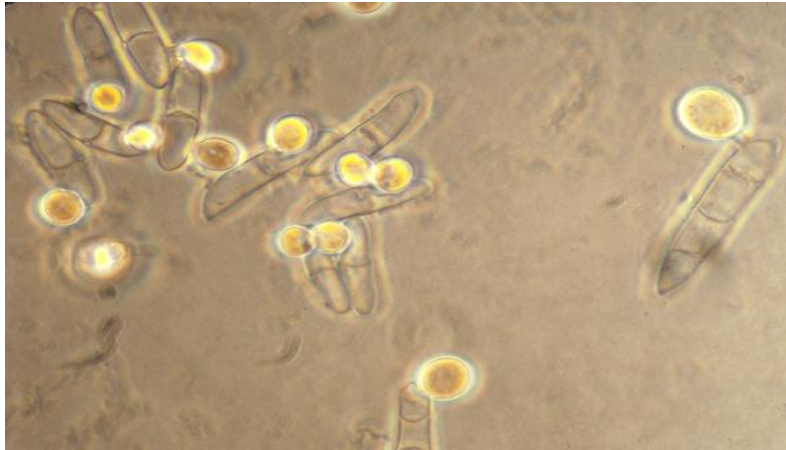
3.3.3 Χρήσεις

Όπως προαναφέρθηκε, το κατεργασμένο στερεό που λαμβάνεται από τη διαδικασία μπορεί να χρησιμοποιηθεί για την παραγωγή αιθανόλης με Ταυτόχρονη Σακχαροποίηση και Ζύμωση (Simultaneous Saccharification and Fermentation - SSF). Το πλούσιο σε λιγνίνη υπόλειμμα της ζύμωσης - το οποίο έχει επίσης απαλλαγεί και από τα άλατα του καλίου που προκαλούν διάβρωση στον εξοπλισμό των εργοστασίων παραγωγής ενέργειας - χρησιμοποιείται για παραγωγή ενέργειας μέσω της καύσης του. Επίσης, το υγρό που λαμβάνεται από την κατεργασία (εκχύλισμα που περιέχει ημικυτταρίνη) χρησιμεύει και αυτό για την παραγωγή αιθανόλης με ζύμωση [Thomsen et al., 2008]. Τέλος, παραπροϊόντα της ζύμωσης συμπυκνώνονται και χρησιμοποιούνται ως ζωοτροφή και λίπασμα [Thomsen et al., 2006].

3.4 Ο μύκητας *Fusarium oxysporum*

Η βιομετατροπή των κυτταρινούχων υλικών σε αιθανόλη με τις συμβατικές μεθόδους περιλαμβάνει αρχικά την ενζυμική υδρόλυση των υδρογονανθράκων σε απλούστερα σάκχαρα και στη συνέχεια, τη ζύμωση αυτών των σακχάρων σε αιθανόλη. Μια εναλλακτική προσέγγιση είναι η άμεση μικροβιακή μετατροπή, στην οποία ένας ή περισσότεροι μικροοργανισμοί πραγματοποιούν ταυτόχρονη παραγωγή σακχαρολυτικών ενζύμων, υδρόλυση και ζύμωση στον ίδιο βιοαντιδραστήρα. Μερικά μικροβιακά είδη όπως ο *Neurospora crassa* και ο *Fusarium oxysporum* έχουν την ικανότητα να ζυμώνουν την κυτταρίνη απευθείας σε αιθανόλη [Christakopoulos et al.1989].

Η ταξινόμηση των μυκήτων που ανήκουν στο γένος *Fusarium* είναι η εξής: Eukaryota (Υπερβασίλειο), Fungi (Βασίλειο), Ascomycota (Φύλο), Pezizomycotina (Υποφύλο), Sordariomycetes (Κλάση), Hypocreomycetidae (Υποκλάση), Hypocreales (Τάξη), *Fusarium* (Γένος), *Fusarium oxysporum* (Είδος) [NCBI].



Εικόνα 9:*Fusarium oxysporum*

Το στέλεχος *Fusarium oxysporum* F3, που έχει απομονωθεί από το κύμινο, παράγει ένα ευρύ φάσμα κυτταρινασών και ημικυτταρινασών σε βυθισμένη ζύμωση, χρησιμοποιώντας σαν πηγή άνθρακα διάφορα λιγνοκυτταρινούχα υλικά. Το στέλεχος αυτό έχει την εξαιρετική ιδιότητα να μετατρέπει κατευθείαν την κυτταρίνη και τη ξυλάνη σε αιθανόλη. Συνεπώς, αν χρησιμοποιηθεί ο *F. oxysporum* για την παραγωγή αιθανόλης από βιομάζα, δεν είναι απαραίτητο να πραγματοποιηθεί ξεχωριστή ενζυμική υδρόλυση της λιγνοκυτταρινούχου πρώτης ύλης, αφού ο μύκητας αυτός μπορεί να παράγει όλα τα αναγκαία ένζυμα [Panagiotou et al. 2005δ, Panagiotou et al. 2005γ, Panagiotou et al.2003].

Διάφοροι φυσικοί παράγοντες όπως το pH, η θερμοκρασία και οι συνθήκες αερισμού επηρεάζουν σημαντικά την παραγωγή αιθανόλης από τον *Fusarium oxysporum*. Η μέγιστη συγκέντρωση αιθανόλης έχει πραγματοποιηθεί σε τιμές pH 5.5 και 6, για αερόβιες και αναερόβιες συνθήκες καλλιέργειας αντίστοιχα. Το pH για την αναερόβια καλλιέργεια, είναι επίσης βέλτιστο για την ενεργότητα της β- γλυκοζιδάσης, που έχει βρεθεί ότι είναι το ένζυμο κλειδί για την άμεση μετατροπή της κυτταρίνης από το *F.oxysporum* F3 (αναστέλλει την παρεμπόδιση από την κελλοβιόζη). Η επίδραση της θερμοκρασίας στην παραγωγή αιθανόλης εξαρτάται από το στέλεχος που χρησιμοποιείται. Συγκεκριμένα, για το στέλεχος F3, έχει βρεθεί ότι η βέλτιστη θερμοκρασία για την παραγωγή ενζύμων είναι 30°C και για την παραγωγή αιθανόλης με υπόστρωμα κυτταρίνη υπό αναερόβιες συνθήκες είναι 34°C. Οι συνθήκες αερισμού παίζουν επίσης πολύ σημαντικό ρόλο. Επειδή οι μύκητες δεν αναπτύσσονται υπό αναερόβιες συνθήκες και η αιθανόλη δεν παράγεται υπό αερόβιες συνθήκες, συνήθως αναπτύσσεται πρώτα ο μικροοργανισμός αερόβια και στη συνέχεια, τα μυκήλια τοποθετούνται σε ημιαναερόβιες συνθήκες για την παραγωγή αιθανόλης [Singh and Kumar 1991, Christakopoulos et al.1989].

Μειονεκτήματα της χρήσης του *F.oxysporum* στην παραγωγή αιθανόλης είναι ο χαμηλός ρυθμός μετατροπής της κυτταρίνης, καθώς και ο σχηματισμός σημαντικών ποσοτήτων οξικού οξέος σαν παραπροϊόν [Panagiotou et al. 2005δ, Panagiotou and Christakopoulos 2004].

Πειραματικό Μέρος

Κεφάλαιο 4: Υλικά και μέθοδοι

Μετρήσεις αιθανόλης

Ο ποσοτικός προσδιορισμός της αιθανόλης έγινε με τη χρήση υγρού χρωματογράφου υψηλής πίεσης (High-performance liquid chromatography (HPLC))(Shimadzu). Η κινητή φάση του χρωματογράφου περιείχε διαλύτη H_2SO_4 (5 mM) και είχε ροή 0,6 mL/λεπτό. Η απαέρωση των διαλυτών πραγματοποιήθηκε με He που είχε ροή 30 mL/λεπτό. Χρησιμοποιήθηκε στήλη χρωματογραφίας **Animex HPX-87H Ion Exclusion Column (BioRad)**. Επίσης έγινε χρήση ανιχνευτή RID-10A (Retractive Index Detector). Όλες οι αραιώσεις των δειγμάτων έγιναν με απιονισμένο νερό υψηλής καθαρότητας (Millipore, Γαλλία). Επιπροσθέτως πριν από τις αναλύσεις τα δείγματα φιλτράρονταν (0,20 mm, Macherey - Nagel).



Εικόνα 10:Υγρός χρωματογράφος υψηλής πίεσης (HPLC) Shimadzu

Πηγές άνθρακα

Το προκατεργασμένο άχυρο σίτου (PWS) προέρχεται από το πανεπιστήμιο της Κοπεγχάγης. Η προκατεργασία έγινε στις πιλοτικές εγκαταστάσεις της IBUS στη Δανία (Thomsen et al. 2006). Το υλικό διατηρήθηκαν στους -18 °C. Πριν τη χρήση του υλικού έγινε ξήρανση στους 65 °C μέχρι σταθερού βάρους και τεμαχίστηκε σε κομμάτια μικρότερα των 3 χιλιοστών.

Ο σπάδικας αραβοσίτου (CC) προέρχεται από το Γεωπονικό Πανεπιστήμιο Αθηνών. Το υλικό τεμαχίστηκε σε εργαστηριακό μύλο σε κομμάτια μικρότερα των 3 χιλιοστών.

Το υπόλειμμα βύνης (BG) χορηγείται από την Αθηναϊκή Ζυθοποιία Α.Ε. Αμέσως μετά τη συλλογή του το υλικό καταψύχτηκε στους -18 °C. Πριν τη χρήση του ξηράθηκε για 48 ώρες στους 65 °C και τεμαχίστηκε σε εργαστηριακό μύλο σε κομμάτια μικρότερα των 5 χιλιοστών.

Χημικά και διαλύματα

Όλα τα χημικά προϊόντα τα προμηθευτήκαμε από την εταιρία **Sigma-Aldrich** (USA).

Μικροοργανισμοί

Ο μύκητας που χρησιμοποιήθηκε είναι ο *F. oxysporum* F3 που απομονώθηκε από κύμινο (Christakopoulos et al., 1989). Ο μύκητας αναπτύχθηκε σε potato-dextrose-agar PDA σε θερμοκρασία 30 °C για 5 ημέρες. Μετέπειτα διατηρήθηκε στους 4 °C.

Αποστείρωση

Η διαδικασία της αποστείρωσης πραγματοποιήθηκε σε κλίβανο υγρής αποστείρωσης (SANYO Labo Autoclave). Για την αποστείρωση σακχάρων οι συνθήκες διεξαγωγής της ήταν 110 °C και 40 min ,ενώ για την αποστείρωση άχυρου οι συνθήκες ήταν 121°C για 20 min.

Εμβόλιο βιοαντιδραστήρα

Για τον εμβολιασμό του βιοαντιδραστήρα χρησιμοποιήθηκαν κωνικές φιάλες 250 ml οι οποίες είχαν αποστειρωθεί στους 110 °C για 40 λεπτά. Οι φιάλες περιείχαν τα παρακάτω μεταλλικά άλατα: 1.00 g/L KH_2PO_4 , 0.30 g/L $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, 0.30 g/L $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 10.0 g/L $(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$, 6.94 g/L $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ και 9.52 g/L $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ καθώς επίσης και 20 g/L σπαδικά αραβοσίτου και 20 g/L υπόλειμμα βύνης.

Ένα διάλυμα 15 mL απιονισμένου νερού που περιείχε 100 μL TWEEN 80 προστέθηκε στο σωλήνα με τον αποθηκευμένο μικροοργανισμό και όγκος 5 mL από αυτό μεταφέρθηκε κάθε κωνική φιάλη. Τέλος ο επωασμός της προκαλλιέργειας έγινε σε θερμοκρασία 30 °C για 3 ημέρες στις 250 στροφές ανά λεπτό σε περιστροφικό αναδευτήρα .

Βιοαντιδραστήρας

Για την παραγωγή των ενζύμων χρησιμοποιήθηκε κυλινδρικός αντιδραστήρας 20 λίτρων της εταιρίας MBR. Ο λειτουργικός όγκος του βιοαντιδραστήρα ήταν 16 L. Η ταχύτητα ανάδευσης ρυθμιζόταν ανάλογα με τις συνθήκες του πειράματος. Η παροχή αέρα στον αντιδραστήρα προσαρμοζόταν έτσι ώστε το διαλυμένο οξυγόνο της καλλιέργειας να είναι πάντα σε τιμές μεγαλύτερες του 20%. Η μέτρηση του οξυγόνου γίνεται με ηλεκτρόδιο οξυγόνου Ingold O_2 (Ingold, Steinbach, Germany).

Το μέσο της καλλιέργειας αποστειρώνεται *in situ* για 40 λεπτά στους 120 °C. Αυτό αποτελείται από υπόλειμμα βύνης και σπάδικα αραβοσίτου (40g/L) σε αναλογία 2-1. Περιέχει επίσης και τα μεταλλικά άλατα που προαναφέραμε.

Μετά το πέρας της ανάπτυξης η καλλιέργεια συλλέχθηκε και φυγοκοκεντρήθηκε στις 14,000 στροφές ανά λεπτό (4 °C) για 20 λεπτά. Τελικά το υπερκείμενο υγρό συμπικνώθηκε σε συσκευή Amicon με μεμβράνη υπερδιήθησης 10,000. Το τελικό συμπύκνωμα διατηρήθηκε στους -18 °C και χρησιμοποιήθηκε στις υδρολύσεις.

Παραλαβή κυττάρων

Κατά τη διαδικασία της παραλαβής κυττάρων, γίνεται ανάπτυξη του **Fusarium oxysporum** σε γλυκόζη (40g/Lt). Οι φιάλες περιείχαν τα παρακάτω μεταλλικά άλατα: 1.00 g/L KH_2PO_4 , 0.30 g/L $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, 0.30 g/L $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 10.0 g/L $(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$, 6.94 g/L $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ και 9.52 g/L $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$. Η ανάπτυξη πραγματοποιήθηκε σε περιστροφικό αναδευτήρα (200 rpm), σε θερμοκρασία 30 °C για 4 ημέρες. Στη συνέχεια έγινε φυγοκέντρηση σε 10000rpm. Παρελήφθησαν κύτταρα στη μορφή πολτού σε ποσοστό 15% cell/matter.

Μέτρηση πρωτεϊνών (Lowry method)

Ο προσδιορισμός πρωτεϊνών με τη μέθοδο Lowry είναι μια βιοχημική ανάλυση για τον προσδιορισμό του συνολικού επιπέδου της πρωτεΐνης σε ένα διάλυμα. Πέρα από την ενεργότητα διαπιστώνεται και η δράση των ενζύμων. Η μέθοδος συνδυάζει τις αντιδράσεις των ιόντων χαλκού με τους δεσμούς των πεπτιδίων σε αλκαλικό περιβάλλον με την οξείδωση των αρωματικών καταλοίπων πρωτεΐνης. Η μέθοδος Lowry βασίζεται στην αντίδραση του Cu^+ , που παράγεται από την οξείδωση του ομόλογου πεπτιδίου με το αντιδραστήριο **Folin-Ciocalteu** (ένα μείγμα φωσφοβολφραμικού οξέος και φωσφομολυβδαινικού οξέος στο Folin-Ciocalteu αντίδραση). Ο μηχανισμός αντίδρασης δεν είναι πλήρως κατανοητός, αλλά συνεπάγεται με τη μείωση του αντιδραστήριου Folin και την οξείδωση των αρωματικών υπολειμμάτων. Με απορρόφηση στα 750 nm μετρείται η συγκέντρωση του μειωμένου αντιδραστήριου Folin.

Σύμφωνα με τη μέθοδο Lowry, χρησιμοποιήθηκαν αρχικά τέσσερα αποθεματικά αντιδραστήρια (Stock reagents). Το "Α" περιείχε 1% (w/v) θειικό χαλκό (copper sulphate (CuSO_4)). Το "Β" περιείχε 2% (w/v) sodium potassium tartrate. Το "Γ" περιείχε 0,2M καυστικού νατρίου (sodium hydroxide (NaOH)). Το "Δ" περιείχε 4% (w/v) ανθρακικό νάτριο (sodium carbonate stable (Na_2CO_3)). Σε 49 ml από το "Γ" προστίθενται 49 ml του "Δ". Τότε προστίθενται 1ml από το "Α" και 1ml από το "Β". Έτσι σχηματίζεται το αντιδραστήριο "Ε" που ετοιμάστηκε «φρέσκο». Στη συνέχεια σχηματίζεται το αντιδραστήριο "F" με την προσθήκη 10ml Folin-Ciocalteu και 10ml H_2O . Παίρνουμε 0,5 ml δείγματος και του προσθέτουμε 2,5ml "Ε". Αναδεύεται και αφήνεται για 10 min. Προσθέτουμε 0,25ml "F". Αναδεύεται το υπάρχον μίγμα και αφήνεται για 30 min. Το τελικό βήμα είναι η μέτρηση της απορρόφησης στα 750nm.

Προϋδρόλυση- Προκατεργασία άχυρου

Η αυξανόμενη ζήτηση για υγρά βιοκαύσιμα με τη μορφή αιθανόλης πρόσφατα οδήγησε στην κατασκευή ενός πιλοτικού εργοστασίου παραγωγής αιθανόλης από λιγνοκυτταρινούχα υλικά. Η Καναδική εταιρεία Iogen έχει παραξεί από το 2004 αιθανόλη με βάση την κυτταρίνη στην μονάδα επίδειξης τους. Στη Σουηδία μια πιλοτική μονάδα για την παραγωγή αιθανόλης από ξύλο εγκαινιάστηκε το 2004. Η δανική Elsam A / S μονάδα παραγωγής ηλεκτρικής ενέργειας από το 2002 έχει συντονίσει ένα έργο της EE (IBUS) με στόχο το κόστος και την ενεργειακά αποδοτική ενσωμάτωση της παραγωγής θερμότητας και ενέργειας με την παραγωγή υγρών βιοκαυσίμων από λιγνοκυτταρινούχα υλικά. Στο IBUS, ένα 1.000 kg / h πιλοτικό εργοστάσιο για προεπεξεργασία, ενζυματική υδρόλυση και ζύμωση τέθηκε σε λειτουργία το 2005 (Thomsen et al., 2006).

Ένας σημαντικός παράγοντας στη διαδικασία της οικονομικής και της ενεργειακής ισορροπίας είναι η συγκέντρωση των στερεών στο ρεύμα εισόδου στο στάδιο της υδρόλυσης. Στη βιομηχανία αιθανόλης καυσίμου, οι πολύς υψηλής βαρύτητας (VHG) ζυμώσεις βασισμένες στο άμυλο με ένα στερεό περιεκτικότητας άνω του 30% είναι πλέον κοινή πρακτική. Με την αύξηση της συγκέντρωσης σε στερεά, η περιεκτικότητα σε σάκχαρα και κατά συνέπεια η τελική συγκέντρωση αιθανόλης θα είναι υψηλότερες. Αυτό έχει σημαντική επίδραση στην κεφαλαιουχικές δαπάνες και το κόστος παραγωγής λόγω της μείωσης του μεγέθους του εξοπλισμού (δεξαμενές και στήλη απόσταξης κ.λπ.) και μειωμένη χρησιμοποίηση της ενέργειας για την απόσταξη. Για περισσότερους τύπους λιγνοκυτταρινούχου υλικού απαιτείται μια στερεά συγκέντρωση άνω του 15% (w / w) ξηράς ουσίας (DM) (υποθέτοντας μια απόδοση της αιθανόλης στα 0,5 g / g). Δυστυχώς, το να λειτουργεί η υδρόλυση σε συγκεντρώσεις στερεών πάνω από 10% -15% (w / w) δημιουργεί τεχνικά προβλήματα. Το αρχικό ιξώδες του υλικού σε αυτές τις συγκεντρώσεις είναι πολύ υψηλό, γεγονός που καθιστά δύσκολη την ανάμιξη και η κατανάλωση ενέργειας στους αντιδραστήρες ανάδευσης γίνεται υψηλή. Ένα άλλο πρόβλημα που συνδέεται με την εφαρμογή υψηλότερων συγκεντρώσεων στερεών είναι η αυξανόμενη συγκέντρωση των αναστολέων, όπως οξικό οξύ, φουρφοουράλη, 5 -υδροξυμεθυλο φουρφοουράλη, φαινολικές και προϊόντα με υποβάθμιση της λιγνίνης, τα οποία συνήθως σχηματίζονται κατά τη διάρκεια ιδιαίτερα της όξινης καταλυτικής προεπεξεργασίας. Για να διατηρηθεί η κατανάλωση ενέργειας σε χαμηλά επίπεδα, η αρχική μηχανική κατεργασία των λιγνοκυτταρινούχων υλικών πρέπει να ελαχιστοποιείται. Παράδειγμα λιγότερου ενεργειοβόρου σχεδίου αποτελεί το IBUS όπου η δομή του άχυρου είναι εν μέρει ανέπαφη δηλαδή το προεπεξεργασμένο υλικό περιέχει ένα σημαντικό ποσού μεγάλων σωματιδίων. Η παρουσία μεγάλων σωματιδίων σε συνδυασμό με την υψηλή

περιεκτικότητα σε στερεά κατέχουν μια μεγάλη πρόκληση για τον χειρισμό του υλικού στην ενζυματική υδρόλυση. Παρακάτω παρουσιάζεται το σχέδιο αντιδραστήρα για την προϋδρόλυση άχυρου σιταριού με συγκεντρώσεις στερεών έως και 40% (w / w) με τη χρήση ενζύμων.

Πρώτες Ύλες

Το άχυρο σίτου (*Triticum aestivum* L.) καλλιεργήθηκε στο Funen (Δανία) το 2004, όπου έγινε και η συγκομιδή του. Το άχυρο ήταν αφήνεται να στεγνώσουν στον αγροτικό χώρο και στη συνέχεια πιέζεται σε μεγάλες μπάλες. Τα ξηρά δέματα ήταν αποθηκευμένα σε θερμοκρασία περιβάλλοντος. Πριν από τη χρήση του, το άχυρο κόπηκε σε κομμάτια μέχρι 6-10 εκατοστά από τη New Holland FX375 θεριζοαλωνιστική μηχανή και αποθηκεύονται σε "containers" σε θερμοκρασία περιβάλλοντος. Το περιεχόμενο της ξηρής ύλης (DM) ήταν περίπου το 90% (w / w).

Προκατεργασία

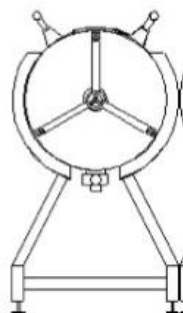
Η προεπεξεργασία πραγματοποιήθηκε στην πιλοτική μονάδα IBUS στο Fynsværket της Odense, στη Δανία (Thomsen et al., 2006). Τρεις παρτίδες του προεπεξεργασμένου άχυρου παρήχθησαν (άχυρο A, B, και Γ), ως μέρος του ελέγχου της μονάδας προεπεξεργασίας. Οι συνθήκες προεπεξεργασίας ήταν: ο ρυθμός τροφοδοσίας ήταν 75 kg άχυρο ανά ώρα ($\frac{1}{4}$ 67,5 kg DM / h) για το άχυρο A και 50 kg άχυρο ανά ώρα (45 κιλά $\frac{1}{4}$ DM / h) για το άχυρο B και C. Το άχυρο εμποτίζεται στο νερό στους 808 °C για 6 λεπτά και στη συνέχεια μεταφέρεται στον αντιδραστήρα. Για άχυρο A ο χρόνος παραμονής στον αντιδραστήρα ήταν κατά μέσο όρο 6 λεπτά και τον αντιδραστήρα θερμοκρασία διατηρήθηκε σε 1958 °C με την έγχυση ατμού. Για άχυρο B η θερμοκρασία ήταν 1958 °C και ο χρόνος παραμονής στα 12 λεπτά. Για το άχυρο C η θερμοκρασία ήταν 2058 °C και ο χρόνος παραμονής 6 λεπτά. Για όλα τα πειράματα η αντιρροή ροή του νερού ήταν 250 L / h. Χημικές ουσίες δεν προστέθηκαν στο νερό ή μαζί με τον ατμό. Το προεπεξεργασμένο άχυρο έξω από τον αντιδραστήρα είχε μεταξύ 23% και 28% (w / w) DM. Το προεπεξεργασμένο άχυρο συλλέχθηκε σε μεγάλες πλαστικές σακούλες ζυγίζοντας περίπου 30-50 κιλά και φυλάχθηκαν στους 4 °C για 1-5 μήνες πριν χρησιμοποιηθεί. Το προεπεξεργασμένο άχυρο ήταν για χρήση για την ενζυματική ρευστοποίηση, τη σακχαροποίηση, και τη ζύμωση [Henning Jørgensen, et al., 2006].

Ρευστοποίηση, Σακχαροποίηση, και Ζύμωση και παρουσίαση του Mixer

Η ρευστοποίηση και η σακχαροποίηση έγιναν με τη χρήση ενός μίγματος ενζύμου που αποτελείται από Celluclast 1,5 FG L και Novozym 188 (και τα δυο από Novozymes A / S, Bagsvaerd, Δανία), σε αναλογία βάρους 5:1 (v/v). Η ενεργότητα αυτού του μίγματος ήταν 83 FPU / g όπως μετρήθηκε από Filter paper assay (Wood and Bhat, 1988).

Ρευστοποίηση και Σακχαροποίηση σε αντιδραστήρα ρευστοποίησης

Ένας αντιδραστήρας ρευστοποίησης σχεδιάστηκε για την ρευστοποίηση και την σακχαροποίηση σε στερεές συγκεντρώσεις άνω του 20% (w / w) DM (Εικ. 11).



Εικόνα 11: Διάγραμμα παρουσίασης του αντιδραστήρα ρευστοποίησης (mixer)

Ο αντιδραστήρας αποτελείται από ένα τοποθετημένο οριζόντιο σφαιρικό τμήμα. Ένας περιστρεφόμενος οριζόντιος άξονας τοποθετείται με τρία πτερόγια για να χρησιμεύσουν στην ανάμιξη (Εικ.12). Το μοτέρ 1,1 kW, που χρησιμοποιήθηκε για να δώσει κίνηση και περιστροφή στο σύστημα μετρήθηκε στις 2,5 με 16,5 rpm (Εικ.13). Ο κατεύθυνση της

περιστροφής ήταν προγραμματισμένη να περιστρέφεται κατά τη φορά του δείκτη του ρολογιού και αντίθετα . Το γεμάτο με λάδι θερμαντικό μέσο στο εξωτερικό του συστήματος επέτρεψε τον έλεγχο της θερμοκρασίας μέχρι 80 °C. Σύστημα ψύξης δεν έχει εγκατασταθεί. Τα πειράματα έγιναν χρησιμοποιώντας 5 kg από άχυρο (30%DM) με προσθήκη ενζύμων 5 FPU / g DM και ρυθμισμένο pH στο 5,5 .Μετά από 15-30 λεπτά ισορροπίας η θερμοκρασία φθάσει το 50 ± 1 °C. Ο συνολικός χρόνος παραμονής είναι 6 h.Η θερμοκρασία κατά τη διάρκεια της ρευστοποίησης και σακχαροποίησης μετράται στους 50 ± 1 °C (Jorgensen et al. 2006).



Εικόνα 12: mixer



Εικόνα 13 : Το μοτέο

Factorial Experimental Design

Για να εξεταστεί το συνδυασμένο αποτέλεσμα των ενζύμων και των κυττάρων για την παραγωγή αιθανόλης από τον *Fusarium oxysporum* σε προκατεργασμένο άχυρο σίτου, χρησιμοποιήθηκε η μεθοδολογία επιφάνειας απόκρισης (RSM). Για το λόγο αυτό, 3² κεντρικά σύνθετα σχέδια εφαρμόστηκαν για τη δημιουργία 11 συνδυασμών επεξεργασίας. Τα κωδικοποιημένα επίπεδα για κάθε υπό εξέταση παραμέτρο και τα πειραματικά αποτελέσματα για την δύο-παραγόντων- δύο επιπέδων επιφανειακή ανάλυση φαίνονται στον Πίνακα 4. Αυτό το σχέδιο εκπροσωπείται από ένα δεύτερης τάξης πολυωνυμικό μοντέλο παλινδρόμησης (eq 1) για τη δημιουργία περιγραμμάτων.

$$\text{Eq 1. : } P = a_0 + a_1 \cdot x_1 + a_2 \cdot x_2 + a_3 \cdot x_1^2 + a_4 \cdot x_2^2 + a_5 \cdot x_1 \cdot x_2$$

Κατεργασία	Coding setting level (X1= FPU/g DM, X2=Cells mg/g DM)		Actual level (X1= FPU/g DM, X2=Cells mg/g DM)		EtOH (g/l)
	X1	X2	X1	X2	
1	-1	-1	2	30	44,8
2	1	-1	6	30	57,2
3	-1	1	2	70	55,3
4	1	1	6	70	62,4
5	0	0	4	50	52,2
6	0	0	4	50	53,3
7	-1.414	0	1,2	50	55,0
8	1.414	0	6,8	50	56,1
9	0	-1.414	4	21,8	53,7
10	0	1.414	4	78,2	55,9
11	0	0	4	50	52,7

Πίνακας 4: The coded levels for the parameters examined on the factorial design

Μετρήσεις ενζυμικών ενεργοτήτων

Κυτταρινάσες (Filter paper activity)

Για τον προσδιορισμό της δραστηρότητας των κυτταρινάσων χρησιμοποιήθηκε ως υπόστρωμα διηθητικό χαρτί Watman No 1 (50 mg)(6cm*1cm). Το αντιδρών μίγμα που περιείχε το διηθητικό χαρτί, 1 ml ρυθμιστικού διαλύματος pH=6 και 500 μl ενζυμικού διαλύματος. Επώαστηκε στους 50 °C σε θερμαινόμενο αναδευτήρα Eppendorf (1300 rpm) για 60min.

Ο υπολογισμός της απελευθερούμενης γλυκόζης έγινε σύμφωνα με τη μέθοδο του δινιτροσαλικυλικού οξέος (DNS). Ως 1 Unit εξωγλυκανάσης ορίζεται η ποσότητα του ενζύμου που απελευθερώνει 1 μmole γλυκόζης ανά min, στους 50 °C, σε pH 6.

Σύμφωνα με τη μέθοδο του δινιτροσαλικυλικού οξέος, σε 250 μl δείγματος προστίθενται 250 μl διαλύματος DNS. Πραγματοποιείται βρασμός για 5min. Ακολουθεί προσθήκη 2 ml απιονισμένου νερού και φωτομέτρηση στα 540nm [Miller 1959].

Ενδογλυκανάσες

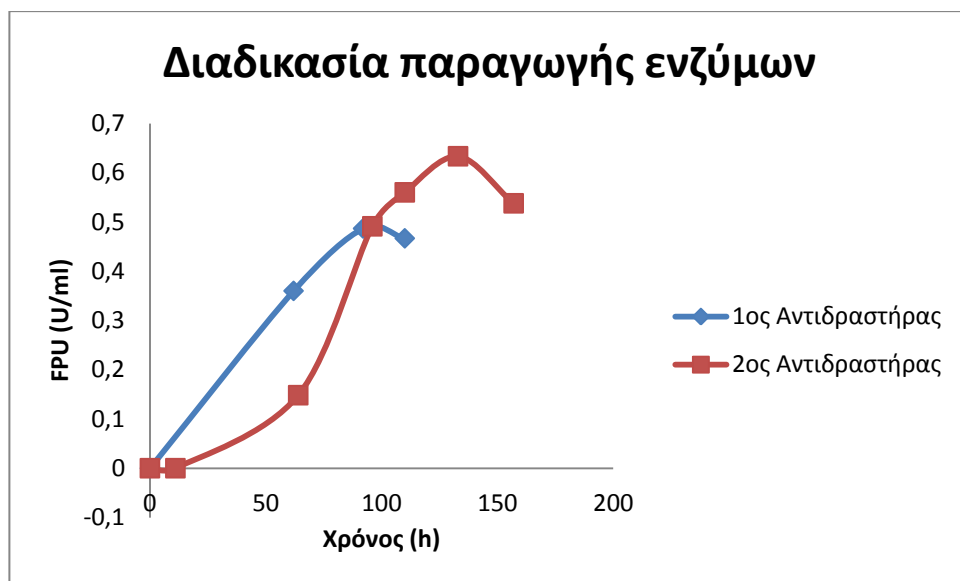
Για τον προσδιορισμό της δραστηρότητας των ενδογλυκανάσων χρησιμοποιήθηκε ως υπόστρωμα καρβοξυ-μεθυλ-κυτταρίνη (Sigma, low viscosity), συγκέντρωσης 4% w/v σε ρυθμιστικό διάλυμα κιτρικού οξέος – όξινου φωσφορικού νατρίου 100 mM, pH 5. Το αντιδρών μίγμα που περιείχε 225 μl διαλύματος καρβοξυ-μεθυλ-κυτταρίνης και 25 μl ενζυμικού διαλύματος επώαστηκε στους 50 °C σε υδατόλουτρο για 10min. Ο υπολογισμός της απελευθερούμενης γλυκόζης έγινε σύμφωνα με τη μέθοδο του δινιτροσαλικυλικού οξέος (DNS). Ως 1 Unit β-1,4-ενδογλυκανάσης ορίζεται η ποσότητα του ενζύμου που απελευθερώνει 1 μmole γλυκόζης ανά min, στους 50 °C, σε pH 6.

β-Γλυκοζιδάσες

Η ενεργότητα της β-γλυκοζιδάσης μετρήθηκε χρησιμοποιώντας ως υπόστρωμα 1 mM pNP-glucose σε ρυθμιστικό διάλυμα 50 mM κιτρικών-φωσφορικών, pH 6. Ο ενζυμικός προσδιορισμός έγινε με επώαση στους 45 °C για 10 min και οι αντιδράσεις ξεκίνησαν με την προσθήκη 50 μl ενζυμικού δείγματος σε συνολικό όγκο αντίδρασης 250 μl. Η A410 της p-νιτροφενόλης που απελευθερωνόταν μετρήθηκε χρησιμοποιώντας ένα (Microplate) Φασματοφωτόμετρο της SPECTRAMax (Molecular Devices). Οι ενεργότητες εκφράζονται σαν International Units (ή mU), που σημαίνει ότι 1 U καθορίζεται ως το ποσό του ενζύμου που απαιτείται για την απελευθέρωση 1 μmol νιτροφενόλης ανά λεπτό.

Κεφάλαιο 5: Αποτελέσματα – Σχολιασμός

5.1 Ανάπτυξη του μύκητα *Fusarium oxysporum* σε βιοαντιδραστήρα βυθισμένης καλλιέργειας για την παραγωγή ενζύμων.



Διάγραμμα 1: Γραφική απεικόνιση των units ενζύμων που παράγονται ανά ml σε σχέση με τον χρόνο σε κάθε αντιδραστήρα

Για την παράγωγή ενζύμων πραγματοποιήθηκαν δύο πειράματα σε δύο διαφορετικές χρονικές περιόδους. Όπως παρατηρούμε και από το διάγραμμα, η παραγωγή ενζύμου στον πρώτο αντιδραστήρα σταμάτησε στις 110 h ενώ στον δεύτερο αντιδραστήρα συνεχίστηκε μέχρι και τις 157 h. Καθώς επίσης παρατηρούμε και μεγαλύτερο ποσοστό παραγωγής ενζύμων στον δεύτερο αντιδραστήρα (στα 0,54 U/ml σε σύγκριση με τα 0,47 U/ml του πρώτου αντιδραστήρα). Αυτό μπορεί να οφείλεται σε διαφορετικές συνθήκες εμβολιασμού ή σε κακές συνθήκες ανάπτυξης του μύκητα στον πρώτο αντιδραστήρα. Οι συνθήκες ανάπτυξης του μύκητα (το pH, το O_2 , ο άνθρακας, το άζωτο, τα ανόργανα συστατικά παρόντα στο υπόστρωμα, η συγκέντρωση του υποστρώματος, η θερμοκρασία) μπορεί να μην ήταν και οι καλύτερες δυνατές για το επιθυμητό αποτέλεσμα που είναι η παραγωγή ενζύμων. Τέλος, εξωτερικοί παράγοντες κατά την πειραματική διαδικασία πιθανότητα επηρέασαν τις συνθήκες παραγωγής ενζύμων.



Εικόνα 14: Εργαστηριακοί βιοαντιδραστήρες βυθισμένης καλλιέργειας που χρησιμοποιήθηκαν για την παραγωγή ενζύμων από τον *F. oxysporum*.

Παρακάτω παρατίθενται πίνακες με τα αποτελέσματα από τη διαδικασία συμπύκνωσης των ενζύμων στους δύο αντιδραστήρες :

Διαδικασία Συμπύκνωσης	1 ^{ος} αντιδραστήρας	2 ^{ος} αντιδραστήρας
	FPU	FPU
Φυγοκέντρωση	5120	7265,6
Υπερδιήθηση	4700	5515,6
Καθίζηση	2324,5	4121,9

Πίνακας 5: Αποτελέσματα από τη διαδικασία συμπύκνωσης των ενζύμων στους δύο αντιδραστήρες

Παρατηρούμε ότι μετά τη διαδικασία της φυγοκέντρωσης παίρνουμε ένα συγκεκριμένο αριθμό FPU για τον καθένα αντιδραστήρα, με σημαντική διαφορά μεταξύ του ποσού του δεύτερου από τον πρώτο. Όσο προχωράμε στα επόμενα βήματα της διαδικασίας συμπύκνωσης τα FPU μειώνονται ποσοστιαία κατά 10% για φυγοκέντρωση-υπερδιήθηση και περίπου 40%-50% για υπερδιήθηση-καθίζηση στον πρώτο αντιδραστήρα και κατά 20% για φυγοκέντρωση-υπερδιήθηση και υπερδιήθηση-καθίζηση στον δεύτερο αντιδραστήρα. Τα αποτελέσματα αυτά θεωρούνται φυσιολογικά αν σκεφτούμε ότι με τις παραπάνω διαδικασίες συμπυκνώνουμε τα ένζυμα και τα παραλαμβάνουμε πιο καθαρά.

Το τελικό ενζυμικό μίγμα που πήραμε ήταν στην ουσία η ένωση των δύο παραπάνω πειραμάτων.

<i>Τελικό</i>	<i>FPU/gr</i>	<i>mg πρωτεΐνης/gr καταβυθισμένου ενζύμου</i>	<i>FPU/gr πρωτεΐνης</i>
<i>ενζυμικό μίγμα</i>	39,5	172,5	174

Πίνακας 6: Αποτελέσματα ενζυμικού μίγματος

Στο τελικό ενζυμικό μίγμα μετρήθηκε η ενεργότητα των ενζύμων σε ένα ικανοποιητικό ποσό 39,5 (FPU/gr),δηλαδή την ποσότητα των ενζύμων που είναι ενεργά και δρουν ικανοποιητικά. Με mg πρωτεΐνης/gr καταβυθισμένου ενζύμου προσδιορίσαμε το πόσα στο σύνολο ένζυμα (ενεργά και μη) υπάρχουν. Με τα FPU/gr πρωτεΐνης διαπιστώνουμε την ενεργότητα των ενζύμων ανά gr πρωτεΐνης.

5.2 Διεργασία της προϋδρόλυσης άχυρου σίτου

Η συγκεκριμένη διεργασία πραγματοποιήθηκε στους 50°C για 6h με ένζυμα 5FPU/gr DM. Αρχικά ξηράναμε 5 kg άχυρου σιταριού (με σκοπό την απομάκρυνση της περιεχόμενης υγρασίας σε αυτήν την ποσότητα αχύρου) σε φούρνο στους 60 °C. Αφού έγινε άλεση του αχύρου, ώστε να είναι ένα δείγμα ομοιογενές και χωρίς μεγάλα συμπαγή κομμάτια, το αναμίξαμε με τα εμπορικά ένζυμα Celluclast 1,5 FG L και Novozym 188 σε αναλογία όγκου 5:1 (v/v) (Εικ.15).



Εικόνα 15: Άχυρο μαζί με τα εμπορικά ένζυμα και το ρυθμιστικό διάλυμα

Αφού προθερμάναμε το μίξερ ώστε να αποκτήσει θερμοκρασία γύρω στους 50°C (χρήση λαδιού ως θερμαντικό μέσο στο κάτω τετραγωνικό κομμάτι της διάταξης), εισάγαμε το παραπάνω μίγμα (Εικ.16).



Εικόνα 16: Λίγο πριν θέσουμε σε λειτουργία το mixer

Το αποτέλεσμα που επιθυμούμε και που θα προκύψει είναι ένα ρευστό μίγμα στη μορφή «λάσπης»(Εικ.19). Ωστόσο κατά τη διάρκεια της διεργασίας διακόπταμε τη λειτουργία για λίγα δευτερόλεπτα για να παρατηρήσουμε το στάδιο της μορφής του μίγματος μας (Εικ.17,18).



Εικόνα 17: Κατά τη διάρκεια της διεργασίας στο διάστημα των 6h



Εικόνα 18:Κατά τη διάρκεια της διεργασίας στο διάστημα των 6h



Εικόνα 19:Στο τέλος της διεργασίας

Κατά τη διαδικασία της προϋδρόλυσης η κυτταρίνη και η ημικυττάρηνη (πολυσακχαρίτης) που βρίσκεται στο άχυρο διασπάται σε ολιγοσακχαρίτες (π.χ κελλοβιόζη) με τη βοήθεια των ενζύμων που προσθέσαμε .Αυτή η διάσπαση στη δομή της κυτταρίνης δημιουργεί και μείωση του ιξώδες στο αρχικό μίγμα. Στο αρχικό μίγμα το ιξώδες ήταν στα 10000 cP και στο τελικό μίγμα μετρήθηκε στα 3000 cP. Έτσι το μίγμα ήταν ένα ρευστό με χαμηλό ιξώδες, όπως ήταν φυσιολογικό λόγω της αλλαγής της δομής της κυτταρίνης.

Αφού παραλάβουμε το μίγμα (Εικ.20), το αποθηκεύουμε σε ειδικές σακούλες ασφαλείας και το καταψύχουμε.

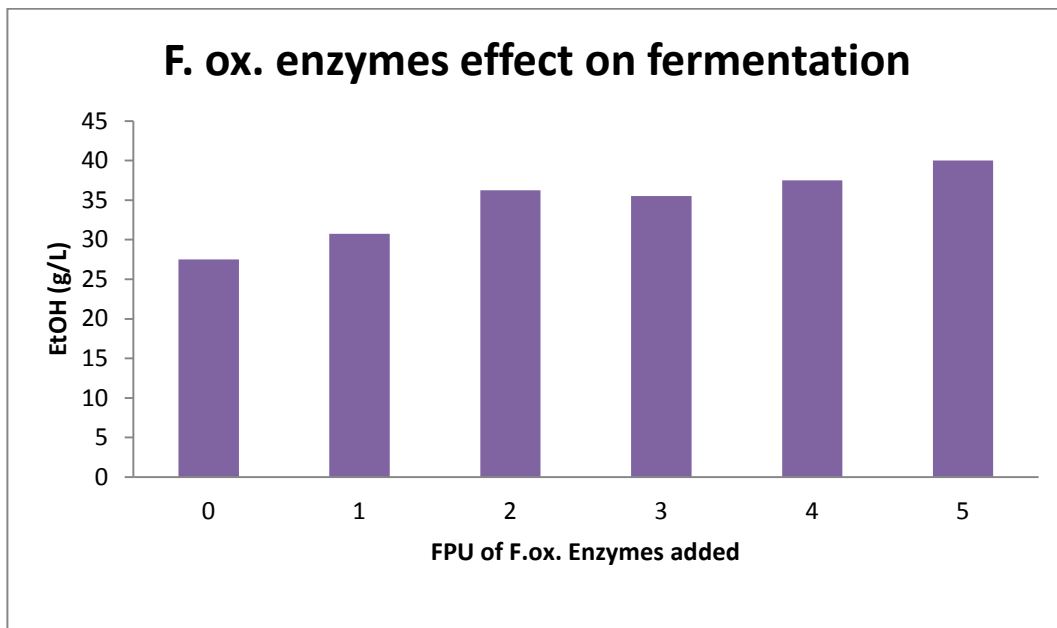


Εικόνα 20: Η παραλαβή του μίγματος

Η προϋδρόλυση θεωρείται μια διεργασία που έχει βασικό ρόλο το να επιτύχουμε όσο το δυνατόν καλύτερο αποτέλεσμα. Με την προϋδρόλυση «προετοιμάζουμε το έδαφος» στη δουλειά που θα κάνει η ζύμη και ο *Fusarium oxysporum*, δηλαδή την μεταβολίση των σακχάρων καθώς και στη δουλειά που θα κάνουν τα ένζυμα, να υδρολύσουν την κυτταρίνη.Επειδή τα ένζυμα στην ποσότητα που είναι δεν μπορούν από μόνα τους να υδρολύσουν ολή την απαιτούμενη ποσότητα DM ,με την προϋδρόλυση έχουμε συνεισφέρει σε ένα μεγάλο κομμάτι στη διάσπαση της δομής της κυτταρίνης και της ημικυτταρίνης και την παραγωγή ολιγοσακχαριτών.

5.3 Μελέτη του μύκητα *Fusarium oxysporum* στη ζύμωση του PPWS (Pro-hydrolyded Pre-treated Wheat Straw) με τη χρήση ενζύμων

F.ox Enzyme effect on SSF
5 FPU Celluclast - Novozyme 5/1 + F.ox Enzymes



Διάγραμμα 2: Γραφική απεικόνιση των αποτελεσμάτων παραγωγής αιθανόλης (EtOH) στο πείραμα με τη χρήση ενζύμων του *Fusarium oxysporum*

Συνθήκες πειράματος : 30°C, 5mg *Saccharomyces cerevisiae* /gr DM, 26%DM, pH=5.5, 80rpm (shaker)

Αφού ολοκληρώθηκε η προϋδρολύση του αχύρου, χρησιμοποιούμε το μίγμα που παραλάβαμε για το συγκεκριμένο πείραμα και το επόμενο που θα ακολουθήσει .

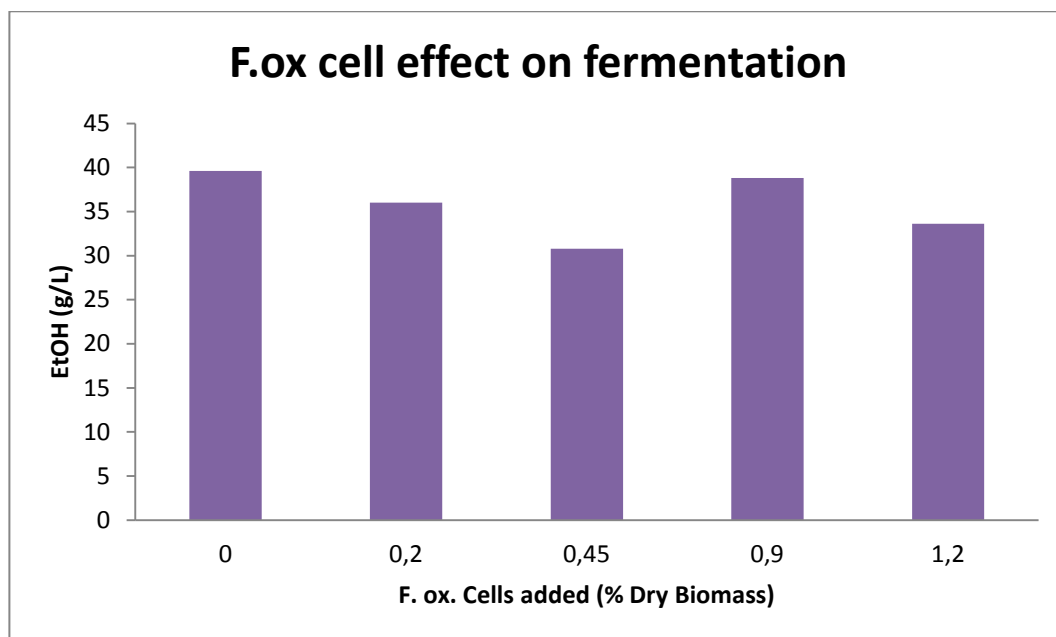
Αρχικά βάζουμε το προϋδρολυμένο άχυρο σε ένα υδατόλουτρο και προσπαθούμε αναδεύοντας τακτικά να το ομογενοποιήσουμε στους 70°C .Η συγκεκριμένη θερμοκρασία είναι το όριο απενεργοποίησης των ενζύμων (εμπορικών) που είχαμε εισάγει στη διαδικασία της προϋδρολύσης. Με την ενέργεια αυτή παραλαμβάνουμε το προϋδρολυμένο άχυρο «καθαρό» και χωρίς ένζυμα που θα επηρεάσουν εσφαλμένα τα αποτελέσματα μας καθώς σκοπός μας είναι η μέτρηση της δραστηριότητας των ενζύμων του *Fusarium oxysporum* και μόνο. Αφότου ξαναψυχθεί το μίγμα και το ξεπαγώσουμε προσθέτουμε το

συμπύκνωμα ένζυμων που παραλάβαμε από το πείραμα με τον βιοαντιδραστήρα ,τη ζύμη *Saccharomyces cerevisiae*, τα εμπορικά ένζυμα Celluclast-Novozyme σε κατάλληλες ποσότητες. Εισάγουμε ισόποσα σε 10 κωνικές φιάλες το μίγμα(με διαφορετικά FPU ανά δύο φιάλες), τις τοποθετούμε στο shaker για συνολικά 148 h ώστε να ολοκληρωθεί η αναερόβια ζύμωση. Καθημερινά παίρνουμε δείγμα ποσότητας από κάθε φιάλη ώστε να έχουμε μια ολοκληρωμένη άποψη για την πορεία της ζύμωσης. Τα δείγματα που παίρνουμε καθημερινά για να τα επεξεργαστούμε στο HPLC, τα αραιώνουμε πρώτα, έπειτα τα αναδεύουμε σε Vortex,τα φυγοκεντρούμε για 10 min,παραλαμβάνουμε το υπερκείμενο και τα τοποθετούμε σε vials.Τα vials εισάγονται για επεξεργασία στο HPLC. Τα αποτελέσματα φαίνονται στο Διάγραμμα 2.

Σύμφωνα με τη γραφική απεικόνιση των αποτελεσμάτων για τις 148 h (ημέρα μεγαλύτερης παραγωγής EtOH) παρατηρούμε ότι υπάρχει μια σταδιακή και ανοδική αύξηση της ποσότητας αιθανόλης που παράγεται καθώς αυξάνονται και τα FPU ενζύμων στις φιάλες.Είναι ένα ικανοποιητικό αποτέλεσμα καθώς μας δείχνει ότι τα ένζυμα του μύκητα μας λειτούργησαν ενεργά και βοήθησαν στην περαιτέρω υδρόλυση της κυτταρίνης ώστε η ζύμη (*Saccharomyces cerevisiae*) να έχει τη δυνατότητα να μεταβολίσει περισσότερα σάκχαρα σε αιθανόλη.

5.4 Μελέτη του μύκητα *Fusarium oxysporum* στη ζύμωση του PPWS (Pro-hydrolyded Pre-treated Wheat Straw) με τη χρήση κυττάρων

F.ox Cell effect on fermentation



Διάγραμμα 3: Γραφική απεικόνιση των αποτελεσμάτων παραγωγής αιθανόλης (EtOH) στο πείραμα με τη χρήση κυττάρων του *Fusarium oxysporum*

Συνθήκες πειράματος : 30°C, 5mg *Saccharomyces cerevisiae* /gr DM, 26%DM, pH=5.5, 80rpm (shaker)

Κατά τη διαδικασία της παραλαβής κυττάρων ,έγινε ανάπτυξη του *Fusarium oxysporum* σε γλυκόζη (Glu 40g/l). Αφού πραγματοποιήθηκε αποστείρωση στις φιάλες με τη γλυκόζη και σε όλα τα σκεύη που χρησιμοποιήθηκαν για την παρακάτω διαδικασία , αναμειγνύουμε το διάλυμα με τα μεταλλικά άλατα στις φιάλες και εμβολιάσαμε με τον *Fusarium oxysporum* (shaker για 4 μέρες)(αερόβια ζύμωση). Έπειτα φυγοκεντρήσαμε και παραλάβαμε τα κύτταρα σε μορφή πολτού σε ποσοστό 15% cell/matter.

Χρησιμοποιούμε το «καθαρό» προϋδρολυμένο άχυρο και προσθέτουμε τα κύτταρα τη ζύμη *Saccharomyces cerevisiae*, τα εμπορικά ένζυμα Celluclast και Novozyme και το Buffer σε κατάλληλες ποσότητες. Εισάγουμε ισόποσα σε 10 κωνικές φιάλες το μίγμα(με διαφορετικά FPU ανά δύο φιάλες), τις τοποθετούμε στο shaker για συνολικά 168 h ώστε να ολοκληρωθεί η αναερόβια ζύμωση. Καθημερινά παίρνουμε δείγμα ποσότητας από κάθε

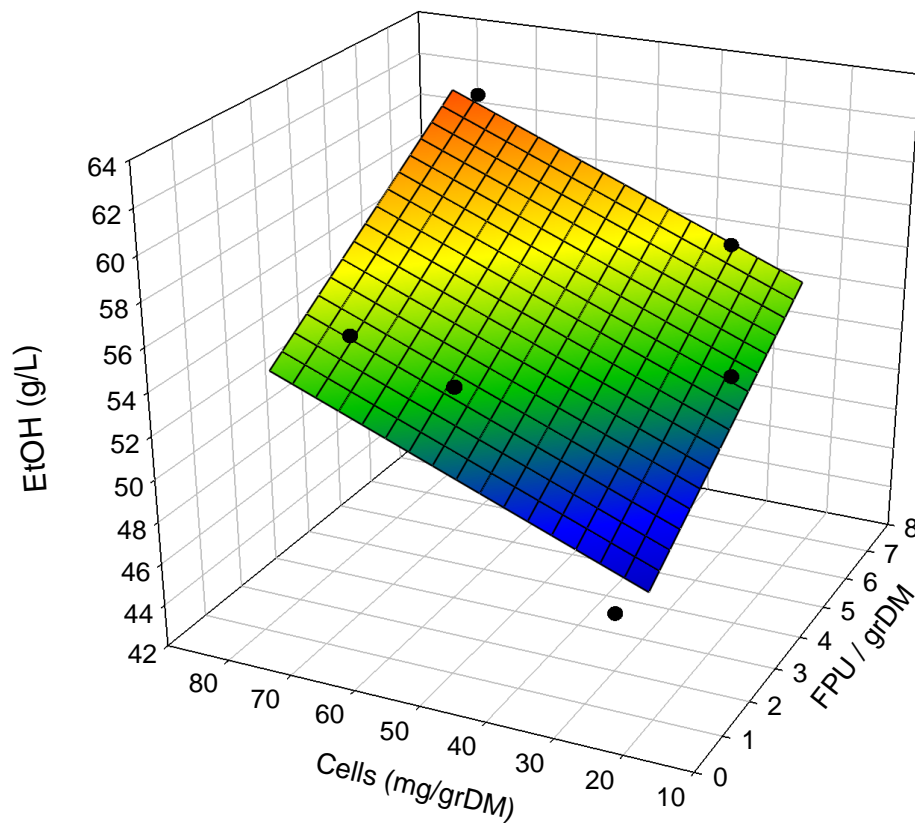
φιάλη ώστε να έχουμε μια ολοκληρωμένη άποψη για την πορεία της ζύμωσης. Τα δείγματα που παίρνουμε καθημερινά για να τα επεξεργαστούμε στο HPLC, τα αραιώνουμε πρώτα, έπειτα τα αναδεύουμε σε Vortex, τα φυγοκεντρούμε για 10 min, παραλαμβάνουμε το υπερκείμενο και τα τοποθετούμε σε vials. Τα vials εισάγονται για επεξεργασία στο HPLC. Τα αποτελέσματα φαίνονται στο Διάγραμμα 3 .

Σύμφωνα με τη γραφική απεικόνιση των αποτελεσμάτων για τις 168 h (ημέρα μεγαλύτερης παραγωγής EtOH) παρατηρούμε ότι δεν υπάρχει αύξηση της ποσότητας αιθανόλης που παράγεται αρχικά καθώς αυξάνεται και η ποσότητα των κυττάρων που προστέθηκαν αρχικά στις φιάλες. Μία μικρή αύξηση διαπιστώνουμε για την ποσότητα μάζας κυττάρων 0,9 g cells/g DM ,η οποία θεωρείται τυχαίο αποτέλεσμα και δεν είναι αρκετό για να επιβεβαιώσει την θετική επίδραση των κυττάρων στη παραγωγή αιθανόλης. Με το συγκεκριμένο αποτέλεσμα διαπιστώνουμε ότι τα κύτταρα του μύκητα μας δεν βοήθησαν στην παραγωγή αιθανόλης και δεν μετέτρεψαν τα σάκχαρα σε αιθανόλη όπως περιμέναμε. Ωστόσο αυτό μπορεί να οφείλεται στον τρόπο παραλαβής των κυττάρων. Πιο συγκεκριμένα η ανάπτυξη του μύκητα σε διάλυμα γλυκόζης μαζί με mineral και στη συνέχεια η φυγοκέντρωση του μίγματος για την παραλαβή των κυττάρων (πολτός) δεν ήταν και ο πιο κατάλληλος τρόπος. Η συνεχής καταπόνηση του μύκητα και των κυττάρων που φυγοκεντρήθηκαν μείωσε τη δραστικότητα τους καθώς επίσης με τη φυγοκέντρωση υπάρχει πιθανότητα να χάθηκε σημαντική ποσότητα χρήσιμου υλικού (κύτταρα). Παράλληλα η μεγάλη ποσότητα απελευθερωμένης γλυκόζης που βρίσκεται στο υλικό επηρεάζει τη δράση των κυττάρων. Όταν εισάγουμε τη ζύμη και τον *Fusarium oxysporum* στο προϋδROLυμένο υλικό για να γίνει η ζύμωση απαιτείται ένας χρόνος προσαρμογής του κάθε μικροοργανισμού. Στα πλαίσια αυτά η ζύμη προσαρμόζεται πιο γρήγορα με συνέπεια να παράγει πρώτη αιθανόλη. Ο *Fusarium oxysporum* αρχεί να προσαρμοστεί και με την ύπαρξη αιθανόλης από τον μεταβολισμό της ζύμης απενεργοποιείται η δράση του.

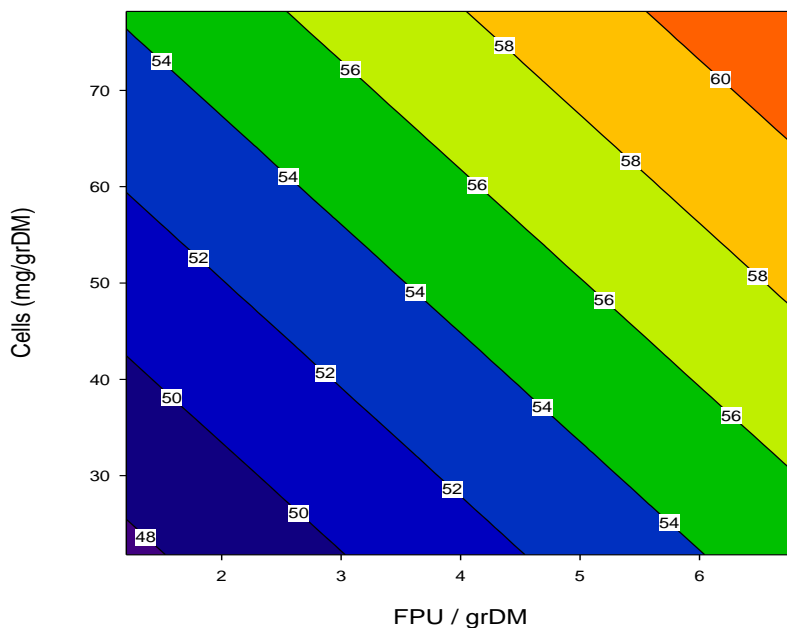
5.5 Factorial Experimental Design

Μελέτη του μύκητα *Fusarium oxysporum* στη ζύμωση του PPWS (*Pro-hydrolyded Pre-treated Wheat Straw*) με τη χρήση ενζύμων και κυττάρων

3D Graph



Διάγραμμα 4: Διάγραμμα συσχέτισης των δύο παραγόντων (cells και enzymes) στην παραγωγή αιθανόλης



Εικόνα 21: Effect of *F. oxysporum* cells and enzymes on ethanol production during SSF experiment (26% dry PWS). Contour Plot

Όπως παρατηρούμε και στο διάγραμμα συσχέτισης των δύο παραγόντων (κύτταρα και ένζυμα (cells και enzymes) του *F. Oxysporum*) (Διάγραμμα 4), η προσθήκη του *F.oxysporum* στο ταυτόχρονη σακχαροποίηση και ζύμωση SSF μπορεί να οδηγήσει σε αύξηση της παραγωγής αιθανόλης. Και τα κύτταρα και τα ένζυμα του *F.oxysporum* έχουν μια θετική επίδραση στη ζύμωση. Αυτή η προσθήκη μπορεί να οδηγήσει στο 82% της θεωρητικής παραγωγής με βάση την περιεκτικότητα σε κυτταρινικό υλικό. Οι δύο αυτοί παράγοντες φαίνεται ότι έχουν μια γραμμική επίδραση στην παραγωγικότητα. Το ενζυμικό σύστημα αυξάνει τη σακχαροποίηση και η παρουσία του *F. oxysporum* μετατρέπει την ξυλόζη σε αιθανόλη κάτι που δεν μπορεί να κάνει ο *S. cerevisiae*. Από την προκαταρκτική εξέταση του μοντέλου, ακολουθεί η εξίσωση που χρησιμοποιήθηκε για να δημιουργηθεί το διάγραμμα και το περίγραμμα (Contour Plot).

$$\text{EtOH (g/L)} = 43,3475 + 1,3285 \cdot \text{FPU/g DM} + 0,1179 \cdot \text{Cells (mg/gDM)}$$

Ο παράγοντας που έχει και τον μεγαλύτερο συντελεστή, είναι και η μεταβλητή που επηρεάζει περισσότερο θετικά την παραγωγή αιθανόλης. Στην συγκεκριμένη περίπτωση η χρήση ενζύμων είναι αυτή που συμβάλλει περισσότερο στην παραγωγή αιθανόλης, πράγμα αναμενόμενο αν ανατρέξουμε στα δύο προηγούμενα μεμονωμένα πειράματα που διεξήγαμε.

Η συγκεκριμένη εξίσωση δεν είναι απαραίτητα σωστή στατιστικά. Είναι κατά προσέγγιση. Όπως προαναφέραμε και σε προηγούμενο κεφάλαιο η εξίσωση του μοντέλου αποτελείται από όρους τετραγώνων, ωστόσο για καλύτερη προσαρμογή του διαγράμματος χρησιμοποιήσαμε την παραπάνω εξίσωση. Η αφαίρεση των μη σημαντικών όρων από το μοντέλο των τετραγώνων, έγινε καθώς από τα αποτελέσματα μας δεν καταλήξαμε σε ένα μέγιστο ή ελάχιστο, αλλά είχαμε γραμμική επίδραση. Γι αυτό δεν μπορεί και να χρησιμοποιηθεί και ως μοντέλο σε κάποιο πιθανό επόμενο πείραμα. Η εξίσωση χρησιμοποιήθηκε για την απεικόνιση του διαγράμματος και του περιγράμματος (Contour Plot). Στο διάγραμμα παρατηρείται μια συνεχή παραγωγή αιθανόλης πράγμα που παύει να ισχύει από ένα σημείο και μετά. Ακόμη και με την προσθήκη (υποθετικά) περισσότερων κυττάρων ή ενζύμων η παραγωγή αιθανόλης σταματά σε ένα μέγιστο. Το αντίθετο είναι πρακτικά αδύνατο. Το διάγραμμα συσχέτισης των δύο παραγόντων μας παρέχει μια συνολική εικόνα σύγκρισης των στοιχείων που χρησιμοποιήσαμε στη ζύμωση του μύκητα για την παραγωγή αιθανόλης και πόσο καλύτερα αποτελέσματα μπορούν να δώσουν και τα δύο μαζί.

Κεφάλαιο 6: Συμπεράσματα και Προτάσεις

Συνοψίζοντας, στην παρούσα εργασία μελετήθηκε η παραγωγή ενζύμων από το μύκητα *Fusarium oxysporum* σε βυθισμένη καλλιέργεια. Καθώς επίσης και η χρήση του συγκεκριμένου ενζυμικού συστήματος για την παραγωγή αιθανόλης από το προκατεργασμένο άχυρο σίτου.

Από τη μελέτη της ανάπτυξης του μικροοργανισμού και της παραγωγής των ενζύμων προκύπτουν τα παρακάτω συμπεράσματα:

- ❖ Το ενζυμικό εκχύλισμα που παράγεται έχει ικανοποιητικές τιμές ενεργότητας σε όλα τα απαραίτητα για τη σακχαροποίηση των κυτταρινούχων υποστρωμάτων, ένζυμα.
- ❖ Η προϋδρόλυση έχει βασικό ρόλο το να επιτύχουμε όσο το δυνατόν καλύτερο αποτέλεσμα, συνεισφέροντας στη δουλειά των ενζύμων (την υδρόλυση της κυτταρίνης) και παρέχοντας άμεσα σάκχαρα που θα μεταβολίσει ο μύκητας και η ζύμη.
- ❖ Συγκριτικά με άλλα ενζυμικά συστήματα που διατίθενται ήδη στο εμπόριο, το σύστημα του *F. oxysporum* παρουσιάζει όμοιες ιδιότητες. Οι ενεργότητες του συμπυκνωμένου συστήματος είναι πολλαπλάσιες αυτών του εμπορικού σκευάσματος. Άμεσα συγκρίσιμες είναι και οι ενεργότητες που μετρήθηκαν στη διάρκεια της καλλιέργειας .
- ❖ Ο *F. Oxysporum* έχει την ικανότητα να μετατρέπει άμεσα τη λιγνοκυτταρινούχα βιομάζα σε αιθανόλη παράγοντας τα κατάλληλα ένζυμα. Ωστόσο θεωρείται αρκετά ευαίσθητος στις συνθήκες ανάπτυξης του, όπως το pH, η θερμοκρασία και οι συνθήκες αερισμού, επηρεάζοντας έτσι τη δράση του.
- ❖ Τα κύτταρα του *F. Oxysporum* δεν κατάφεραν να δώσουν το ίδιο ικανοποιητικά αποτελέσματα όσο τα ένζυμα του μύκητα. Στο στάδιο της παραλαβής των κυττάρων, με τη φυγοκέντρηση χάθηκε σημαντική ποσότητα κυττάρων καθώς επίσης η καταπόνηση των κυττάρων επέφερε κατά συνέπεια μείωση της δραστητικότητας τους.
- ❖ Το διάγραμμα συσχέτισης των δύο παραγόντων (Factorial Experimental Design) μας παρέχει μια συνολική εικόνα σύγκρισης των στοιχείων που χρησιμοποιήσαμε στη ζύμωση του μύκητα για την παραγωγή αιθανόλης. Παρατηρήσαμε μια γραμμική αύξηση στην παραγωγή αιθανόλης και την μεγαλύτερη επίδραση των ενζύμων ως παράγοντα συσχέτισης. Ωστόσο τα στατιστικά κενά που παρατηρήθηκαν στα

διαγράμματα και η κατά προσέγγιση εξίσωση δεν αποτελούν προϋποθέσεις για τη χρήση τους ως μοντέλο σε επόμενα πειράματα.

Λαμβάνοντας υπ' όψιν τα παραπάνω προτείνεται η χρήση του ενζυμικού συστήματος του *F. oxysporum* σε διεργασίες ταυτόχρονης σακχαροποίησης και ζύμωσης. Παράλληλα προτείνονται ορισμένες αλλαγές στον τρόπο διεξαγωγής των παραπάνω πειραμάτων για να έχουμε πιο επιθυμητά αποτελέσματα. Προτείνεται η περαιτέρω βελτίωση της προϋδρόλυσης, με την αύξηση της ξηρής μάζας (DM) και την μείωση των ενζύμων καθώς και η προσθήκη ενζύμων του *Fusarium oxysporum* για πιθανά καλύτερα αποτελέσματα υδρόλυσης και παραγωγής σακχάρων. Κατά την Μελέτη του μύκητα *Fusarium oxysporum* στη ζύμωση του PPWS (Pro-hydrolyded Pre-treated Wheat Straw) με τη χρήση κυττάρων, προτείνεται στη πειραματική διαδικασία η αφαίρεση της αιθανόλης από τον μεταβολισμό της ζύμης από το σύστημα για την αποφυγή της ακολουθούμενης δυσλειτουργίας του μύκητα. Εναλλακτικά προτείνεται, η προσθήκη του *Fusarium oxysporum* πρώτα στο στάδιο της ζύμωσης ώστε να του δοθεί ο απαιτούμενος χρόνος προσαρμογής και έπειτα η προσθήκη της ζύμης που προσαρμόζεται πιο εύκολα. Τέλος, μια μελλοντική πρόταση είναι η βελτιστοποίηση της μελέτης του μύκητα *Fusarium oxysporum* στη ζύμωση του PPWS (Pro-hydrolyded Pre-treated Wheat Straw) με τη χρήση ενζύμων και κυττάρων (Factorial Experimental Design) αλλάζοντας το εύρος των παραγόντων μελέτης με σκοπό όσο το δυνατόν καλύτερης προσέγγισης του μοντέλου.

Βιβλιογραφία

- Abramovay, R., 2008. A Political-cultural Approach to the Biofuel Market in Brazil. Department of Economics and Administration, University of Sao Paulo, Sao Paulo. Available at http://www.abramovay.pro.br/artigos_jornal/2008/Abramovay_Ethanol_biodiesel_Brazil_political_cultural_approach.pdf.
- Alexandros Gasparatos, Per Stromberg, Kazuhiko Takeuchi, Biofuels, ecosystem services and human wellbeing: Putting biofuels in the ecosystem services narrative, pp.111-112,114-128,2011
- Alfani F., Gallifuoco A., Saporoci A., Spera A., Cantarella M. (2000). Comparison of SHF and SSF processes for the bioconversion of steam-exploded wheat straw. *Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology* 25:184-192
- Arai, T., Kosugi, A., Chan, H., Koukiekolo, R., Yukawa, H., Inui, M., Doi, H.,2006.Properties of cellulosomal family 9 cellulases from *Clostridium cellulovorans*.*Applied Microbiology and Biotechnology* 71, 654–660.
- Aristidou A., Penttilä M. (2000). Metabolic engineering applications to renewable resource utilization. *Current Opinion in Biotechnology* 11:187-198
- Atwell, W.A., 2001. An overview of wheat development, cultivation, and production.*Cereal Foods World* 46, 59–62.
- Balat M. Current alternative engine fuels. *Energy Sources* 27, pp. 569–77, 2005.
- Balat M. Global bio-fuel processing and production trends. *Energy Explor Exploit* 25, pp. 195–218, 2007.
- Ballesteros, I., Negro, M.J., Oliva, J.M., Cabanas, A., Manzanares, P., Ballesteros, M.,2006. Ethanol production from steam-explosion pretreated wheat straw.*Applied Biochemistry and Biotechnology* 130, 496–508.
- Bayraktar, H., 2005. Experimental and theoretical investigation of using gasoline–ethanol blends in spark-ignition engines. *Renewable Energy* 30, 1733–1747.
- Berndes, G., 2002. Bioenergy and water—the implications of large-scale bioenergy production for water use and supply. *Global Environ. Chang.* 12, 253–271.

- Boudet A.M., Kajita S., Grima-Pettenati J., Goffner D. Lignins and lignocellulosics: a better control of synthesis for new and improved uses. *Trends in Plant Science* 8, pp. 576-581, 2003.
- Cadenas A., Cabezudo S. Biofuels as sustainable technologies: perspectives for less developed countries. *Technol Forecast Social Change* 58, pp. 83–103, 1998.
- Claassen, P.A.M., Lopez Contreras, A.M., Sijtsma, L., Weusthuis, R.A., Van Lier, J.B., Van Niel, E.W.J., Stams, A.J.M., De Vries, S.S., 1999. Utilisation of biomass for the supply of energy carriers. *Applied Microbiology and Biotechnology* 52, 741–755
- Christakopoulos P., Macris B.J., Kekos D. Direct fermentation of cellulose to ethanol by *Fusarium oxysporum*. *Enzyme and Microbial Technology* 11, pp. 236-239, 1989.
- de Fraiture, C., Giordano, M., Liao, Y., 2008. Biofuels and implications for agricultural water use: blue impacts of green energy. *Water Policy* 10 (Suppl. 1),67–81.
- de Vries, S.C., van de Ven, G.W.J., Ittersum, M.K., Giller, K.E., 2010. Resource use efficiency and environmental performance of nine major biofuel crops, processed by first-generation conversion techniques. *Biomass Bioenerg.* 34, 588–601.
- Demirbas A. Ethanol from cellulosic biomass resources. *Int J Green Ener* 1, pp. 79–87, 2004
- Demirbas A. Hazardous emissions, global climate change and environmental precautions. *Energy Sources B* 1, pp. 75–84, 2006.
- Eriksson, T., Børjesson, J., Tjerneld, F., 2002. Mechanism of surfactant effect in enzymatic hydrolysis of lignocellulose. *Enzyme and Microbial Technology* 31,353–364.
- Eggemana T., Elander R.T. Process and economic analysis of pretreatment technologies. *Coordinated Development of Leading Biomass Pretreatment Technologies, Bioresource Technology* Volume 96, Issue 18, pp. 2019-2025, 2005
- IEA, 2004. Biofuels for Transport: An International Perspective. International Energy Agency, Paris. Available at <http://www.iea.org/textbase/nppdf/free/2004/biofuels2004.pdf>.
- IEA, 2010a. Sustainable Production of Second-generation Biofuels: Potential and Perspectives in Major Economies and Developing Countries. International Energy Agency, Paris. Available at http://www.iea.org/papers/2010/second_generation_biofuels.pdf.
- FAO, 2009. Small-Scale Bioenergy Initiatives: Brief Description and Preliminary Lessons on Livelihood Impacts from Case Studies in Asia, Latin America and Africa. Food and Agricultural Organization, Rome. Available at <http://www.fao.org/docrep/011/aj991e/aj991e00.htm>.

- Fischer, G., Hizsnyik, E., Prielder, S., Shah, M., van Velthuisen, H., 2009. Biofuels and Food Security. International Institute for Applied Systems Analysis (IIASA), Vienna. Available at http://www.iiasa.ac.at/collections/IIASA_Research/Research/LUC/Homepage-News-ighlights/Biofuels%20Report%20Final.pdf.
- Farid Talebnia, Dimitar Karakashev, Irini Angelidaki, Production of bioethanol from wheat straw: An overview on pretreatment, hydrolysis and fermentation, pp.4744-4753, 2009.
- Galbe, M., Zacchi, G., 2002. A review of the production of ethanol from softwood. *Applied Microbiology and Biotechnology* 59, 618–628.
- Hahn-Hagerdal, B., Karhumaa, K., Fonseca, C., Spencer-Martins, I., Gorwa-Grauslund, M., 2007. Towards industrial pentose-fermenting yeast strains. *Applied Microbiology and Biotechnology* 74, 937–953.
- Hamelinck C.N., Hooijdonk G.V., Faaij A.P.C. Prospects for ethanol from lignocellulosic biomass: techno-economic performance as development progresses. Copernicus Institute, Report NWS-E-2003-55, ISBN 90-393-2583-4, 2003.
- Hendriks, A., Zeeman, G., 2009. Pretreatments to enhance the digestibility of lignocellulosic biomass. *Bioresource Technology* 100, 10–18.
- Jørgensen, H., 2009. Effect of nutrients on fermentation of pretreated wheat straw at very high dry matter content by *Saccharomyces cerevisiae*. *Applied Biochemistry and Biotechnology* 153, 44–57.
- Jørgensen H., Vibe Jakob Vibe-Pedersen, Jan Larsen, Claus Felby Liquefaction of Lignocellulose at High-Solids Concentrations, pp. 862-870, 2007.
- Karakashev, D., Thomsen, A.B., Angelidaki, I., 2007. Anaerobic biotechnological approaches for production of liquid energy carriers from biomass. *Biotechnology Letters* 29, 1005–1012.
- Karhumaa, K., Sanchez, R.G., Hahn-Hagerdal, B., Gorwa-Grauslund, M.F., 2007. Comparison of the xylose reductase-xylylitol dehydrogenase and the xylose isomerase pathways for xylose fermentation by recombinant *Saccharomyces cerevisiae*. *Microbial Cell Factories* 6.
- Kim, S., Dale, B.E., 2004. Global potential bioethanol production from wasted crops and crop residues. *Biomass and Bioenergy* 26, 361–375.

- Kristensen, J.B., Borjesson, J., Bruun, M.H., Tjerneld, F., Jorgensen, H., 2007. Use of surface active additives in enzymatic hydrolysis of wheat straw lignocellulose. *Enzyme and Microbial Technology* 40, 888–895.
- Lang X., Macdonald D.G., Hill G.A. Recycle bioreactor for bioethanol production from wheat starch II. Fermentation and economics. *Energy Sources* 23, pp. 427–436, 2001.
- Laureano-Perez, L., Teymouri, F., Alizadeh, H., Dale, B.E., 2005. Understanding Factors that Limit Enzymatic Hydrolysis of Biomass. In: *Twenty-Sixth Symposium on Biotechnology for Fuels and Chemicals*, pp. 1081–1099.
- Lee J. Biological conversion of lignocellulosic biomass to ethanol. *J of Biotechnology* 56, pp. 1-24, 1997
- Licht, F.O., 2006. *World Ethanol Market: The Outlook to 2015*, Tunbridge Wells, Agra Europe Special Report, UK.
- Lin, Y., Tanaka, S., 2006. Ethanol fermentation from biomass resources: current state and prospects. *Applied Microbiology and Biotechnology* 69, 627–642.
- Lynd L.R., van Zyl W.H., McBride J.E., Laser M. Consolidated bioprocessing of cellulosic biomass: an update. *Current Opinion in biotechnology* 16, pp. 577-583, 2005.
- MacLean H.L., Lave L.B. Evaluating automobile fuel/propulsion system technologies. *Prog Ener Combust Sci* 29, pp. 1–69, 2003.
- Mazeau, K., Moine, C., Krausz, P., Gloaguen, V., 2005. Conformational analysis of xylan chains. *Carbohydrate Research* 340, 2752–2760.
- Murray D. Ethanol's potential: Looking beyond corn. *Eco- Economy Updates*. Earth Policy Institute, 2005.
- Okano, K., Kitagawa, M., Sasaki, Y., Watanabe, T., 2005. Conversion of Japanese red cedar (*Cryptomeria japonica*) into a feed for ruminants by white-rot basidiomycetes. *Animal Feed Science and Technology* 120, 235–243.
- Ortiz, R., Sayre, K.D., Govaerts, B., Gupta, R., Subbarao, G.V., Ban, T., Hodson, D., Dixon, J.M., Ivan Ortiz-Monasterio, J., Reynolds, M., 2008. Climate change: can wheat beat the heat? *Agriculture, Ecosystems and Environment* 126, 46–58.
- Otero, J., Panagiotou, G., Olsson, L., 2007. Fueling industrial biotechnology growth with bioethanol. *Biofuels*, 1–40
- Patel, S.J., Onkarappa, R., Shobha, K., 2007. Study of ethanol production from fungal pretreated wheat and rice straw. *The Internet Journal of Microbiology* 4.

- Panagiotou G., Christakopoulos P., Olsson L (2005α). The influence of different cultivation conditions on the metabolome of *Fusarium oxysporum*. *Journal of Biotechnology* 118:304-315
- Panagiotou G., Christakopoulos P., Olsson L. (2005β). Simultaneous saccharification and fermentation of cellulose by *Fusarium oxysporum* F3-growth characteristics and metabolite profiling. *Enzyme and Microbial Technology* 36:693-699
- Panagiotou G., Christakopoulos P., Villas-Boas S.G., Olsson L. (2005γ). Fermentation performance and intracellular metabolite profiling of *Fusarium oxysporum* cultivated on a glucose-xylose mixture. *Enzyme and Microbial Technology* 36:100-106
- Panagiotou G., Kekos D., Macris B.J., Christakopoulos P. (2003). Production of cellulolytic and xylanolytic enzymes by *Fusarium oxysporum* grown on corn stover in solid state fermentation. *Industrial Crops and Products* 18:37-45
- Panagiotou G., Villas-Boas S.G., Christakopoulos P., Nielsen J., Olsson L. (2005δ). Intracellular metabolite profiling of *Fusarium oxysporum* converting glucose to ethanol. *Journal of Biotechnology* 115:425-434
- Prasad, S., Singh, A., Joshi, H.C., 2007. Ethanol as an alternative fuel from agricultural, industrial and urban residues. *Resources Conservation and Recycling* 50, 1–39.
- Rabinovich, M.L., Melnik, M.S., Boloboba, A.V., 2002. Microbial cellulases (review). *Applied Biochemistry and Microbiology* 38, 305–321.
- Roehrer M. (2001). *The Biotechnology of Ethanol: classical and future applications*. Wiley-V.C.H
- Wildenberg T., Lokhorst A. Introduction on CO₂ Geological storage-classification of storage options. *Oil Gas Sci Technol Rev IFP* 60, pp. 513–5, 2005.
- Sanchez, S.J., Cardona, C.A., 2008. Trends in biotechnological production of fuel ethanol from different feedstocks. *Bioresource Technology* 99, 5270–5295.
- Shuler M.L., Kargi F. (2005). *Μηχανική Βιοδιεργασιών (Βασικές έννοιες)*. ΑΘΗΝΑ, ΕΜΠ: 365-366, 695-700
- Taherzadeh, M.J., Karimi, K., 2007. Acid-based hydrolysis processes for ethanol from lignocellulosic materials: a review. *Bioresources* 2, 472–499.
- Tomas-Pejo, E., Oliva, J.M., Ballesteros, M., 2008. Realistic approach for full-scale bioethanol production from lignocellulose: a review. *Journal of Scientific & Industrial Research* 67, 874–884.

- Mette Hedegaard Thomsen, Anders Thygesen *, Anne Belinda Thomsen. (2007) Hydrothermal treatment of wheat straw at pilot plant scale using a three-step reactor system aiming at high hemicellulose recovery, high cellulose digestibility and low lignin hydrolysis. *Bioresource Technology* 99 (2008) 4221–4228
- Watanabe, S., Abu Saleh, A., Pack, S.P., Annaluru, N., Kodaki, T., Makino, K., 2007. Ethanol production from xylose by recombinant *Saccharomyces cerevisiae* expressing protein engineered NADP(+)-dependent xylitol dehydrogenase. *Journal of Biotechnology* 130, 316–319.
- Yu J., Corripio A.B., Harrison O.P., Copeland R.J. Analysis of the sorbent energy transfer system (SETS) for power generation and CO₂ capture. *Adv Environ* 7, pp. 335–45, 2003.
- Zarzycki A., Polska W. Bioethanol production from sugar beet- European and Polish perspective. In: The first TOSSIE workshop on technology improvement opportunities in the european sugar industry, Ferrara, Italy, January 25–26, 2007.
- Zhang Y.H.P., Lynd L.R. Toward an aggregated understanding of enzymatic hydrolysis of cellulose: noncomplexed cellulase systems. *Biotechnol Bioeng* 88, pp. 797–824, 2004.
- Zhang Y.H.P., Himmel M.E., Mielenz J.R. Outlook for cellulose improvement: screening and selection strategies. *Biotechnol Adv* 24, pp. 452–81, 2006.
- Κέκος Δ., Παπαγιαννάκος Ν. (1999). Σημειώσεις Βιοχημικής Μηχανικής. ΑΘΗΝΑ, ΕΜΠ: 70-71, 100-113
- Κέντρο Ανανεώσιμων Πηγών Ενέργειας (ΚΑΠΕ): www.cres.gr
- Κολίσης Φ.Ν., Κέκος Δ., Μακρής Β.Ι. (2002). Εφαρμοσμένη Βιοτεχνολογία (Σημειώσεις). ΑΘΗΝΑ, ΕΜΠ: 32-38