

## ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ

|   |    |
|---|----|
| Πρόλογος .....  | 3  |
| Περίληψη .....  | 4  |
| ΘΕΩΡΗΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ .....   | 5  |
| Κεφάλαιο 1:Βιοκαύσιμα – Βιοαιθανόλη .....                                       | 6  |
| 1.1 Παγκόσμια παραγωγή αιθανόλης .....  | 9  |
| 1.2 Βιοκαύσιμα δεύτερης γενιάς .....  | 10 |
| 1.3 Παραγωγή Βιοκαυσίμων με Πυρόλυση Βιομάζας.....                              | 12 |
| 1.4 Βιοαιθανολη.....  | 15 |
| 1.4 Διαδικασία Παραγωγής Αιθανόλης.....   | 20 |
| 1.5 Ο Μύκητας <i>Fusarium oxysporum</i> .....                                   | 24 |
| Κεφάλαιο 2: Άχυρο Σίτου .....   | 26 |
| 2.1 Άχυρο Σίτου: Η παραγωγή και η κατάληξη .....                                | 26 |
| 2.2 Άχυρο σίτου ως πιθανή πρώτη ύλη για την 2η γενιά βιοαιθανόλη .....          | 27 |
| 2.3 Προκατεργασίες στο άχυρο σίτου.....   | 28 |
| 2.3.1 Φυσικές .....   | 29 |
| 2.3.2 Φυσικοχημικές .....   | 29 |
| 2.3.3 Χημική Προεπεργασία.....  | 32 |
| 2.3.4 Βιολογική Προεπεξεργασία .....  | 34 |
| 2.3.5 Σύνοψη των μεθόδων προεπεξεργασίας .....                                  | 35 |
| 2.4 Προκατεργασία όπως πραγματοποιήθηκε σε πιλοτική μονάδα προεπεξεργασίας..... | 36 |
| 2.4.1 Περιγραφή της τριών βημάτων προ-επεξεργασίας.....                         | 36 |
| 2.4.2 Διαταξη και υπολογισμοί .....   | 37 |
| 2.5 Ανάκτηση σακχάρων.....  | 39 |
| 2.5.1 Ανάκτηση κυτταρίνης.....  | 39 |
| 2.5.2 Ανάκτηση ημικυτταρίνης .....  | 39 |
| 2.5.3 Ανάκτηση Λιγνίνης .....   | 39 |
| 2.5.4 Θεωρητική απόδοση αιθανόλης.....  | 40 |
| 2.5.5 Σύγκριση των μεθόδων .....  | 41 |
| ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ .....   | 43 |
| Υλικά και Μέθοδοι .....   | 44 |
| ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ .....  | 52 |
| Προϋδρόλυσεις και Σακχαροποιήσεις .....   | 53 |

|  |    |
|--|----|
| 1. Προϋδρόλυση.....  | 54 |
| 1.1 Προϋδρόλυση με συνδιασμό εμπορικών ενζύμων και ενζυμικού συστήματος <i>F. oxysporum</i> ....                           | 54 |
| 1.2. Προϋδρόλυση με πιλοτικό μίγμα ενζύμων (Thermomix).....  | 56 |
| 2. Διαδικασία παραγωγής αιθανόλης.....   | 64 |
| 2.1 Διαδικασία παραγωγής αιθανόλης χωρίς τη προσθήκη επιπλέον ενζύμων .....  | 64 |
| 2.2 Διαδικασία παραγωγής αιθανόλης με τη προσθήκη επιπλέον ενζύμων .....   | 67 |
| 2.2.1. Διαδικασία παραγωγής αιθανόλης με ταυτόχρονη προσθήκη εμπορικών ενζύμων .....                                       | 67 |
| 2.2.2. Διαδικασία παραγωγής αιθανόλης με ταυτόχρονη προσθήκη του ενζυμικού συστήματος του μύκητα <i>F. oxysporum</i> ..... | 74 |
| 2.3. Σύγκριση των μεθόδων της διαδικασίας παραγωγής αιθανόλης .....  | 74 |
| Συμπεράσματα και προτάσεις.....  | 80 |
| Βιβλιογραφία.....  | 82 |

## 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. Τόπακα Ευάγγελο, που με την καθοδήγηση του και τις πολύτιμες συμβουλές τους συνείσφερε ουσιαστικά στην ολοκλήρωση της παρούσας εργασίας.

Επίσης θα ήθελα να ευχαριστήσω θερμά τον καθηγητη κ. Χριστακόπουλο Παύλο, τον Υπ. Διδάκτορα Θωμά Πάσχο και τον συνάδελφο Νταβέλα Λάμπρο, 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.

## Περίληψη

Η παρούσα διπλωματική εργασία εκπονήθηκε στο εργαστήριο Βιοτεχνολογίας, της Σχολής Χημικών Μηχανικών του Εθνικού Μετσόβιου Πολυτεχνείου από τον Δεκέμβριο του 2012 έως και τον Δεκέμβριο του 2013. Σκοπός της εργασίας ήταν μελέτη της επίδρασης του ενζυμικού συστήματος μύκητα *Fusarium oxysporum* στην προυδρολύση και στη ζήμωση του προκατεργασμένου αχύρου σίτου (PWS) για την παραγωγή αιθανόλης.

Οι προυδρολύσεις έγιναν σε αντιδραστήρα υγροποίησης – προυδρόλησης ο οποίος σχεδιάστηκε και κατασκευάστηκε στο εργαστήριο μας. Υπό διαφορετικές αρχικές ενεργότητες ενζύμων στους 50 βαθμούς κελσίου και σε συγκέντρωση 23% Ξηρή Μάζα (Ξ.Μ.) διαπιστώθηκε ότι η προυδρολύση έχει την μεγαλύτερη απόδοση με 7 FPU/g Ξ.Μ εμπορικών ενζύμων Celluclast 1,5 L και Novozyme 188 στους 50 βαθμούς κελσίου. Οι προυδρολύσεις επαναλήφθηκαν στους 30 και 50 βαθμούς κελσίου με σκοπό την αντικατάσταση των εμπορικών ενζύμων με ένζυμα του μύκητα *F. oxysporum*. Διαπιστώθηκε ότι τα ένζυμα του *F. oxysporum* μπορούν να αντικαταστήσουν μια ποσότητα εμπορικών ενζύμων..

Στο επόμενο κομμάτι της μελέτης πραγματοποιήθηκαν προυδρολύσεις με τη χρήση ενός ενζυμικού συστήματος (Thermomix) το οποίο ήταν το αποτέλεσμα της συνεργασίας του εργαστηρίου μας με άλλα Ευρωπαϊκά εργαστήρια υπό το Ευρωπαϊκό πρόγραμμα “ High efficiency consolidated bioprocess technology for lignocellulose ethanol - HYPE ”

Στη συνέχεια πραγματοποιήθηκε ζύμωση του προυδρολυμένου αχύρου από τα κύτταρα του μύκητα με ταυτόχρονη σακχαροποίηση της εναπομένουσας κυτταρίνης και ημικυτταρίνης υπό την παρουσία ενζύμων του μύκητα *F. oxysporum* και ενζύμων Celluclast – Novozyme με σκοπό την μελέτη της δυνατότητας μείωσης της ποσότητας των ενζύμων κατά το στάδιο της προυδρόλυσης. Τα ένζυμα βοήθησαν στην περαιτέρω υδρόλυση της κυτταρίνης ώστε ο *F. oxysporum* να έχει τη δυνατότητα να μεταβολίσει περισσότερα σάκχαρα σε αιθανόλη. Πραγματοποιήθηκαν τρεις διαφορετικές ζυμώσεις με πρώτη ύλη προυδρολυμένο άχυρο στους 55 βαθμούς κελσίου με 7 FPU/g Ξ.Μ ενζύμων Thermomix. Η πρώτη χωρίς τη προσθήκη επιπλέον εμπορικών ενζύμων σε συγκέντρωση του άχυρου 10 και 15% Ξ.Μ. που αποδείξτε την ανάγκη για προσθήκη επιπλέον ενζύμων στη ζύμωση. Η δεύτερη ζύμωση με τη χρήση ενζύμων Celluclast και του μύκητα *F. oxysporum* σε 10 και 15% Ξ.Μ και η τρίτη με ένζυμα του *F. oxysporum* 3 και 5 FPU/g Ξ.Μ. και μύκητα *F. Oxysporum* σε 10 και 15% Ξ.Μ. Διαπιστώθηκε ότι τα ένζυμα του *Fusarium oxysporum* μπορούν να πραγματοποιήσουν υδρόλυση ταυτόχρονα με τη ζύμωση αλλά με μικρότερη απόδοση κατά 10 με 15% από ότι τα ένζυμα Celluclast.

## **ΘΕΩΡΗΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ**

## Κεφάλαιο 1:Βιοκαύσιμα – Βιοαιθανόλη

Τα βιοκαύσιμα είναι καύσιμα που προέρχονται από βιολογικές διεργασίες και στόχο έχουν να αντικαταστήσουν ολικά ή εν μέρει τα συμβατικά καύσιμα. (Lois et al.)2007

Ειδικότερα, όπως ορίζει ο Νόμος 3468/2006, Βιοκαύσιμα θεωρούνται και τα ακόλουθα καύσιμα:

**Βιοντίζελ** (πετρέλαιο βιολογικής προέλευσης) είναι οι μεθυλεστέρες λιπαρών οξέων (ΜΛΟ – FAME, fatty acid methyl ester ) που παράγονται από φυτικά ή ζωικά έλαια και λίπη και είναι ποιότητας πετρελαίου ντίζελ, για χρήση ως Βιοκαύσιμο.

**Βιοαιθανόλη** είναι η αιθανόλη που παράγεται από Βιομάζα ή από βιοαποικοδομήσιμο κλάσμα αποβλήτων, για χρήση ως Βιοκαύσιμο.

**Βιοαέριο** είναι το καύσιμο αέριο που παράγεται από Βιομάζα ή βιοαποικοδομήσιμο κλάσμα βιομηχανικών και αστικών αποβλήτων, το οποίο μπορεί να καθαριστεί και να αναβαθμιστεί σε ποιότητα φυσικού αερίου, για χρήση ως Βιοκαύσιμο, ή το ξυλαέριο.

**Βιομεθανόλη** είναι η μεθανόλη που παράγεται από Βιομάζα, για χρήση ως Βιοκαύσιμο.

**Βιο-ETBE** είναι ο αιθυλο-τριτοταγής-βουτυλαιθέρας (ETBE) που παράγεται από βιοαιθανόλη, για χρήση ως Βιοκαύσιμο. Το κατ' όγκο ποσοστό Βιο-ETBE που υπολογίζεται ως Βιοκαύσιμο είναι 47% επί του συνόλου του.

**Βιο-MTBE** είναι ο μεθυλο-τριτοταγής-βουτυλαιθέρας (MTBE) που παράγεται από μεθανόλη, για χρήση ως Βιοκαύσιμο. Το κατ' όγκο ποσοστό Βιο-MTBE που υπολογίζεται ως Βιοκαύσιμο είναι 36% επί του συνόλου του

Η πρώτη ύλη των βιοκαυσίμων ονομάζεται βιομάζα (Berzegiannh et al). Η βιομάζα μπορεί να είναι, είτε αγροτικά παραπροϊόντα, είτε φυτά που καλλιεργούνται για την παραγωγή βιοκαυσίμων. Το πιο σημαντικό στοιχείο στη παραγωγή βιοκαυσίμων είναι η σύσταση της βιομάζας.

*Πίνακας 1. Περιεκτικότητα υδρογονανθράκων σε διάφορους τύπους βιομάζας*

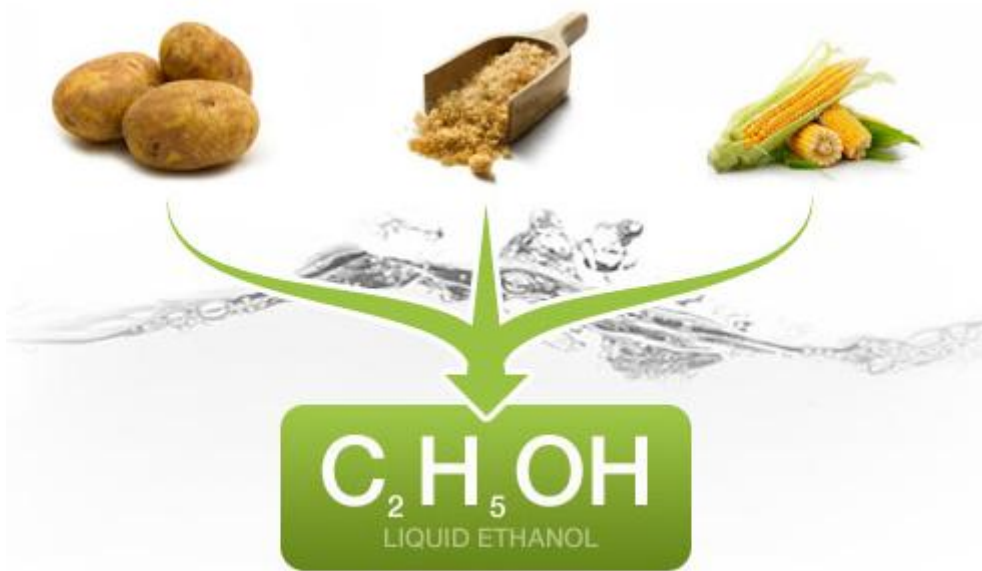
|                                      | <b>Υδρογονάνθρακες (% ισοδύναμο ζάχαρης)</b> |                |                  |               |                   | <b>Μη-υδρογονάνθρακες</b> |               |
|--------------------------------------|--|----------------|------------------|---------------|-------------------|---------------------------|---------------|
|                                      | <b>Γλυκόζη</b>                               | <b>Μαννόζη</b> | <b>Γαλακτόζη</b> | <b>Ξυλόζη</b> | <b>Αραμπινόζη</b> | <b>Λιγνίνη</b>            | <b>Στάχτη</b> |
| Σπάδικας<br>Καλαμποκιού              | 39.0   | 0.3            | 0.8              | 14.8          | 3.2               | 15.1                      | 4.3           |
| Άχυρο<br>σιταριού                    | 36.6   | 0.8            | 2.4              | 19.2          | 2.4               | 14.5                      | 9.6           |
| Άχυρο ρυζιού                         | 41.0   | 1.8            | 0.4              | 14.8          | 4.5               | 9.9                       | 12.4          |
| Τσόφλια<br>ρυζιού                    | 36.1   | 3.0            | 0.1              | 14.0          | 2.6               | 19.4                      | 20.1          |
| Υπολείμματα<br>εκχύλισης<br>σακχάρων | 38.1   | -              | 1.1              | 23.3          | 2.5               | 18.4                      | 2.8           |
| Σκληρό ξύλο                          | 40.0   | 8.0            | -                | 13.0          | 2.0               | 20.0                      | 1.0           |
| Μαλακό ξύλο                          | 50.0   | 12.0           | 1.3              | 3.4           | 1.1               | 28.3                      | 0.2           |

Πηγή: Lee, J.,1997

Από περιβαλλοντικής σκοπιάς, τα βιοκαύσιμα πιστεύεται ότι είναι φιλικότερα προς το περιβάλλον, δεδομένου ότι για να δημιουργηθούν καταναλώθηκε CO<sub>2</sub> οπότε δεν εισάγεται νέα ποσότητα CO<sub>2</sub> στον κύκλο του άνθρακα. Για την ανάπτυξη των φυτών βέβαια έχουν χρησιμοποιηθεί καύσιμα σε διάφορα στάδια της παραγωγής. Για τον λόγο αυτό έχει οριστεί ο Συντελεστής Ορυκτής Ενέργειας ως ο λόγος της ενέργειας που περιέχεται στο καύσιμο που παράγεται προς την ενέργεια που περιέχεται στα ορυκτά καύσιμα που χρησιμοποιούνται για την παραγωγή του ενεργειακού φυτού [Χριστακόπουλος 2010]. Για την ανάπτυξη μεθόδων παραγωγής βιοκαυσίμων εκτός από περιβαλλοντικοί, υπάρχουν οικονομικοί κ πολιτικοί λόγοι, καθώς πολλές χώρες κάνουν προσπάθειες ανεξάρτησης από τα ορυκτά καύσιμα.

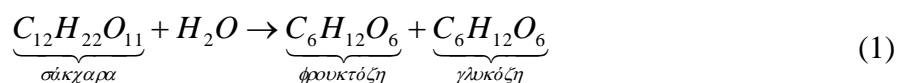
.Οι δύο πιο κοινές μορφές υγρών βιολογικών καυσίμων είναι βιοαιθανόλη και βιοντήζελ, που χρησιμοποιούνται είτε καθαρά είτε σε μίγματα με το συμβατό πετρέλαιο κίνησης ή την βενζίνη [Gasparatos et al.2011].

Η βιοαιθανόλη παράγεται με τη μέθοδο της ενζυματικής υδρόλυσης. Για την παραγωγή βιοαιθανόλης μπορούν να χρησιμοποιηθούν αγροτικά προϊόντα που περιέχουν σάκχαρα όπως ζαχαρότευτλο, ζαχαροκάλαμο, γλυκό σόργο, μελάσα κ.α., καθώς και άμυλο όπως δημητριακά, καλαμπόκι, πατάτα κτλ, ή κυτταρινικό υλικό (ξύλεια, υπολείμματα χαρτοβιομηχανίας) [Fischer et al., 2009].

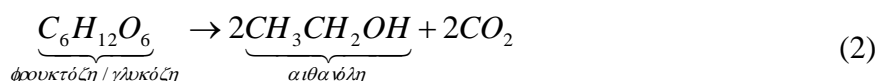


Εικόνα 1: Πρώτες ύλες για τη βιοαιθανόλη

Κατά την ενζυματική υδρόλυση η βιομάζα υφίσταται τη διεργασία της υδρόλυσης κατά την οποία τα μεγάλα μόρια αμύλου και σακχαρόζης διασπώνται σε μικρότερα μόρια σακχάρων, τα οποία μπορούν να ζυμωθούν και να μετατραπούν σε αιθανόλη. Στη διεργασία της υδρόλυσης εισέρχεται κ μαγιά η οποία περιέχει το ένζυμο invertase που δρα ως καταλύτης και βοηθά στην μετατροπή σακχάρων σε γλυκόζη και φρουκτόζη, όπως φαίνεται από την παρακάτω απλοποιημένη αντίδραση:



Η ζύμωση μορίων της ζάχαρης (φρουκτόζη και γλυκόζη) συντελεί στη παραγωγή αιθανόλης, μία μέθοδος πολύ διαδεδομένη στη βιομηχανία τροφίμων. Κατά τη ζύμωση, οι σακχαρομύκητες συντελούν στο μεταβολισμό της ζάχαρης απουσία οξυγόνου προς αιθανόλη και διοξείδιο του άνθρακα, όπως φαίνεται με την παρακάτω αντίδραση:



Αξίζει να σημειωθεί ότι η φύση της βιομάζας που χρησιμοποιείται για την παραγωγή βιοαιθανόλης είναι ο σημαντικότερος παράγοντας που επηρεάζει την απόδοση της διεργασίας. Όπως προαναφέρθηκε, για την παραγωγή βιοαιθανόλης χρησιμοποιείται βιομάζα πλούσια σε άμυλο και σάκχαρα αλλά και λιγνοκυτταρινική βιομάζα. Γενικότερα το κυτταρινικό και ημικυτταρινικό



υλικό μπορεί με τη χρήση καττάλληλων ενζύμων να μετατραπεί ως ένα μεγάλο ποσοστό σε βιοαιθανόλη [Χριστακόπουλος 2010].

Η διαδικασία μετατροπής της βιομάζας σε αιθανόλη περιλαμβάνει τα εξής στάδια:

Υδρόλυση των κυτταρινών κ ημικυτταρινών

- .Απο την υδρόλυση θα προκύψουν εξόζες (γλυκόζη,μαννόζη,γαλακτόζη) κ πεντόζες (ξυλόζη,αραβινόζη)

Ζύμωση των ζαχάρων για παραγωγή αιθανόλης.

Τα στάδια αυτά μπορούν να γίνουν ένα με ένα ενοποιημένο βιομετασχηματισμό. Μικροοργανισμοί όπως ο *Neurospora crassa* και ο *Fusarium oxysporum* έχουν μελετηθεί από το 1980 ότι μπορούν να συμμετέχουν στην ενοποιημένη διαδικασία. Οι οργανισμοί αυτοί έχουν την δυνατότητα να ζυμώνουν τα σάκχαρα κ να παράγουν ένζυμα για την υδρόλυση της λιγνοκυτταρικής πρώτης ύλης [Christakopoulos et al 1989]

## 1.1 Παγκόσμια παραγωγή αιθανόλης

Πρώτος παγκόσμιος παραγωγός είναι οι Η.Π.Α. ,όπου χρησιμοποιούν ως πρώτη ύλη αραβόσιτο δυνητικής απόδοσης 50 εκατομμυρίων λιτρών,στο οποίο μπορούν να προστεθούν γεωργικά υπολείμματα ,ξύλο,στερεά δημοτικά απόβλητα κ ενεργειακές καλλιέργειες κ να φτάσει σε ποσότητα τα 300 εκατομμύρια λιτρα .Το ποσοστό των ορυκτών καυσίμων που μπορεί να αντικατασταθεί φτάνει το 30% [Δημητρόπουλος 2009]

Δευτερος παγκόσμιος παραγωγός.είναι η Βραζιλία όπου από το 1975 ξεκίνησε ένα εθνικό πρόγραμμα προώθησης της αιθανόλης.Στη Βραζιλία χρησιμοποιούν ζαχαρότευτλα για την παραγωγή της αιθανόλης. Πλέον τα μισά αυτοκίνητα κινούνται αποκλειστικά με αιθανόλη ενώ τα υπόλοιπα με μίγμα βενζίνης-αιθανόλης 75%-25 (E25) κ η χώρα έχει καταστεί ενεργειακά αυτόνομη [ Filho 2000]

## Ευρωπαϊκή Νομοθεσία

- Σύμφωνα με την Ευρωπαϊκή οδηγία 2003/30/EK από το τέλος του 2010 το 5,75% της εγχώριας βενζίνης θα πρέπει να υποκατασταθεί από βιοαιθανόλη ή άλλο συμβατό με τη βενζίνη πρόσθετο
- Η οδηγία 2003/30/EK της 8<sup>ης</sup> Μαΐου 2003 <προώθηση της χρήσης των βιοκαυσίμων ή άλλων ανανεώσιμων καυσίμων για τις μεταφορές>, έθεσε τα θεμέλια για την προώθηση των εναλλακτικών καυσίμων στην Ε.Ε. (6)
- Η οδηγία 2003/96/EK της 27<sup>ης</sup> Οκτωβρίου εστιάζει κυρίως στη φορολογία που εφαρμόζεται στα βιοκαύσιμα. Αυτή η οδηγία τροποποιεί τον Κοινοτικό φόρο στην ενέργεια και τα ενεργειακά προϊόντα.
- Η οδηγία 2009/28/EK της 23<sup>ης</sup> Απριλίου 2009 εισάγει ένα νέο στόχο για την μείωση των εκπομπών αερίων του θερμοκηπίου στον τομέα των μεταφορών
- Η οδηγία 2009/30/EK της 23<sup>ης</sup> Απριλίου 2009 στοχεύει στη βελτίωση της ατμοσφαιρικής ποιότητας και τη μείωση των εκπομπών αερίων του θερμοκηπίου ,μέσω περιβαλλοντικών προτύπων για τα καύσιμα.

## **1.2 Βιοκαύσιμα δεύτερης γενιάς**

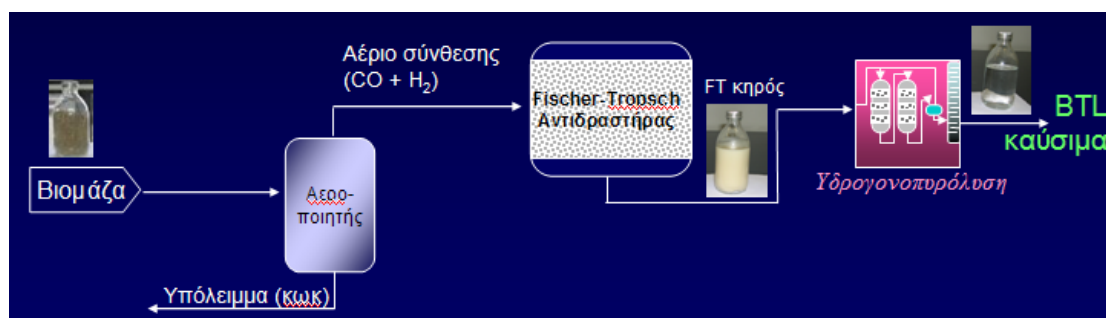
Τα βιοκαύσιμα δεύτερης γενιάς είναι τα βιοκαύσιμα που παράγονται με πρωτοποριακές διεργασίες και από περισσότερους τύπους βιομάζας από ότι τα βιοκαύσιμα πρώτης γενιάς. Τα κυριότερα βιοκαύσιμα δεύτερης γενιάς συνοψίζονται στον Πίνακα 2. Στα βιοκαύσιμα δεύτερης γενιάς ανήκουν τα συνθετικά βιοκαύσιμα που παράγονται από θερμοχημικές και καταλυτικές διεργασίες όπως πυρόλυση, εξαερίωση, και Fischer-Tropsch. Επίσης στην κατηγορία αυτή ανήκει και η βιοαιθανόλη που παράγεται από λιγνοκυτταρινικό υλικό (Bezergiannh,lappas &Bounetakis et al 2009). Το υδρογόνο από αέριο σύνθεσης καθώς και το βιοαέριο αποτελούν τα κύρια αέρια βιοκαύσιμα δεύτερης γενιάς (Kim 2004).

Πίνακας2: Πρωτοποριακά βιοκαύσιμα ή βιοκαύσιμα δεύτερης γενιάς(Πηγή Bezergiannh,lappas &Bounetakis 2009)

| Τύπος Βιοκαυσίμου    | Ονομασία                        | Διεργασία   |
|----------------------|---------------------------------|---|
| Συνθετικά βιοκαύσιμα | Fischer-Tropsch Βιοντίζελ       | Εξαέρωση, wgs, σύνθεση, HDC   |
|                      | Αλκοόλη από αέριο σύνθεσης      | Εξαέρωση, σύνθεση   |
|                      | HTU ντίζελ                      | HTU, HDO, διύλιση   |
|                      | Ντίζελ πυρόλυσης                | Πυρόλυση, HDO, διύλιση  |
| Βιομεθανόλη          | Μεθανόλη                        | Εξαέρωση, wgs, σύνθεση  |
| Βιοαιθανόλη          | Αιθανόλη από κυτταρίνη          | Υδρόλυση, Ζύμωση, απόσταξη  |
| Βιο-MTBE             | MTBE                            | Σύνθεση   |
| Βιοδιμεθυλαιθέρας    | DME                             | Εξαέρωση, wgs, σύνθεση  |
| Βιουδρογόνο          | Υδρογόνο από αέριο σύνθεσης     | Εξαέρωση, wgs, απομάκρυνση CO <sub>2</sub>                            |
| Βιοαέριο             | Φυσικό αέριο από αέριο σύνθεσης | Εξαέρωση, wgs, σύνθεση, απομάκρυνση CO <sub>2</sub> -H <sub>2</sub> O |
|                      | Συνθετικό φυσικό αέριο          | Εξαέρωση  |

## Fischer-Tropsch

Η διεργασία παραγωγής βιοκαυσίμων με τη μέθοδο Fischer-Tropsch είναι μια διεργασία μετατροπής βιομάζας σε υγρά καύσιμα (Biomass To Liquid ή BTL), όπως φαίνεται στο Σχήμα (1).

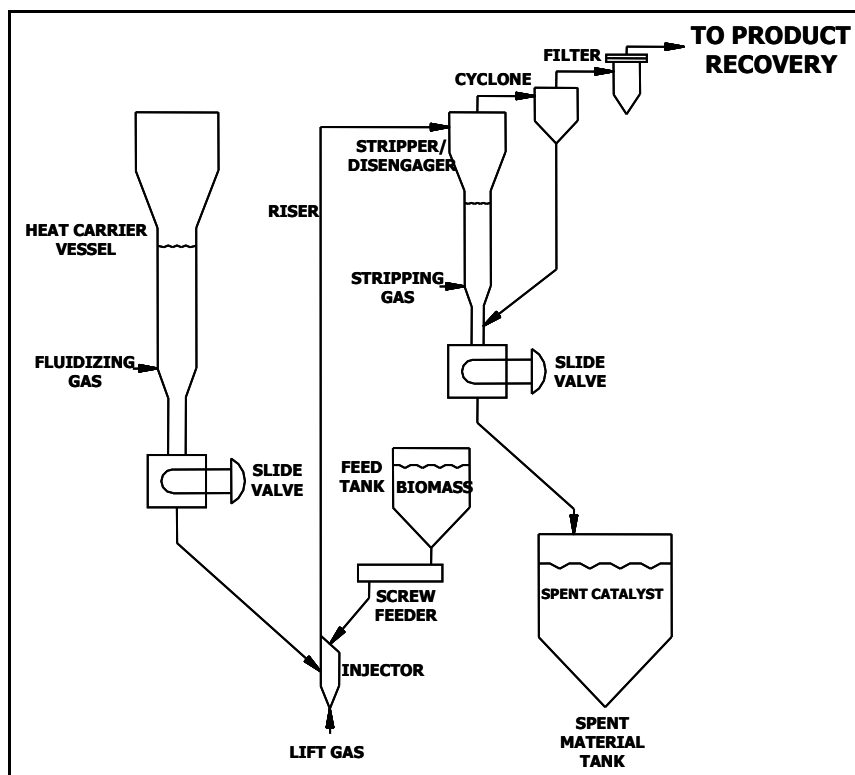


Σχήμα 1: Διεργασία παραγωγής βιοκαυσίμων

Η βιομάζα έρχεται σε επαφή με αέρα και πυρολύεται. Το παραγόμενο αέριο και κωκ περνάει στη συνέχεια στον αεροποιητή και το παραγόμενο βιοαέριο σύνθεσης, αφού καθαριστεί και αποθιωθεί, διέρχεται μέσα από αντιδραστήρα Fischer-Tropsch. Εκεί το βιοαέριο σύνθεσης ( $\text{CO} + \text{H}_2$ ) αντιδρά καταλυτικά και συνθέτει ένα μίγμα αλειφατι-κών υδρογονανθράκων που αποτελείται από ελαφρούς υδρογονάνθρακες ( $\text{C}_1$  και  $\text{C}_4$ ), νάφθα ( $\text{C}_5$  και  $\text{C}_{11}$ ), ντίζελ ( $\text{C}_{12}$  και  $\text{C}_{20}$ ) και κηρό ( $>\text{C}_{20}$ ). Η απόδοση της αντίδρασης Fischer-Tropsch εξαρτάται από τον κα-ταλύτη που χρησιμοποιείται και τις παραμέτρους λειτουργίας, ωστόσο η απόδοση σε υγρά προϊόντα (νά-φθα, ντίζελ και FT-κηρό) ανέρχεται στο 95%. ( Boerrigter 2004).

### 1.3 Παραγωγή Βιοκαυσίμων με Πυρόλυση Βιομάζας

Η πυρόλυση βιομάζας είναι η διεργασία παραγωγής βιοκαυσίμων δεύτερης γενιάς που απασχολεί ερευνητικά το ΕΠΚΥ. Όπως φαίνεται στην Εικόνα 4 η βιομάζα έρχεται σε επαφή με άζωτο που μεταφέρει τον καταλύτη και ανέρχεται στον αντιδραστήρα (riser). Το προϊόν σε αέρια φάση περνά από ένα σύστημα κυκλώνων και φίλτρων από το οποίο διαχωρίζεται ο καταλύτης. Στη συνέχεια το αέριο προϊόν ψύχεται και αφού περάσει από ένα ισοσταθμιστή συλλέγεται το υγρό προϊόν (~85% κ.β.) το οποίο αποτελεί το βιοέλαιο που αποτελεί το παραγόμενο βιοκαύσιμο. (Kim 2004)



*Εικόνα 2:* Πυρόλυση βιομάζας

## Αγροτικά Παραπροϊόντα

Η βιοαιθανόλη παράγεται κυρίως βιομηχανικά από ζαχαροκάλαμο στη Βραζιλία και άμυλο αραβοσίτου στις ΗΠΑ. Πάνω από το 90% της παγκόσμιας παραγωγής αιθανόλης προέρχεται από την εφαρμογή συγκεκριμένων καλλιεργειών (το 60% από ζαχαροκάλαμο και ζαχαρότευτλο, ενώ το υπόλοιπο 40% κυρίως από άμυλο αραβοσίτου) [Δημητρόπουλος 2009].

Γενικά, οι πρώτες ύλες για την παραγωγή βιοαιθανόλης μπορούν να ταξινομηθούν σε τρεις τύπους: (i) σακχαρούχα υλικά, (ii) αμυλούχα υλικά και (iii) λιγνινοκυτταρινούχα υλικά. [Kumar et al., 2006].

Πίνακας 3: Διαφορετικά υλικά για την παραγωγή βιοαιθανόλης και η συγκριτική τους παραγωγική δυνατότητα (Kumar et al., 2006)

| Υλικό   | Παραγωγή βιοαιθανόλης (l/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                           |

Στα θετικά της βιοαιθανόλης συμπεριλαμβάνεται το γεγονός ότι εκτός από καλλιέργειες που δημιουργήθηκαν αποκλειστικά για αυτό το σκοπό, παραγωγή μπορεί να υπάρξει και από αγροτικά παραπροϊόντα. Οι Η.Π.Α. διαθέτουν μόλις το 3% των παγκόσμιων αποθεμάτων πετρελαίου, αλλά παράγουν περισσότερο του 25% των αγροτικών παραπροϊόντων παγκοσμίως» (Riisgaard 2011) Πολλά από αυτά (πλούσια σε κυτταρίνες και σάκχαρα) που σε άλλες περιπτώσεις θα ήταν απλά ρύποι πλέων μπορούν να αξιοποιηθούν για παραγωγή βιοκαυσίμων.

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 ζυμάσιμους 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].

Μελέτες έχουν γίνει πάνω σε :

- Το άχυρο ρυζιού
- Παραπροϊόντα καλαμποκιού
- Πίτα φοινικοπυρήνων
- Καρπούζια
- Σπόροι του κριθαριού

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 άχυρου ρυζιού μπορεί ενδεχομένως να παραγάγει 205 δισεκατομμύρια λίτρα βιοαιθανόλης το χρόνο, το οποίο είναι το μεγαλύτερο ποσό από ένα ενιαίο απόθεμα βιομάζας. [Karimi et al., 2006]. Οι βιοδιεργασίες για την παραγωγή αιθανόλης από ρύζι είναι η ξεχωριστή σακχαροποίηση και ζύμωση (SHF) και ταυτόχρονη σακχαροποίηση και η ζύμωση (SSF) (takano 2012 et al.)

Παραπροϊόντα καλαμποκιού (κοτσανια) υπόκεινται σε υδροθερμική κατεργασία στους 195 °C κ στη συνέχεια η διαδικασία ζύμωσης (SSF) με *S. cerevisiae* (Xu et al.2009)

Παραγωγή αιθανόλης από πίτα φοινικοπυρήνων (PKC). Η πίτα αυτή είναι το υπόλειμμα εκχύλισης φοινικέλαιου, το οποίο βρέθηκε να περιέχει 48,5% υδατάνθρακες συνολικά εκ των οποίων 35,2% είναι μαννάνη. Το κυτταρικό τοίχωμα υδρολυεται ενζυμικά για να ληφθούν μονοσακχαριτών που μπορούν να είναι υπόστρωμα σε διάφορες διεργασίες ζύμωσης. Η διαδικασία αυτή έχει βρεί εφαρμογή στη Μαλαισία όπου βιομάζα από φοινικόδεντρα μετατρέπονται σε υγρά βιοκαύσιμα. (Cervero et al 2009)

Τα ελαττωματικά καρπούζια εκτός από παραγωγή διατροφικών συμπληρωμάτων, μπορούν να χρησιμοποιούνται για την παραγωγή βιοκαυσίμων. Περίπου το 20% της ετήσιας σοδειάς καρπουζιού αφήνεται στο χωράφι εξαιτίας επιφανειακών δυσχρωμιών ή παραμορφώσεων. Ο χυμός αυτών των καρπουζιών είναι πηγή σακχάρων που μπορούν να υποστούν άμεσα ζύμωση. (Fish 2010)

Στην παραγωγή του “ουίσκι” κ αφού αποσταχθεί, στον άμβυκα μένουν οι σπόροι του κριθαριού που συνήθως ξηραίνονται και πωλούνται ως συστατικό ζωοτρόφων, καθώς και υγρά κατάλοιπα. Και τα δύο αυτά συστατικά μπορούν να χρησιμοποιηθούν για την παραγωγή βιοβουτανόλης, ενός προϊόντος υψηλής αξίας. Το συγκεκριμένο βιοκαύσιμο έχει καλύτερες ιδιότητες από την αιθανόλη. Η ενεργειακή του πυκνότητα είναι υψηλότερη, πράγμα που σημαίνει ότι μπορεί να θέσει σε κίνηση συμβατικούς τετράχρονους κινητήρες χωρίς πρόσμειξη με άλλα καύσιμα και χωρίς τροποποίηση των μηχανών. (Tangney et al 2010)

## 1.4 Βιοαιθανολη

Η **βιοαιθανόλη** μπορεί να παραχθεί από πλήθος υδατανθράκων (με γενικό μοριακό τύπο:  $(\text{CH}_2\text{O})_n$ ).

Η ζύμωση της σακχαρόζης δίνει αιθανόλη. Αρχικώς η σακχαρόζη υδρολύεται προς γλυκόζη και φρουκτόζη.



σακχαρόζη            γλυκόζη            φρουκτόζη

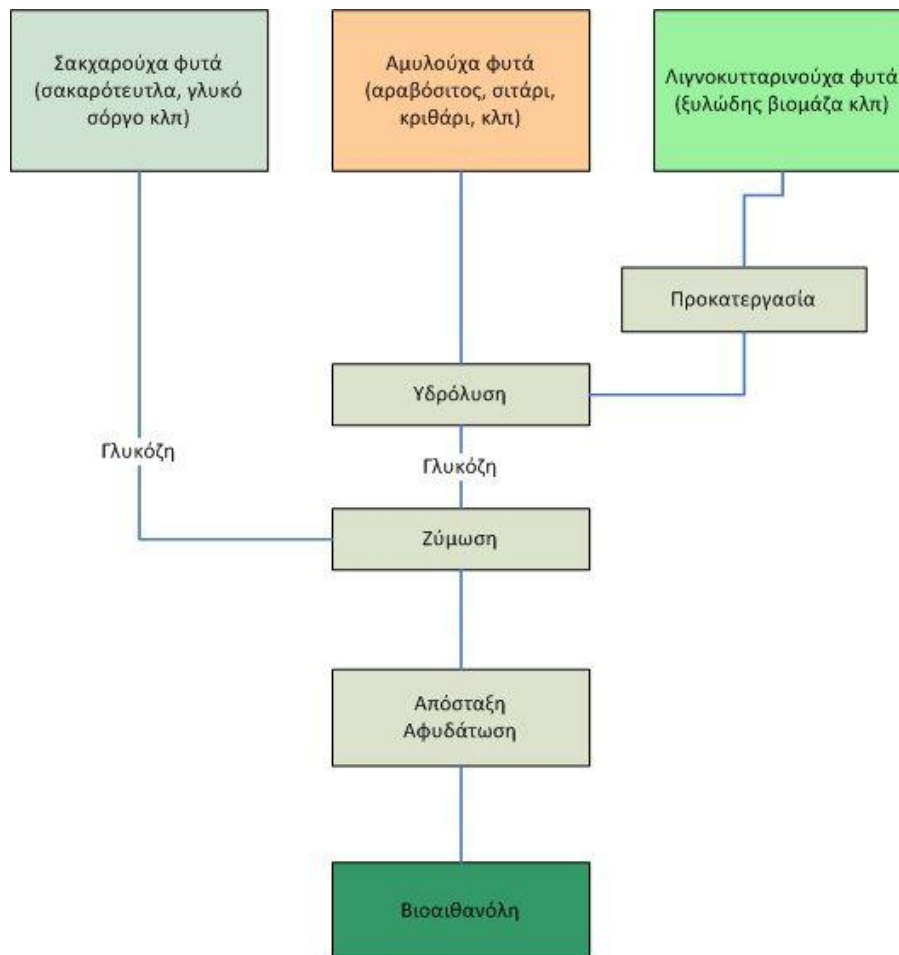
Στη συνέχεια, η γλυκόζη και η φρουκτόζη μετατρέπονται σε αιθανόλη.



Το **άμυλο** μπορεί να μετατραπεί σε D-γλυκόζη, με τη βοήθεια του ενζύμου γλυκοαμυλάση. Αυτή η **ενζυμική υδρόλυση** ακολουθείται, στη συνέχεια, από τη ζύμωση, την απόσταξη και την αφυδάτωση με σκοπό την παραγωγή άνυδρης βιοαιθανόλης. Το καλαμπόκι, το οποίο περιέχει άμυλο σε ποσοστό 60-70%, αποτελεί τη βασική πρώτη ύλη παγκοσμίως για τη βιομηχανική παραγωγή βιοαιθανόλης από άμυλο. [A. Demirbas 2008]

Οι υδατάνθρακες (κυτταρίνη και ημικυτταρίνη) που βρίσκονται σε λιγνοκυτταρινούχα υλικά μπορούν να μετατραπούν σε **βιοαιθανόλη** αφού πρώτα λάβει χώρα η απολιγνινοποίηση, η επεξεργασία της ύλης με ατμό υπό πίεση και μία ελαφρά όξινη προ-υδρόλυση. Κατόπιν των σταδίων αυτών λαμβάνει χώρα η ενζυμική υδρόλυση και η ζύμωση. Το σημαντικότερο στάδιο της παραγωγής βιοαιθανόλης αποτελεί το στάδιο της ενζυμικής επεξεργασίας της κυτταρίνης για την παραγωγή σακχάρων. Συνήθως του σταδίου αυτού προηγείται ένα στάδιο προκατεργασίας. (M. Galbe, G. Zacchi 2002)

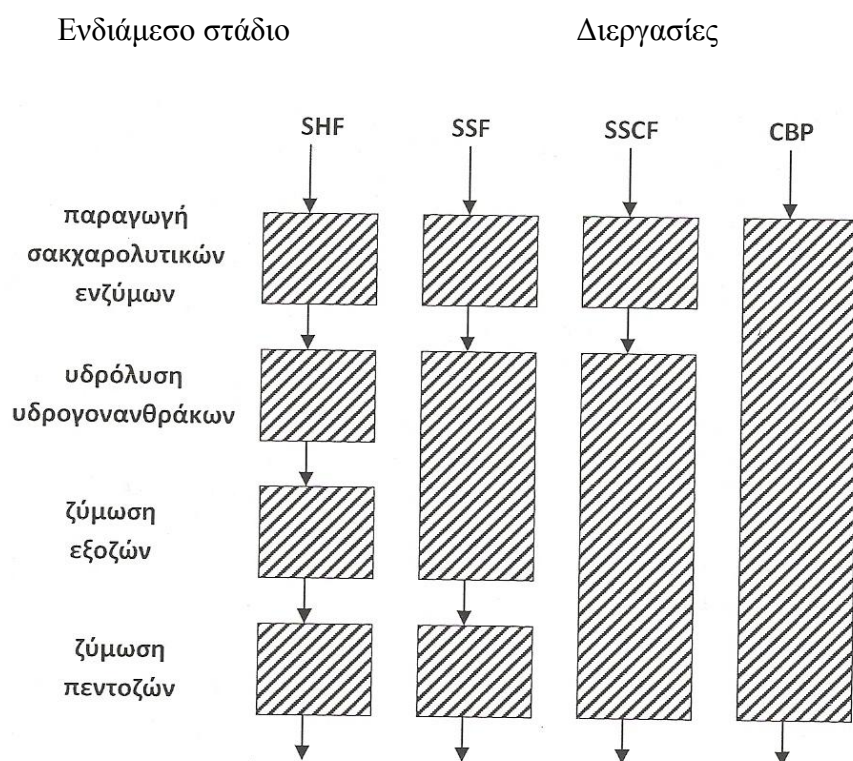
Μέσω της υδρόλυσης διασπώνται οι δεσμοί υδρογόνου των ημικυτταρινών και κυτταρινών με αποτέλεσμα τη μετατροπή τους σε σάκχαρα: πεντόζες και εξόζες. Αυτά τα σάκχαρα μπορούν στη συνέχεια να υποστούν ζύμωση για την παραγωγή βιοαιθανόλης. Οι πιο συχνά χρησιμοποιούμενες μέθοδοι υδρόλυσης μπορούν να ταξινομηθούν σε δύο βασικές κατηγορίες: στη χημική υδρόλυση (με τη χρήση πυκνού ή αραιού οξέος) και στην ενζυμική υδρόλυση. Στη χημική υδρόλυση η προκατεργασία και η υδρόλυση μπορούν να υλοποιηθούν από κοινού σε ένα στάδιο.



Εικόνα 3 :Διεργασία για τη παραγωγή βιοαιθανόλης, Πηγή [ Ye Sun, Jiayang Cheng 2002]



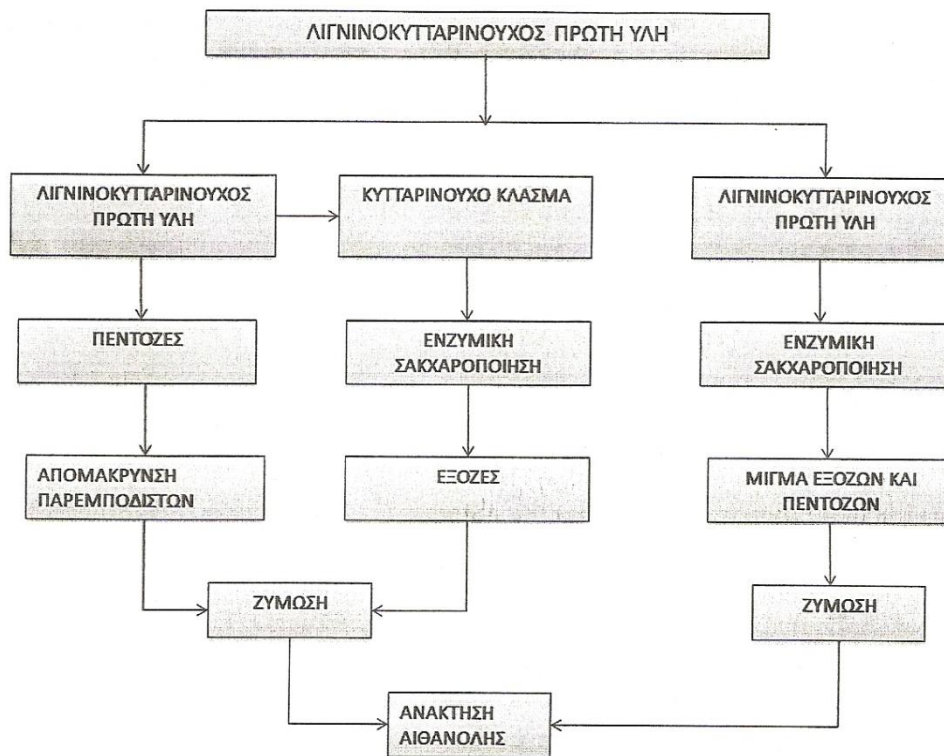
Οι τεχνολογίες παραγωγής βιοαιθανόλης διακρίνονται σε :



Σχήμα 2 : Τεχνολογίες για τη παραγωγή βιοαιθανόλης και ενδιάμεσα στάδια [Lynd et al. 2002]

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

Η διεργασία αυτή, όπως προκύπτει και από το παραπάνω σχήμα , περιλαμβάνει τέσσερα ξεχωριστά στάδια και τέσσερις διαφορετικούς βιοκαταλύτες [Lynd et al. 2002]. 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 [Szczo drak and Fiedurek 1995, Alfani et al. 2000, Zaldivar et al.2001].



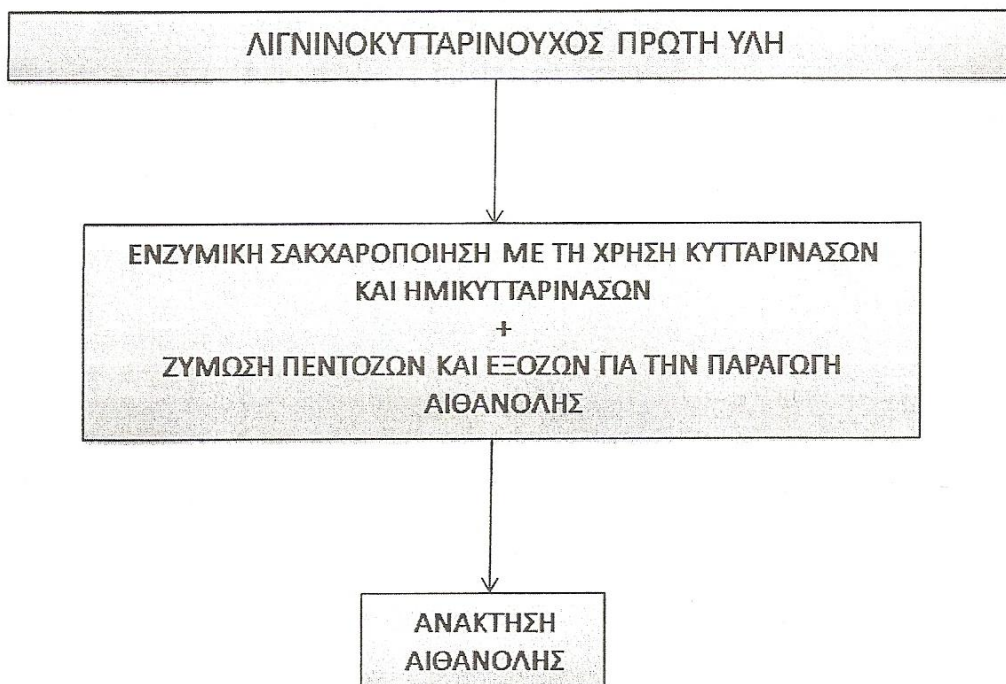
*Εικόνα 4:* SHF (Χριστακόπουλος 2010)

**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 και το pH που θα διεξαχθεί η σακχαροποίηση και η ζύμωση της κυτταρίνης [Ballesteros et al. 2004].



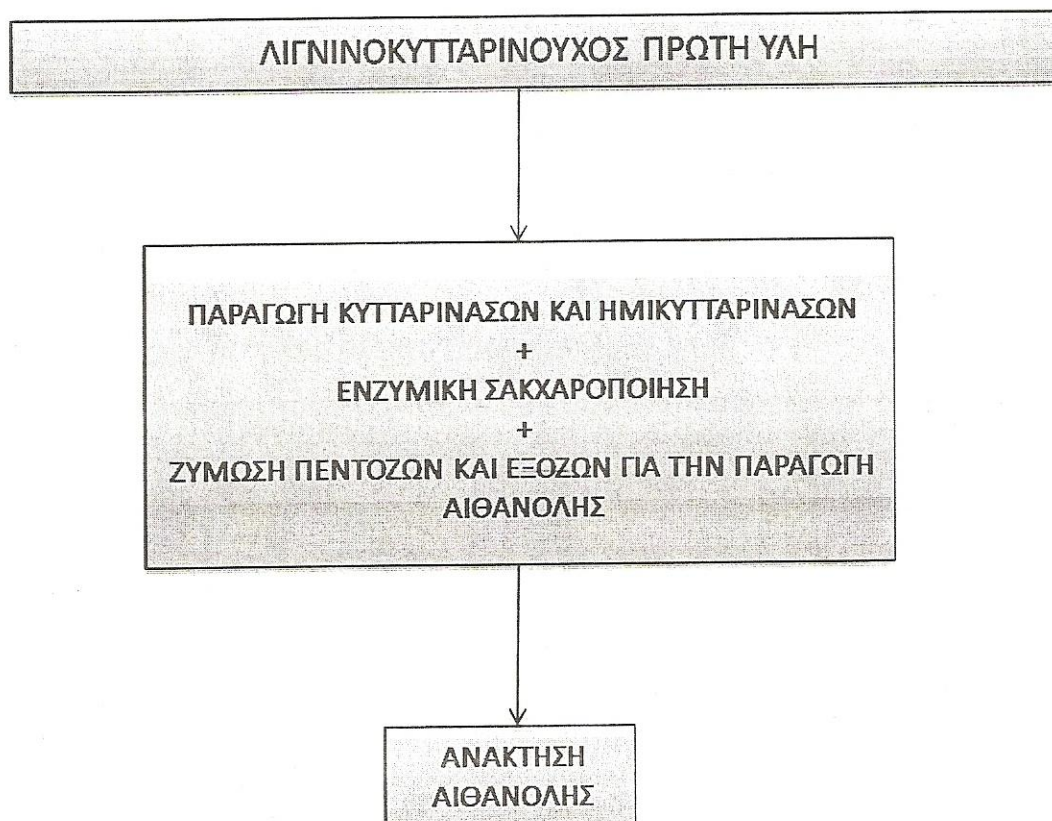
*Εικόνα 5* : SSF (Χριστακόπουλος 2010)

**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-29 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].



*Εικόνα 6:* CBP (Χριστακόπουλος 2010)

## 1.4 Διαδικασία Παραγωγής Αιθανόλης

Ένας σημαντικός παράγοντας που αποτρέπει την βιομηχανική χρήση των λιγνοκυτταρινούχων για την παραγωγή βιοαιθανόλης είναι η έλλειψη των μικροοργανισμών που είναι σε θέση να ζυμώσουν αποτελεσματικά (με υψηλή απόδοση και υψηλό ποσοστό) το σύνολο των σακχάρων (πεντόζες και εξοζες) που απελευθερώνονται κατά τη διάρκεια της προεπεξεργασίας και της υδρόλυσης. Όσον αφορά την εμπορική παραγωγή αιθανόλης, ο ιδανικός μικροοργανισμός πρέπει να έχει ευρεία χρήση υπόστρωματων, υψηλή απόδοση και μεγάλη παραγωγή αιθανόλης, ανοχή του στους αναστολείς που υπάρχουν στο υδρολύμα, ανοχή στις υψηλές συγκεντρώσεις αιθανόλης και της κυτταρινολυτικής δραστηριότητας και τέλος να έχει την ικανότητα ζύμωσης της σακχαρών σε υψηλές θερμοκρασίες. Οι πιο γνωστοί μικροοργανισμοί για τη παραγωγή αιθανόλης από εξοζες είναι ο σακχαρομύκητας *Saccharomyces Sacchamycetes* και το βακτήριο *Zymomonas*

*mobilis* που προσφέρουν υψηλές αποδόσεις αιθανόλης (90 - 97% της θεωρητικής) και μεγάλη ανοχή σε αιθανόλη μέχρι το 10% (w / v) περιπου σε μια ζύμωση. Απόδοση κοντα 99% επι της αιθανόλη με βάση την αρχική συγκέντρωση της γλυκόζης, επιτεύχθηκε πρόσφατα με το μητρικό στέλεχος *S. cerevisiae*. Κύριο μειονέκτημα των γηγενών στελεχών του *S. cerevisiae* και *Z. mobilis* είναι η αδυναμία τους να ζυμώσουν την ξυλοζή, όπου το τα C5 ζάχαρα κυριως προερχονται από την ημικυτταρίνη. Άλλοι γνωστοί μικροοργανισμοί που μπορούν να ζυμώσουν τη ξυλόζη σε αιθανόλη, όπως είναι τα εντερικά βακτήρια, οι ζυμες *stipitis Pichia*, *Candida shehatae*, και *Pachysolen tannophilus* που χαρακτηρίζονται όμως από χαμηλές αποδόσεις στη παραγωγή αιθανόλης και τους τάση να αφομοιώνται εκ νέου στη παραγωγή αιθανόλης. Για να ξεπεραστεί αυτό το μειονέκτημα τα γενετικά τροποποιημένα στελέχη του *S. cerevisiae* μπορούν να ζυμώσουν και τις εξοζες και τις πεντόζες που έχουν αναπτυχθεί. Ωστόσο, τα στελέχη, έχουν διξεί χαμηλή παραγωγικότητα σε σχέση με τη μετατροπή της ξυλοζης σε αιθανόλη. Επιπλέον, υπάρχει ένα πρακτικό μειονέκτημα για την ευρεία εφαρμογή του ανασυνδυασμένου γενους της αιθανολης, δεδομένου ότι τα πλασμίδια ξυλοζης με τα τροποποιημενα γονίδια συχνά απορρίπτονται από τον ξενιστή. (Panagiotou, G., Olsson, L., 2007)

Λαμβάνοντας υπόψη τα οφέλη από την διαδικασία της ζύμωσης σε υψηλες θερμοκρασιες συμπεριλαμβανομένων και υψηλών ρυθμών παραγωγής, όπου διευκολύνεται η ανάκτηση των προϊόντων, με τη χρήση ενός ευρέος φάσματος από υποστρώματα και το χαμηλό κίνδυνο μόλυνσης, η ζύμωση αιθανόλο με διάφορα αυστηρα αναερόβια και θερμοφιλα βακτήρια, όπως *Clostridium sp.* και *Thermoanaerobacter sp.* φανεται να είναι η καλύτερη προταση. Το κύριο μειονέκτημα από των θερμοφίλων αιθανολογενων είναι μικρη ανοχή τους σε αιθανόλη σε ποσα μικροτερα από 30 g / L. Επιπλέον, πολλά από τα γενη της αιθανολης παράγουν και άλλα προϊόντα όπως πτητικά λιπαρά οξέων και γαλακτικά οξέα, εκτός από αιθανολη. Πρόσφατα, δυο νέοι αιθανόλο-ανεκτικά προαιρετικά αναερόβια και θερμοφιλα στελέχη από *Geobacillus thermoglucosidasius* απομονώθηκαν από το λίπασμα, δείχνοντας τη δυνατότητα για την απομόνωση νέων ειδών / στελεχών από συναφείς πηγές. Μια μικτή βακτηριακή καλλιέργεια που κυριαρχουνταν από *Thermoanaerobacter*, *Thermoanaerobacterium* και *Caldanaerobacter* βρέθηκε πρόσφατα να παράγει ταυτόχρονα αιθανόλη και υδρογόνο από τη γλυκόζη κάτω από ακραίες θερμοφιλες συνθηκες. (Irina Angelidaki (2009))

Η ζύμωση αιθανόλης του άχυρο σίτου που έχει υδρολυθεί ως πρώτη ύλη έχει μελετηθεί ευρέως με διαφορετικούς μικροοργανισμούς, συμπεριλαμβανομένων και τις ζύμες, τα βακτήρια και τους μύκητες, και συνήθως καλλιεργούνται σε αμιγείς καλλιέργειες (Πίνακας 3). Ο *P. stipitis*, της *Kluyveromyces marxianus*, μητρικά και ανασυνδυασμένα στελέχη *S. cerevisiae*, ήταν οι πιο ευρέως μελετημένες ζύμες για τη ζύμωση αιθανόλης με βάση το υδρολυμένο άχυρο σίτου ως

πρώτη ύλη. Μέχρι στιγμής τα καλύτερα αποτελέσματα σε σχέση με την απόδοση αιθανόλης, τη τελική συγκέντρωση της αιθανόλης και την ογκομετρική παραγωγή αιθανόλης παρήχθησαν με τους μητρικούς, μη-προσαρμοσμένους ζυμομύκητες (Πίνακας 3). Η παραγωγή της αιθανόλης με *Pichia sp.* έχει καταφέρει να φθάσει μέχρι 0,42 (g / g), ωστόσο η μέση ογκομετρική παραγωγή της αιθανόλης ήταν περίπου η μισή σε σχέση με ότι έχει καταγραφεί με το *Kluyveromyces sp.* (Πίνακας 3). Κοινό πρόβλημα αποτέλεσε η προσέγγιση της υψηλής αποτελεσματικότητας της ζύμωσης (86% την απόδοση αιθανόλης), για αυτό το λόγο χρησιμοποιήθηκαν έτσι δύο διαφορετικοί φυλογενετικά μικροοργανισμοί, όπως έδειξαν ερευνητές το 1996. Στο πλαίσιο αυτό, μελετήθηκε η υδρόλυση του άχυρο σίτου με απλά σάκχαρα χρησιμοποιώντας το μύκητα *Trichoderma viride* με αερόβια αναπτυξή και ζύμωση με αποτέλεσμα τη μετατροπή ξυλόζης και γλυκόζης σε αιθανόλη από ζύμη *Pachysolen tannophylus*. Όσον αφορά τα θερμοφιλά, η αιθανόλη που παρήχθη από θερμοαναερόβια ανάπτυξη με πρώτη ύλη το προεπεξεργασμένο άχυρο σίτου ήταν πολύ λιγότερη σε σύγκριση με εκείνη που παρήχθη με ζυμομύκητες και μύκητες (Πίνακας 3). Προσφατά έχουν απομονωθεί αιθανολογικοί που ανήκουν σε θερμοαναερόβια, που παράγουν κυρίως αιθανόλη από πεντόζες με απόδοση κοντά στο 70%. Τα μόνα πρόσθετα προϊόντα εκτός της αιθανόλης ήταν οξικό οξύ και υδρογόνο. (Irina Angelidaki (2009))

**Πίνακας 4:** Ιδιότητες ορισμένων μικροοργανισμών που παράγουν αιθανόλη που εμπλέκονται στην αιθανόλη ζύμωση των άχυρο σίτου που βασίζονται στις υδρόλυσεις.

| Microorganism   | Phylogeny                 | $Y_E^2$ (%) | $r_E$ (g/L h) | $C_E$ (g/L) | Growth conditions                              | References               |
|---|---------------------------|-------------|---------------|-------------|--|--------------------------|
| <i>S. cerevisiae</i> <sup>b</sup>                         | Yeast                     | 99          | 1.16          | 31.2        | Mesophilic, facultative anaerobic              | Jorgensen (2009)         |
| <i>Thermoanaerobacter</i> BG111                           | Bacteria                  | 76          | 0.2           | 14.4        | Extreme thermophilic (70 °C), strict anaerobic | Georgieva et al. (2008)  |
| <i>Kluyveromyces marxianus</i> CECT 10875                 | Yeast                     | 65          | 0.5           | 36.2        | Thermotolerant (42 °C), facultative anaerobic  | Tomas-Pejo et al. (2009) |
| <i>S. cerevisiae</i> strains CPB.CB4                      | Yeast<br>(recombinant)    | 84          | 0.27          | 12.8        | Mesophilic, facultative anaerobic              | Otero et al. (2007)      |
| <i>Pichia stipitis</i>                                    | Yeast                     | 82          | 0.27          | 19          | Mesophilic, facultative anaerobic              | Nigam (2001)             |
| <i>Trichoderma viride</i> + <i>Pachysolen tannophylus</i> | Fungus                    |             |               |             | Mesophilic, aerobic fungus                     | Zayed and Meyer (1996)   |
| <i>E. coli</i> strain FBR5                                | Yeast                     | 86          | 0.25          | 11.8        | Facultative anaerobic yeast                    |                          |
|   | Bacteria<br>(recombinant) | 90          | 0.4           | 18.9        | Mesophilic, semianaerobic                      | Saha and Cotta (2006)    |

Τα ανασυνδυασμένα βακτήρια που τους έχει γίνει αφαίρεση των γονιδίων που ευθύνονται για την παραγωγή παραπροϊόντων έχουν εξεταστεί παραλληλα για την παραγωγή αιθανόλης. Ένα ανασυνδυασμένο βακτήριο, όπως *E. coli* στέλεχος FBR5, που έχει ελεγχθεί για την παραγωγή αιθανόλης από προεπεξεργασμένα άχυρο σίτου και παρουσίασε την υψηλότερη απόδοση αιθανόλης με την διαδικασία της βιομετατροπής από πρώτες ύλες που προέρχονται από άχυρο σίτου (Πίνακας 3). Η συγκέντρωση της αιθανόλης και η ογκομετρική παραγωγικότητα που αναφέρθηκαν συγκρίθηκαν με τη συγκέντρωση αιθανόλης που λαμβάνονται με ζύμη *P. stipitis* και τη παραγωγή της με ζύμη *K. marxianus* (Πίνακας 3). Οι ερευνητικές προσπάθειες που αφορούν τη ζύμωση αιθανόλης εξακολουθούν να βρίσκονται σε εξέλιξη. Η εύρεση νέων μη επεξεργασμένων τυπών

γενων αιθανόλης ή η κατασκευή νέων και πολλά υποσχόμενων γενετικά ελεγχόμενων οργανισμών (GMO) με μεγαλύτερη ανοχή στην αιθανόλη, στην παραγωγικότητα και στην απόδοση θα δημιουργήσει τη βάση για την μελλοντική ανάπτυξη απο εμπορική χρήσης λιγνίνης ως βάση για την παραγωγή βιοαιθανόλης από άχυρο σίτου. (Irina Angelidaki (2009))

### Διαφορετικές προσεγγίσεις για την ενζυματική υδρόλυση και ζύμωση

Η ενζυμική υδρόλυση και η ζύμωση μπορεί να είναι επιτυγχάνεται χρησιμοποιώντας διαφορετικές στρατηγικές: ξεχωριστές υδρόλυσεις και ζύμώσεις (SHF), ταυτόχρονη σακχαροποίηση και ζύμωση (SSF) και με απευθείας μικροβιακή μετατροπή (DMC). Σε SHF, υδρόλυσεις και ζύμώσεις που πραγματοποιούνται σε χωριστά δοχεία υπό τους δικές τους ιδανικές συνθήκες. Ωστόσο, το τελικό προϊόν αναστελεται από ένζυμικές δραστηριότητες και από τα προβλήματα μόλυνσης που σχετίζονται με αυτή η διαδικασία. Προκειμένου να εξαλειφθούν τα μειονεκτήματα της διαδικασίας SHF, έχει αναπτυχθεί η διαδικασία SSF η οποία συνδυάζει υδρόλυσεις και ζύμώσεις ταυτόχρονα σε ένα δοχείο. Τα σάκχαρα που παράγονται κατά τη διάρκεια της υδρόλυσης αμέσως ζύμωνουν σε αιθανόλη και, ως εκ τούτου τα προβλήματα που σχετίζονταν με συσσώρευση ζάχαρων και αναστολών των ενζύμων καθώς και οι μόλυνσεις μπορούν να αποφευχθούν. Ένα άλλο πλεονέκτημα της SSF σε σχέση με την SHF είναι η μείωση του κόστους που προκύπτει από τη χρήση μόνο ενός αντιδραστήρα. Το κύριο μειονέκτημα της SSF είναι οι διάφορες μεγιστες θερμοκρασίες της της υδρόλυσης και οι διαδικασίες των ζύμωσης. Οι περισσότερες ζύμες έχουν τη βέλτιστη θερμοκρασία λειτουργίας αναμεσα στους 30°C με 35°C, ενώ τα ένζυμα έχουν την βέλτιστη δραστηριότητα τους περίπου στους 50° C.

Ερευνητες αξιολόγησαν τις επιδόσεις και της SSF αλλά και της SHF με χρήση αραιού οξέος προεπεξεργασμένου άχυρου σίτου με την ανασυνδιασμένη *E. coli* (FBR5). Η SHF προσέγγιση λειτούργησε καλύτερα από SSF και απέδωσε υψηλότερα ποσα αιθανόλης σε μικρότερο χρόνο ζύμωσης. Η αποτοξίνωση έγινε με τη μεθοδο της υπερασβεστωσης μειώνοντας δραματικά το χρόνο των ζύμωσης SHF και ενίσχυσε την απόδοση της αιθανόλης στο SSF. Μεγαλύτερη απόδοση είχε η SHF προσέγγιση από την SSF όπου και στις δυο προσεγγίσεις αναφέρθηκε ότι χρησιμοποιούσαν το ίδιο στέλεχος (*E. coli*) και το ίδιο αλκαλικό υπεροξειδίου και ίδιο προεπεξεργασμένο άχυρου σίτου. Ωστόσο, ο χρόνος που απαιτείται για τη χωριστή ενζυματική υδρόλυσης σε προσέγγιση SHF είναι ο λογος κιολας που απορρυφθηκε αυτη η διαδικασία. Λαμβάνοντας υπόψη το συνολικό χρόνο (ξεχωριστή της υδρόλυσης και ζύμωσης) στην SHF διαδικασία καταληγουμε ότι η προσέγγιση SSF είναι πολύ πιο συμφέρουσα και πιο λειτουργική από την SHF. Εκτιμάται ότι οι διαδικασίες SHF και SSF είναι αποτελεσματικές για τη βιομετατροπή αερίου ανάπτυγματος άχυρου σίτου. Οι

συγγραφείς ανέφεραν ότι ο χρόνος που απαιτείται για την ολοκλήρωση της SSF και της SHF ήταν 30 και 96 ώρες (72 ώρες + 24 της υδρόλυσης η ζύμωσης), αντίστοιχα. Σε αντίθεση, σημαντικά ταχύτερη η παραγωγή αιθανόλης στη διαδικασία SSF, με τη τελική απόδοση της αιθανόλης να είναι υψηλότερη της διαδικασίας SHF (81% της θεωρητικής σε σύγκριση με το 68% στην SSF). Στην διαδικασία της DMC, κανένα εξωτερικό ένζυμο δε προστίθεται και η υδρολυτική διαδικασία ρυθμίστηκε από τα ένζυμα που παράγονται από τους μικροοργανισμούς. Προς γνώση μας, η DMC των αλκαλικών προεπεξεργασμένων αχύρων σίτου για παραγωγή αιθανόλης ερευνήθηκε μόνο με το μεσόφιλο μύκητα *Fusarium oxysporum* F3 ωστόσο, ωστόσο, η απόδοση και η παραγωγή που αναφέρθηκε ήταν σχετικά χαμηλή. (Demirbas, A., 2005. ,Irini Angelidaki (2009))

## 1.5 Ο Μύκητας *Fusarium oxysporum*

Το φυσικό στέλεχος F3 του μύκητα *Fusarium oxysporum* μπορεί να μετατρέψει αποτελεσματικά κυτταρινούχα και ημικυτταρινούχα παραπροϊόντα σε αιθανόλη, στα πλαίσια μίας ενοποιημένης διεργασίας βιομετατροπής (consolidated bioprocessing).(Xiros 2009)



Εικόνα 7: *Fusarium oxysporum*

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



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 ξυλόλη 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]. 42

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].

## Κεφάλαιο 2: Άχυρο Σίτου

### 2.1 Άχυρο Σίτου: Η παραγωγή και η κατάληξη

Το σίταρι (*Triticum aestivum* L.) είναι η πιο ευρέως καλλιεργούμενη καλλιέργεια, που καλλιεργείται 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 ξηρών το 2008 εκτιμήθηκε ότι ήταν πάνω από 650 T. Υποθέτοντας ότι το υπόλειμμα των καλλιεργειών αγγίζει το ποσοστό του 1.3, δηλαδή είναι περίπου 850 T καταλοίπων σίτου ανα ετήσια παραγωγή. Τα υπολείματα του παραγόμενου άχυρου μπορούν να μείνουν στη καλλιεργούμενη γη, εμπλουτίζοντας και πάλι το έδαφος ή ακόμη να καούν ή να μετακινηθούν από τη γη ανάλογα με την απόφαση που θα λαβεί ο γαιοκτήμονας. Η καύση του σιταριού (άχυρο) έχει δοκιμασθεί για μεγάλο χρονικό διάστημα τα τελευταία χρόνια ωστόσο, αυτή η πρακτική έχει αμφισβητηθεί λόγω της αυξημένης ανησυχίας για τις επιπτώσεις στην υγεία από τους καπνούς που προέρχονται από την καύση στην υπαίθρο. Η καύση των υπολειμάτων του άχυρο σίτου περιεχει μεγάλα ποσά ατμοσφαιρικών ρύπων, συμπεριλαμβανομένων των σωματιδίων (PM10), CO και NO<sub>2</sub>. Η ευρεση ενός εναλλακτικού τρόπου διάθεσης των πλεονασμάτων του άχυρου σίτου παρουσιάζει μεγάλο ενδιαφέρον και ενώ παραλληλα αποτελεί μια άμεση αναγκη. (Kerstetter and Lyons, 2001)

Η πλήρης απομάκρυνση των υπολειμμάτων σιταριού μπορεί να μειώσει τα αποθέματα του εδάφους σε οργανική υλη και να οδηγήσει σε διάβρωση του εδάφους. Το ποσοστό των άχυρο σίτου που πρέπει να μείνει στο έδαφος εξαρτάται από τις καιρικές συνθήκες, την υπάρχουσα γονιμότητα του εδάφους, των καταλοίπων της γης, και τις πρακτικές οργώματος. Προκειμένου να εξασφαλιστεί η πρόληψη της διάβρωσης του εδάφους, το 60% της εδαφοκάλυψης θα μπορούσε να θεωρηθεί ότι απαιτεί περίπου 1,7 Mg υπολείμματος σιταριού ανά εκτάριο. Η παγκόσμια μέση απόδοση του σίτου είναι περίπου 2,4 Mg ανα εκτάριο και ως εκ τούτου, περίπου 430 T από άχυρο σίτου ετησίως είναι διαθέσιμα για την παραγωγή των περίπου 120 GL βιοαιθανόλης. Αυτός ο όγκος της αιθανόλης μπορεί να αντικαταστήσει περίπου 93 (± 3) (%) της παγκοσμιας καταναλώσης βενζίνης, όταν οι διαφορές τους σε ενεργειακό περιεχόμενο και ο αριθμός οκτανίων είναι σχεδόν αμελιτεα. Πολλές ερευνησες έχουν δείξει ότι υπό τις κατάλληλες ρυθμίσεις των παραμέτρων του κινητήρα, το μίγμα αιθανόλης-βενζίνης θα οδηγήσει στη βελτιωση της απόδοσης του κινητήρα και θα μειώσει τις εκπομπές διοξειδίου του άνθρακα. Αλλαζοντας την καύση του άχυρου σίτου για την παραγωγή αιθανόλης από το πλεόνασμα του άχυρου σίτου φαίνεται να είναι μια πολλά υποσχόμενη προσέγγιση για την παραγωγή ενέργειας από απόβλητα βιομάζας και εν μέρει καταφερνει τη

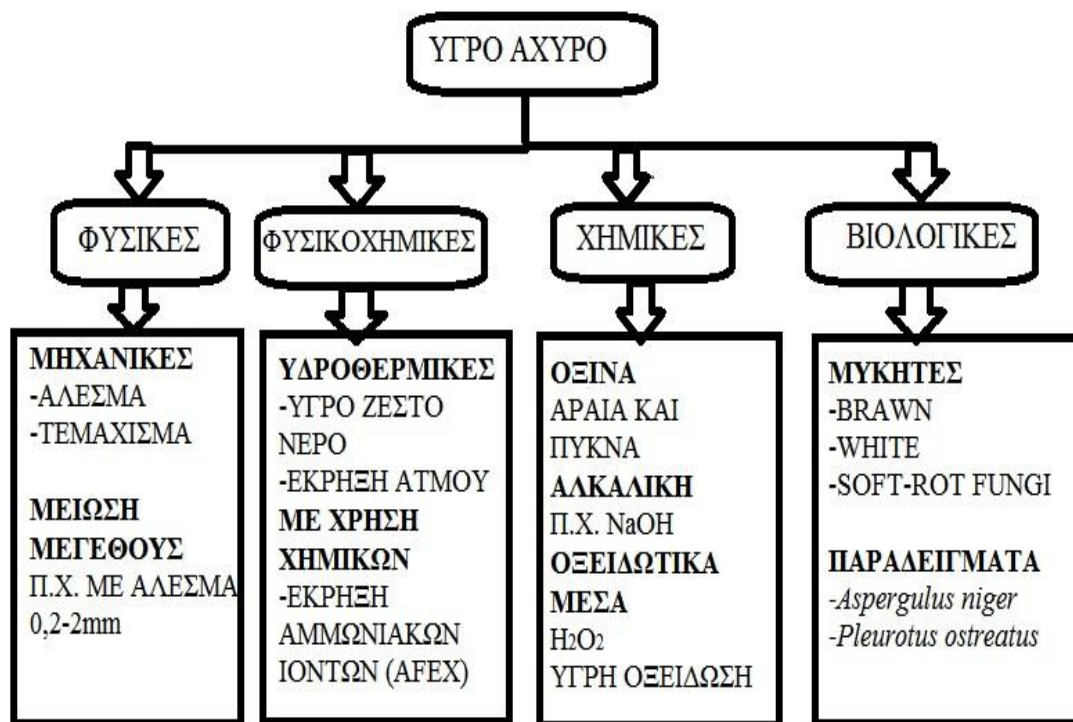
μείωση της εξάρτησης από τα ορυκτά καύσιμα, ενώ παραλληλα συμβάλλει στη μείωση του φαινομένου του θερμοκηπίου και τη βελτίωση των αερίων που βρισκονται στην ατμόσφαιρα των πόλεων.(Farid Talebnia, Dimitar Karakashev, Irimi Angelidaki (2009)

## **2.2 Άχυρο σίτου ως πιθανή πρώτη ύλη για την 2η γενιά βιοαιθανόλη**

Το άχυρο σίτου, όπως οποιαδήποτε άλλη βιομάζα, με λιγνοκυτταρινούχα σύνθεση, είναι ένα πολύπλοκο μίγμα κυτταρίνης, ημικυτταρίνης και λιγνίνης με μια μικρή ποσότητα του διαλυτων υποστρώματων και τέφρα. Η χημική σύνθεση του άχυρο σίτου θα μπορούσε να διαφέρει ελαφρά ανάλογα με το είδος του σιταρίου, του εδάφους, και τις κλιματικές συνθήκες. Η κυτταρίνη, η ημικυτταρίνη και η λιγνίνη περιεχόμενα του άχυρο σίτου είναι της τάξης του 33-40%, 20-25%, και 15-20 % (w / w), αντίστοιχα. Τα στελέχη της κυτταρίνης ομογενοποιούνται και στενες (μικρες-κλειστες) ομάδες με τέτοιο τρόπο ώστε ούτε το νερό ούτε το ένζυμο να μπορεί να διεισδύσει μέσα σε αυτή τη δομή. Η ημικυτταρίνη εξυπηρετεί στη σύνδεση μεταξύ λιγνίνης και των ίνωμ κυτταρίνης και είναι εύκολη η υδρολύση της από αραιό οξύ ή βάση καθώς και απο ημι-κυτταρικο ένζυμο. Η λιγνίνη συνδέεται ομοιοπολικά με την κυτταρίνη και τη σημύδα (κυρίαρχο συστατικό της ημικυτταρίνης και των πολυμερών των υδατανθράκων στο άχυρο σίτου), έτσι ώστε η λιγνίνη και η κυτταρίνη να αλληλεπιδρούν και να ασκούν μεγαλύτερη επιρροή στην πεπτικότητα από ότι τα λιγνοκυτταρινούχα υλικά. Λόγω αυτής της πολυπλοκότητας της μήτρας της ξυλοκυτταρίνης, η παραγωγή αιθανόλης από άχυρο σίτου απαιτεί τουλάχιστον τέσσερις μεγάλες μονάδες επεξεργασίας, συμπεριλαμβανομένης της προεπεξεργασίας, της υδρολύσης, της ζύμωσης και της απόσταξης. Σε αντίθεση με τη σακχαρόζη ή το άμυλο, η λιγνοκυτταρινούχα βιομάζα απο άχυρο σίτου πρέπει να είναι προεπεξεργασμένη ώστε να είναι αποτελεσματική η διαδικασία του ενζυμικού αποπολυμερισμού. (Laureano-Perez et al., 2005).

(Farid Talebnia, Dimitar Karakashev, Irimi Angelidaki (2009)

## 2.3 Προκατεργασίες στο άχυρο σίτου



*Εικόνα 8:* Κοινές μέθοδοι που χρησιμοποιούνται για την προεπεξεργασία του άχυρο σίτου (pws)

Η προεπεξεργασία έχει ως στόχο να αυξήσει το ποσοστό της παραγωγής καθώς και τη συνολική απόδοση της απελευθέρωσης των σακχάρων στο στάδιο της υδρόλυσης. Μια σειρά μεθόδων προεπεξεργασίας έχουν αναπτυχθεί και εφαρμοστεί για τη βιομάζα του άχυρο σίτου. Η συνολική απόδοση της προεπεξεργασίας, συνδέεται με την αναλογία μεταξύ των αναστολεων σχηματισμού και υπόστρωματων πεπτικότητας. Οι προ-επεξεργασίες κατατάσσονται κατα προσεγγυση σε φυσικες, φυσικοχημικές, χημικές και βιολογικές διεργασίες (Εικ. 1). Οι μέθοδοι που εφαρμόζονται συνδυάζουν διαφορες αρχες, όπως τη μηχανική μαζί με τη θερμική και τις χημικές επιδράσεις προκειμένου να επιτευχουν το στοχο της υψηλοτερης απόδοσης στην απελευθέρωση ζάχαρων, τη χαμηλή αποδοση τοξικων ουσιών και χαμηλή κατανάλωση ενέργειας. Οι παραπανω ειναι οι κύριες μέθοδοι (αρχες) προεπεξεργασίας, που εφαρμόζονται κυριως για το σιτάρι άχυρο. (Hendriks and Zeeman, 2009).

### 2.3.1 Φυσικές

Το πρώτο βήμα για τη χρήση του άχυρου σίτου στην παραγωγή αιθανόλης είναι η μείωση του μεγέθους του μέσω του άλεσματος ή του ξεφλούδισματος (Εικ. 1) βελτιώνεται έτσι η αποτελεσματικότητα της μεταγενέστερης επεξεργασίας. Ωστόσο, η χρήση πολύ μικρών σωματίδιων μπορεί να μην είναι επιθυμητή λόγω της υψηλής κατανάλωσης σε ενέργεια στο στάδιο άλεσης, καθώς υπάρχουν και αρνητικές επίδρασεις στην ακόλουθη μέθοδο προκατεργασίας. Το αρχικό και τελικό μέγεθος των σωματιδίων, η υγρασία και ιδιότητες υλικών είναι μεταξύ των μεταβλητών που επηρεάζουν τόσο την ενεργειακή κατανάλωση αλλά και την αποτελεσματικότητα της μετέπειτα επεξεργασίας. Όσο μικρότερο είναι το μέγεθος των σωματιδίων και τόσο υψηλότερη είναι η υγρασία και η περιεκτικότητα σε άχυρο τόσο υψηλότερη είναι και η κατανάλωση ενέργειας. Η μείωση του μεγέθους έχει αποδειχθεί ότι ενίσχυει την ευαισθησία των ακατέργαστων υποστρώματων στην ενζυμική υδρόλυση. Η απελευθέρωση της γλυκόζης και της ξυλόζης από τα μικρότερα τεμαχία του άχυρου μπορούν να αυξηθούν μέχρι και 39% των θεωρητικών μέγιστων τιμών μετά από 24 ώρες υδρολύσεως σε σύγκριση με τα δείγματα αναφοράς. Η υγρή στη οξείδωση έδειξε την έντονοτερη επίδραση στα μεγαλύτερα σωματίδια από στα μικρότερα σωματίδια. (Sudhagar et al.,2004)

### 2.3.2 Φυσικοχημικές

Η διαλυτοποίηση των συστατικών της λιγνοκυτταρίνης εξαρτάται από την θερμοκρασία, το pH και την υγρασία. Τα λιγνοκυτταρινούχα υλικά όπως το άχυρο σίτου, η ημικυτταρίνη είναι η πιο θερμικά και χημικά ευαίσθητο κλάσμα. Ενώσεις όπως της ημικυτταρίνης αρχίζουν να διαλύονται στο νερό με θερμοκρασία μεγαλύτερη από 150 βαθμών Κελσίου και με τη βοήθεια διαφόρων εξαρτημάτων, σε αντίθεση με τη ξυλάνη που μπορεί να εξαχθεί το πιο εύκολα. Υγρό ζεστό νερό (KEA), έκρηξη ατμού (SE) και έκρηξη ινώντων αμμωνίας (AFEX) είναι μεταξύ των φυσικοχημικών μεθόδων που ερευνήθηκαν για την προκατεργασία των άχυρο σίτου (Εικ. 1).

#### Υγρό Ζεστό Νερό

Υγρό ζεστό νερό είναι μια υδροθερμική μέθοδος προκατεργασίας, όπου εφαρμόζεται πίεση για να διατηρηθεί το νερό σε υγρή κατάσταση σε αυξημένη θερμοκρασία. Η θερμοκρασία είναι στους 170 – 230 βαθμών Κελσίου και με πίεση μεγαλύτερη από 5 MPa. Υπάρχει έτσι η δυνατότητα με αυτή τη μέθοδο να απελευθερώνονται κλάσμα υψηλής περιεκτικότητας σε ημικυτταρινούχα

σακχάρα κυρίως με τη μορφή ολιγομερών που συμβάλλουν με αυτο το τροπο στην μείωση των ανεπιθύμητων προϊόντων αποικοδόμησης. Η θερμοκρασία και ο χρόνος αποδειχθηκε οτι ειναι οι πιο σημαντικες παραγοντες στην ανάκτηση των ημικυτταρινικων σακχάρων και στην απόδοση της μετέπειτα ενζυματικής υδρόλυσης προεπεξεργασμένου άχυρου σίτου. Υπαρχουν ανέφορες οτι η μέγιστη ανάκτηση της ημικυτταρίνης και των παράγωγων των σακχάρων (HDS) και η υψηλότερη απόδοση της ενζυματικής υδρόλυσης επιτεύχθηκε σε διάφορες συνθήκες χρόνου και θερμοκρασίας. Ταυτόχρονη βελτιστοποίηση της απόκρισης και των δυο αυτων μεταβλητων συνέβη στα 188 λεπτα και στους 140 βαθμους κελσιου υποδηλώνοντας ετσι δυο σταδία προεπεξεργασίας που θα είναι πλέον κατάλληλα για τη διαμόρφωση της διαδικασίας. Σε πιλοτική κλίμακα (έως 100 kg / h) για μια μοναδα παραγωγης, με την χρησιμοποίηση δύο σταδίων της υδροθερμικής προεπεξεργασίας σε συνεχή λειτουργία για το άχυρο σίτου εχει σχεδιασει. Το πρώτο βήμα είναι η διαβροχή του άχυρο στους 80 °C για 5-10 λεπτά που ακολουθείται από την δεύτερη κατεργασία σταδίου σε υψηλότερη θερμοκρασία. Στο δεύτερο στάδιο, στη προκατεργασία με 195°C και 6-12 λεπτά οδήγησε σε 70% και 93-94% ανάκτηση ημικυτταρίνης και κυτταρίνης, αντίστοιχα.

### Έκρηξη Ατμού

Η εκρηξη ατμού (autohydrolysis) είναι μία από τις πιο αποδοτικές και ευρέως χρησιμοποιούμενες μεθόδους προκατεργασίας για το άχυρο σίτου. Σε αυτή τη μέθοδο, μειωνουμε το μεγέθους της βιομάζα θερμαίνοντας γρήγορα με ατμό υψηλής πίεσης για ένα χρονικό διάστημα και στη συνέχεια μειωνουμε τη πίεση ξαφνικά με αποτελεσμα να κάνει τα υλικά υποβάλλονται στη διαδικασια “εκρηκτικής” αποσυμπίεση. Οι θερμοκρασίες που χρησιμοποιουνται ειναι στην περιοχή των 160 - 230 °C για μία χρονική περίοδο από αρκετά δευτερόλεπτα έως λίγα λεπτά. Η αποτελεσματικότητα της εκρηξης ατμου επηρεάζεται από διάφορους παράγοντες, συμπεριλαμβανομένων της θερμοκρασίας, το χρόνο παραμονής, το μέγεθος των σωματιδίων και της περιεκτικότητας τους σε υγρασία. Η προσθήκη χημικών ουσιών, όπως H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, ή SO<sub>2</sub> μπορεί να βελτιώσει το ποσοστό και το ρυθμο της απομάκρυνσης ημικυτταρίνης και να οδηγήσει σε μεγαλύτερη απόδοση της ενζυματικής υδρόλυσης σε χαμηλότερες θερμοκρασίες. Μετελες εδειξαν οτι η μέγιστη απολιγνινοποίηση επιτυγχανεται με προεπεξεργασία στο 210 βαθμους κελσιου και 1-2 λεπτα, ενώ η μέγιστη διαλυτοποίηση της κυτταρίνης εγινε σε πλούσιο στερεό κλάσμα (83.7%) και υψηλη παραγωγή γλυκόζης (93,5%) που καταγραφηκε κατά τη διάρκεια της ενζυματικής υδρόλυσης στους 230 βαθμους κελσιου για 1 λεπτο. Οι τιμές αυτές θα μπορούσαν να συγκριθούν με τη μέγιστη παραγωγή γλυκόζης από μη επεξεργασμένο δείγμα που ήταν μόνο 11,8%, πραγμα που δείχνει μεγάλη βελτίωση της “πέψης” του άχυρο σίτου με τη συγκεκριμενη διαδικασια.

Ερεύνες απεδείαξαν την επίδραση της εκρηξης ατμου στο αραιωμένο οξύ (0,9%), ή στο νερο εμποτισμένο με άχυρο σίτου σε διάφορες θερμοκρασίες και χρόνους παραμονής. Τα καλύτερα αποτελέσματα ληφθηκαν από το οξύ εμποτισμένο στο άχυρο σίτου στους 180C και 10 λεπτά όπου υπηρξε σχεδόν πλήρη διάλυση των συστατικών και ημικυτταρίνης η μεγαλύτερη αποδόση της γλυκόζης και αιθανόλης με βάση το αρχικο ακατέργαστο υλικο. Μολονότι υπηρχαν αυτα τα αποτελεσματα σε υψηλες θερμοκρασίες με αυξημένη ενζυματική απόδοση υδρόλυσης της κυτταρίνης σε πλούσιο στερεό κλάσμα, η συνολική απόδοση της γλυκόζης ήταν απο τις χαμηλότερες λόγω μερικής απώλειας της κυτταρίνης. Σε μια παρόμοια μελέτη, που εδοσε μικροτερη σημασια στο στάδιο του εμποτισμού, βρεθηκε οτι η μεγαλύτερη συνολική απόδοση του αθροίσματος της γλυκόζης και ξυλόζης εγινε σε επεξεργασία στους 190<sup>o</sup>C και 10 min για το άχυρο σίτου. Το είναι ασυνήθιστο για τα άλλα λιγνοκυτταρινικά υλικά είναι η μέγιστη απόδοση των ημικυτταρινικών και κυτταρινικών σάκχαρων κατω απο τις ίδιες συνθήκες προκατεργασίας. (Farid Talebnia, Dimitar Karakashev, Irini Angelidaki (2009)

### **Εκρηξη Αμμωνιακων Ιοντων**

Η εκρηξη των αμμωνιακων ιοντων (AFEX) είναι μια αλκαλικη θερμική μεθοδος προεπεξεργασίας κατά την οποία τα λιγνοκυτταρινούχα υλικά εκτίθενται σε υγρή αμμωνία σε υψηλή θερμοκρασία και πίεση για ενα συγκεκριμενο χρονικο διαστημα και ακολουθείται μία ταχεία εκτονωση. Τα ποωδη φυτα και τα γεωργικά υπολείμματα είναι κατάλληλα για τη προεπεξεργασία AFEX. Η μέθοδος αυτή δεν παράγει αναστολείς και το μικρό μέγεθος των σωματιδίων δεν είναι απαραίτητο για την αποτελεσματικότητα της. Οι κύριες παράμετροι που επηρεάζουν την AFEX είναι η διαδικασία φόρτωσης της αμμωνίας, η θερμοκρασία, η πίεσης απαέρωσης, η περιεκτικότητα σε υγρασία της βιομάζας και ο χρόνος παραμονής. Αυτή η προκατεργασία έχει σαν μειονεκτήματα τη μικρη αποδοση για βιομάζα που περιέχει υψηλες συγκεντρωσεις λιγνίνης (π.χ. μαλακό ξύλο εφημερίδα) καθώς και η διαλυτοποίηση του στερεού υλικού ιδιαίτερα ημικυτταρίνης σε πολύ μικρα κλάσματα. (Farid Talebnia, Dimitar Karakashev, Irini Angelidaki (2009)

Σε συγκριση που εγινε μεταξύ της προεπεξεργασιας με ατμού και με αμμωνία στο άχυρο σίτου ανέφερθηκε ότι η ενζυματική υδρόλυση βελτιώθηκε με αρκετές διπλωσεις (στρωσεις) είτε περισσότερες ή λιγότερες στην ίδια τάξη μεγέθους και για τις δύο προεπεξεργασίες. Ωστόσο, η μεγαλύτερη συγκεντρωση γλυκόζης αναφερθηκε (0,38 g / g ξηρής μάζας) με τη προεπεξεργασια με αμμωνία. Η προεπεξεργασία της AFEX στο άχυρο σίτου σε αντίθεση με άλλα λιγνοκυτταρινούχα

υλικά έχει αναφερθεί σπάνια. Ενώ οι θεωρητικές αποδόσεις, είναι παρομοίες με τη ζάχαρη, με την AFEX προεπεξεργασία και κάτω από τις καλύτερες δυνατές συνθήκες, έχουν αναφερθεί παρομοίες αποδοσεις για διάφορα γεωργικά υπολείμματα. Σαν συμπέρασμα βγαζουμε οτι είναι αναγκαιες περισσότερες πειραματικές εργασίες για την αντιμετώπιση των προβλημάτων και της αύξηση της αποτελεσματικότητας αυτής της μεθόδου προεπεξεργασίας για το άχυρο σίτου.

(Farid Talebnia, Dimitar Karakashev, Irini Angelidaki (2009)

### 2.3.3 Χημική Προεπεργασία

Η χημική προεπεξεργασία, για το άχυρο σίτου, χρησιμοποιεί για διαφορετικές χημικές ουσίες όπως τα οξέα, τα αλκάλια και τα οξειδωτικά μέσα, π.χ. υπεροξειδίου και όζον (Εικ. 1). Μεταξύ αυτών των μεθόδων, προκατεργασίας με αραιά οξέα η πιο διαδεδομένη είναι με τη χρήση του  $H_2SO_4$ . Ανάλογα με το είδος των χρησιμοποιούμενων χημικών, η προεπεξεργασία θα μπορούσε να έχει διαφορετικά αποτελέσματα για τα δομικά στοιχεία των λιγνοκυτταρινών. Η αλκαλική προκατεργασία, η οζονόλυση, με υπεροξείδιο και η προκατεργασία με υψηλή οξείδωση είναι πιο αποτελεσματικές στην απομάκρυνση της λιγνίνης, ενώ προεπεξεργασία με αραιό οξύ είναι πιο αποτελεσματική στην διαλυτοποίηση ημικυτταρίνης.

#### Οξίνη Υδρόλυση

Ανόργανα οξέα όπως το  $H_2SO_4$  έχουν χρησιμοποιηθεί για την προεπεξεργασία του άχυρου σίτου για τη βελτίωση της μεταγενέστερης ενζυματικής υδρόλυσης. Ανάλογα με τη πυκνότητα του οξέος που χρησιμοποιείται στη διαδικασία, θα μπορούσαμε να τις διαχωρίσουμε σε πυκνή και σε αραιή όξινη υδρόλυση (Εικ. 1). Στην πρώτη την περίπτωση, η βιομάζα κατεργάζεται σε υψηλή συγκέντρωση των οξέων σε θερμοκρασίες περιβάλλοντος, γεγονός που οδηγεί σε υψηλή απόδοση των σακχάρων. Η συμπυκνωμένη όξινη κατεργασία παρέχει το πλεονέκτημα ότι δε χρησιμοποιεί κανένα ένζυμο για τη σακχαροποίηση, ωστόσο, αυτή η μέθοδος έχει αρκετά μειονεκτήματα συμπεριλαμβανομένης της υψηλής οξιτητας, τη κατανάλωση ενέργειας, τη διάβρωση του εξοπλισμού, το χρόνο αντίδρασης και την αναγκαστική ανάκτηση οξέος μετά τη θεραπεία που όλα αυτά περιορίζουν σε μεγάλο βαθμό την εφαρμογή της. Στη δεύτερη μέθοδο η κατεργασία γίνεται με χαμηλής συγκέντρωσης οξέα π.χ. 0,5-1%  $H_2SO_4$  και σε υψηλές θερμοκρασίες. Η υψηλή θερμοκρασία είναι ευνοϊκή για την επίτευξη αποδεκτών ρυθμών μετατροπής της κυτταρίνης σε γλυκόζη. Παρά τη χαμηλή συγκέντρωση του οξέος και του μικρού χρόνου αντίδρασης, η εφαρμογή υψηλών θερμοκρασιών στη αραιή όξινη υδρόλυση επιταχύνει το ρυθμό της αποσύνθεσης της



ημικυτταρινικής ζάχαρης και διάβρωνει με ταχύ ρυθμό τον εξοπλισμό. Τα κύρια μειονεκτήματα αυτής της μέθοδου είναι ο σχηματισμός πολλών ανασταλτικών παραπροϊόντων, το pH και απαίτηση για εξουδετέρωση στο τέλος της διεργασίας. Προκειμένου να μειωθεί η υποβάθμιση των σάκχαρων, έχει αναπτυχθεί μια διαδικασία δύο σταδίων όπου τα σάκχαρα της ημικυτταρίνης απελευθερώνονται κατά το πρώτο στάδιο της που πραγματοποιείται σε ηπιότερες συνθήκες και ακολουθεί το δεύτερο στάδιο υδρόλυσης της κυτταρίνης στο πλούσιο στερεό υπόλειμμα υπό σκληρότερες συνθήκες. Ανάλογα με τη φύση των πρώτων υλών των λιγνοκυτταρινικών, μια περιοχή θερμοκρασιών που χρησιμοποιείται είναι συνήθως μεταξύ 140-190 βαθμών κελσίου στο πρώτο στάδιο και 190-230 βαθμών κελσίου στο δεύτερο στάδιο. (Galbe and Zacchi, 2002).

### **Οξειδωτικοί Παράγοντες**

Αλκαλική / οξειδωτική προεπεξεργασία. Σε αυτή τη προκατεργασία, η οξειδωτική ένωση όπως το υπεροξείδιο του υδρογόνου ( $H_2O_2$ ) ή το υπεροξικό οξύ ( $C_2H_4O_3$ ) χρησιμοποιείται σε συνδυασμό με μια αλκαλική ένωση (π.χ.  $NaOH$ ) υπό ήπια θερμοκρασία. Αυτή η διεργασία είναι πιο αποτελεσματική στη βελτίωση της χώνευσης υπολειμμάτων καλλιέργειών σε σύγκριση με τη θεραπεία μόνο με  $NaOH$ . Ερευνες κατέληξαν στη χρήση του  $H_2O_2$  για την απολιγνινοποίηση των γεωργικών υπολειμμάτων όπως το άχυρο σίτου. Η προεπεξεργασία διεξήχθη με 1%  $H_2O_2$  και pH 11,5 στους  $25^{\circ}C$  για 18-24 ώρες. Υπό αυτές τις συνθήκες, περισσότερη από τη μισή ποσότητα της λιγνίνης και η περισσότερη από την ημικυτταρίνη διαλυτοποιήθηκαν. Οι τιμές ήταν υψηλότερες από εκείνες που χρησιμοποιούσαν  $NaOH$  (χωρίς τη προσθήκη  $H_2O_2$ ) σε αρκετές περιπτώσεις. Η ενζυματική υδρόλυση σε επεξεργασμένο άχυρο σίτου με τη παρουσία του  $H_2O_2$  έδειξε, μια σαφή βελτίωση με αποτελέσματα της μετατροπής σχεδόν 100% που επιτεύχθηκαν σε pH 11,5. Η διεργασία μόνο με  $NaOH$  υπό πανομοιότυπες συνθήκες παρουσίασαν σημαντική αύξηση στην χώνευση κυτταρίνης μόνο με  $pH > 12$ , ωστόσο, η μέγιστη απόδοση δεν υπερβαίνει το 65%. Αναφέρεται επίσης ότι σε pH μικρότερο του 10, η απολιγνινοποίηση ήταν αμελητέα και σε pH υψηλότερο του 12,5 η αλκαλική επεξεργασία με υπεροξείδιο δεν έδειξε καμία αλλαγή στην ενζυμική χώνευση. Οι μεταβλητές στην αλκαλική προεπεξεργασία με υπεροξείδιο στο άχυρο σίτου βελτιστοποιηθεί. Τα αποτελέσματα όπου συμφωνούν με προηγούμενες εκθέσεις διχθούν σαν αποτέλεσμα την ελάχιστη αναλογία υπεροξειδίου / βιομάζας σε αναλογία βάρους 0,25 που είναι απαραίτητη για μια αποτελεσματική απολιγνινοποίηση. (Garcia-Cubero et al., 2009).

## Υγρή Οξειδωση (WO)

Στην υγρή οξείδωση, η λιγνοκυτταρινούχα βιομάζα υποβάλλεται σε επεξεργασία με νερό και οξυγόνο υψηλής πίεσεως ή αέρα σε υψηλές θερμοκρασίες (πάνω από 120 °C). Η πίεση του οξυγόνου είναι μεταξύ 120-480 Psi. Η WO είναι μία αποτελεσματική μεθοδος προκατεργασίας για την κλασματοποίηση του άχυρου σιταριού σε διαλυτοποιημένα κλάσματα ημικυτταρίνης και ένα πλούσιο στερεο κλασμα σε κυτταρίνη με υψηλή ευαισθησία στην ενζυματική υδρόλυση. Ο συνδυασμός της αλκαλικής και WO όχι μόνο βελτιώνει το ρυθμό της οξείδωσης της λιγνίνης (και με τη σειρά της ενζυματικής υδρόλυσης), αλλά αποτρέπει επίσης το σχηματισμό της φουρφουράλης και HMF. Τα οξέα που σχηματίζονται κατά τη διάρκεια της αρχικής αντίδρασης στη WO λόγω της διαλυτοποίησης των ημικυτταρινικών συστατικών καταλύουν τις επόμενες υδρολυτικές αντιδράσεις μέσω των οποίων οι ημικυτταρίνες διασπώνται σε θραύσματα χαμηλότερου μοριακού βάρους που είναι διαλυτα στο νερό. Η αποικοδομηση της λιγνίνης είναι επίσης σημαντική, ιδίως σε υψηλότερες θερμοκρασίες, επειδή, όπως οι ενώσεις φαινόλης και οι δεσμοί άνθρακα-άνθρακα είναι πολύ πιο δραστικές υπό υγρές συνθήκες οξείδωσης. Η λιγνίνη αποσυντίθεται προς CO<sub>2</sub>, H<sub>2</sub>O και καρβοξυλικά οξέα. Σε γενικές γραμμές, έχει βρεθεί ότι η θερμοκρασία είναι πιο σημαντική παράμετρος της διαδικασίας από το χρόνο και τη πίεση του οξυγόνου. Ο σχηματισμός μερικων αναστολέων στη προεργασία του σίτου άχυρου έχουν αναφερθεί και είναι κυρίως τα καρβοξυλικά οξέα (κυρίως το μυρμηκικό οξύ και το οξικό οξύ), οι φαινόλες και το 2-φουροϊκό οξύ. (Klinke et al., 2002).

### **2.3.4 Βιολογική Προεπεξεργασία**

Η βιολογική προεπεξεργασία περιλαμβάνει τη χρήση μικροοργανισμών όπως καφέ, λευκά και ομαλής σήψης μύκητες επιλεκτικούς στη ημικυτταρίνη, μεταξύ των οποίων οι λευκής σήψης μύκητες φαίνονται να είναι η πιο αποτελεσματική μεταξύ των μικροοργανισμών. Η υποβαθμιση της λιγνίνης παρουσιάζεται μέσω της δράσης των ένζυμων της λιγνίνης, όπως σε υπεροξειδομενα δαση. Οι κατάλληλοτεροι μύκητες για τη βιολογική προεπεξεργασία θα πρέπει να έχουν τη μεγαλύτερη συγγένεια στη λιγνίνη και να μπορούν να την υποβαθμίζουν πιο γρήγορα από ό,τι τα συστατικά υδατανθράκων. Οι βιολογικές προ-επεξεργασίες είναι ασφαλείς, φιλικές προς το περιβάλλον και καταναλώνουν λιγότερη ενέργεια σε σύγκριση με άλλες μεθόδους προεπεξεργασίας. Ωστόσο, η ταχύτητα της αντίδρασης της υδρόλυσης είναι πολύ χαμηλές και χρειάζονται αρκετές βελτιώσεις ώστε να είναι εμπορικά εκμεταλλευσιμες. Διερευνήθηκε η προεπεξεργασία του άχυρου σίτου με 19 είδη μυκητα λευκής σήψης και διαπίστωσε ότι το 35% του

άχυρου σίτου μετατράπηκε αναγωγικά σε σάκχαρα μετά από πέντε εβδομάδες με προεπεξεργασία *Pleurotus ostreatus* σε σύγκριση με το μικρο ποσοστο του 12% του μετατροπής του μη επεξεργασμένου άχυρο. Πέντε διαφορετικοι μυκήτες που ληφθηκαν από τον έλεγχο αξιολογήθηκαν για την προεπεξεργασία από άχυρο σίτου σε μια μελέτη. Η προεπεξεργασία με *Aspergillus niger* και *Aspergillus awamori* εδωσε τα καλύτερα αποτελέσματα όσον αφορά την απόδοση του συνολικών σακχάρων και αιθανόλης μετά τη ζύμωση. (Okano et al., 2005).

### 2.3.5 Σύνοψη των μεθόδων προεπεξεργασίας

Η προεπεξεργασία έχει σημαντικό ρόλο στην παραγωγή αιθανόλης από λιγνοκυτταρινούχα υλικά όπως το άχυρο σίτου. Οι στόχοι είναι να αυξησουν την επιφάνεια και το πορώδες του υποστρώματος, να μειώσουν τη κρυσταλλικότητα της κυτταρίνης και να διαταράξουν την ετερογενή δομή της των κυτταρινικών υλικών. Μέχρι στιγμής, δεν υπάρχει μια κοινή μέθοδος προεπεξεργασίας που να διαπιστώνεται ότι πληρεί όλες αυτές τις απαιτήσεις ή ένας συνδυασμός διαφορετικών μεθόδων που θα μπορούσαν να εφαρμοσθούν. Ο πίνακας 1 περιγράφει ορισμένες υποσχόμενες μεθόδους και τις αντίστοιχες συνθήκες, που χρησιμοποιήθηκαν πρόσφατα για την προεπεξεργασία της άχυρο σίτου. Διαφορετικά είναι τα πλεονεκτήματα και τα μειονεκτήματα που συνδέονται με κάθε μέθοδο προεπεξεργασίας. Οι μικροί χρόνοι αντίδρασης συνοδεύονται συνήθως από υψηλές θερμοκρασίες (Πίνακας 1). Η επιλογή της κατάλληλης μεθόδου προεπεξεργασίας για το άχυρο σίτου βασίζεται σε ορισμένους τεχνολογικούς παράγοντες, όπως το ενεργειακό ισοζύγιο, το υψηλό στερεό φόρτωσης, η ελάχιστη χρήση χημικών ουσιών καθώς και ορισμένοι περιβαλλοντικοί παράγοντες όπως η επεξεργασία των λυμάτων, η ανάκτηση του καταλύτη και οι ανακύκλωσεις των διαλυτών. Η εκρήξη ατμού είναι ίσως η πιο αποτελεσματική μέθοδος για την προεπεξεργασία της άχυρο σίτου από την άποψη της μείωσης του χρόνου αντίδρασης, και την υψηλή φορτίση του στερεού με ελάχιστη χρήση χημικών ουσιών (Πίνακας 1). (Farid Talebnia, Dimitar Karakashev, Irini Angelidaki (2009)

Πίνακας 5: Ελπιδοφόρες μέθοδοι και οι αντίστοιχες προϋποθέσεις για την προεπεξεργασία των άχυρο σίτου (pws)

| Pretreatment technology  | Procedure/chemicals   | Temp. (°C)      | Reaction times | Solid loading (wt.%) | References  |
|--------------------------|---|-----------------|----------------|----------------------|---|
| Dilute acid              | 0.5–5.0% H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>                                       | 120–180         | 5–60 min       | 5–30                 | Kootstra et al. (2009) and Saha et al. (2005)                 |
| Steam explosion          | Saturated steam   | 160–230         | 5–30 min       | <30                  | Ballesteros et al. (2006) and Palmarola-Adrados et al. (2004) |
| Alkaline peroxide        | >0.25 g H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> /g biomass, pH 11.5                     | 25–35           | 3–24 h         | <10                  | Gould (1984) and Saha and Cotta (2006)                        |
| Wet oxidation (alkaline) | 6–12 bar oxygen pressure (+0.11 g Na <sub>2</sub> CO <sub>3</sub> /g biomass) | 185–195         | 10–15 min      | 6                    | Klinke et al. (2002) and Schmidt and Thomsen (1998)           |
| Lime                     | 0.05–0.15 g Ca(OH) <sub>2</sub> /g biomass                                    | 85–135<br>50–65 | 1–3 h<br>24 h  | 5–20                 | Chang et al. (1998) and Saha and Cotta (2007)                 |

## 2.4 Προκατεργασία όπως πραγματοποιήθηκε σε πιλοτική μονάδα προεπεξεργασίας

### 2.4.1 Περιγραφή της τριών βημάτων προ-επεξεργασίας

Σε τρία βήματα βασιστικε η πιλοτική μονάδα με ιδιόκτητο σχεδιασμό και ήταν ένα πλήρες σύστημα για προεπεξεργασία μέχρι και 1000 kg/h άχυρου. Το άχυρο τροφοδοτείται στην διαδικασία απο το ξεπακεταρισμα του με ρυθμό 120-150 kg άχυρου ανα ώρα. Μετά το άχυρο πέρασε από μια παγίδα για να καθαριστεί από την άμμο, τις πέτρες και τα μεταλλικά μέρη. Μετά κόπηκε σε κομμάτια 5 εκατοστων μεσα σε ένα εμπορικό τεμαχιστή άχυρου. Τα κομμάτια αχύρου πέρασαν από μια διαδικασία “προ-μουλιάσματος” σε μήκος 10 μετρων σε κοχλία μεταφορας του συστήματος (αντιδραστήρα 1). Η θερμοκρασία σε αυτό σταδίου ήταν 80°C και ο χρόνος παραμονής ήταν 20 λεπτά. Το άχυρο τροφοδοτείται στον πρώτο αντιδραστήρα θερμού μεσου (αντιδραστήρας 2) από μια αντλία σωματιδίων που έχει σχεδιαστεί για την κίνηση της βιομάζας σε συστήματα υψηλής πίεσης. Ο αντιδραστήρας 2 ήταν ένας μεταφορέας, κοχλίας, που λειτούργουσε σε θερμοκρασίες 170°C και 180°C και σε χρόνους παραμονής 7,5 λεπτά και 15 λεπτά σε αυτή τη μελέτη. Ο μεταφορέας κινεί το άχυρο δια μεσω του αντιδραστήρα και του νερού στον ακόλουθο τελικο αντιδραστήρα (αντιδραστήρας 3) οπου το αχυρο περνουσε απο στιγμιαιο μετρητή και μετα γινοταν διήθηση του αχύρου. Από τον αντιδραστήρα 2 το αχυρο μεταφέρθηκε μέσα στον αντιδραστήρα 3. Ο αντιδραστήρας 3 θερμάνθηκε με προσθήκη ατμού στο ανώτερο μέρος του αντιδραστήρα μεχρι τη θερμοκρασία των 195 °C και με χρόνο παραμονής του αχυρου τα 3 λεπτά. Η βιομάζα απομακρύνθηκε από τον αντιδραστήρα 3, από μια άλλη αντλία σωματιδίων, χρησιμοποιήθηκε για την παραγωγή της αιθανόλης με ζύμωση SSF. Εκτός απο τη προσθήκη ατμού τέσσερεις ηταν οι δυνατες παροχες προσθήκης ύδατος στον αντιδραστήρα 3 οι 0, 200, 420 και 600 kg νερού / h. Η συμπυκνώση του ατμού οδήγησε στη ροή του νερού μέσα στον αντιδραστήρα, ακομα και οταν στο βήμα δε προστιθοταν νερο, με τη ροη να κυμαινεται απο 300 μεχρι 1200 kg νερού / h και να αυξάνοταν συναρτήσει της προσθήκης νερου. Τα δείγματα του υγρού από τη διαδικασία εκχύλισης ελήφθησαν στον πυθμένα του αντιδραστήρα 2 και του αντιδραστήρα 3. Δείγματα απο φυτικές ίνες κλάσματος ελήφθησαν στο τέλος της αντιδραστήρα 3 ενω τα πρωτα δείγματα απο το αχυρο ελήφθησαν αμέσως μετά το ξεπακεταρισμα. (Mette Hedegaard Thomsen,2008)

## 2.4.2 Διαταξη και υπολογισμοι

### Υπολογισμοί, συμπεριλαμβανομένης της ενθαλπίας καύσης

Ο υπολογισμός της ανάκτημενης κυτταρίνης, της ημικυτταρίνης και η απόδοση της υδρόλυσης πραγματοποιήθηκαν όπως περιγράφονται από το Thomsen et al. (2006). Η θεωρητική βάση της παραγωγής αιθανόλης σε σχέση με την απόδοση της προεπεξεργασίας εκχυλισμένης ζάχαρης και ολιγομερών της ενζυματικής υδρόλυσης υπολογίστηκαν σύμφωνα με Εξ. (1).

$$\begin{aligned} \text{Theoretical ethanol production} \\ = \text{TSC}^* \times 0.51 + \text{TSH}^* \times 0.5 \end{aligned} \quad (1)$$

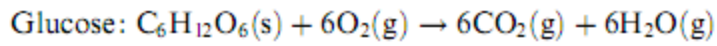
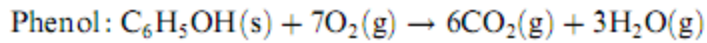
TSC \* = Σύνολο ζάχαρη από κυτταρίνη

TSH \* = Σύνολο ζάχαρη από ημικυτταρίνη

Ο παραγοντας βαρυτητας της προεπεξεργασία είναι ο R'0 (εξ.2) . Αυτός ο παράγοντας περιλαμβάνει την επίδραση της θερμοκρασίας, του χρόνου και του pH που λαμβάνονται κατά τη διεργασία του λιγνοκυτταρινικού υλικού. Ο συντελεστής υπολογίζεται ως το άθροισμα της δριμυτητας στον αντιδραστήρα 2 και τον αντιδραστήρα 3 με βάση pH, ο χρόνος παραμονής (t) και της θερμοκρασίας (T).

$$\begin{aligned} R'_0 = 10^{-\text{pH}_{R2}} \cdot t_{R2} \cdot \exp\left(\frac{T_{R2} - 100}{14.75}\right) + 10^{-\text{pH}_{R3}} \cdot t_{R3} \\ \cdot \exp\left(\frac{T_{R3} - 100}{14.75}\right) \end{aligned} \quad (2)$$

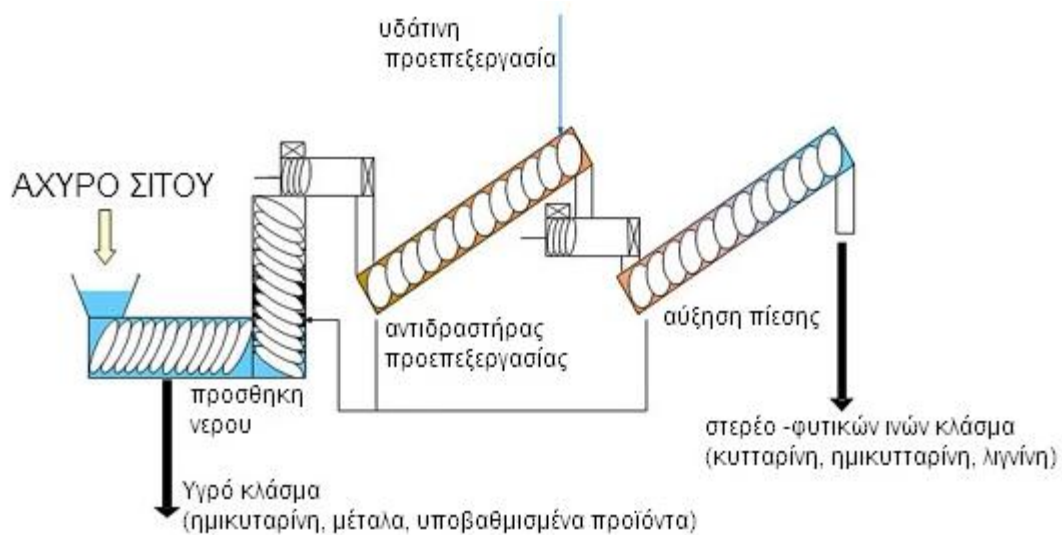
Η απόδοση της ενέργειας από το στερεό κλάσμα που υπολογίστηκε είναι ίση με την ενθαλπία καύσης (Atkins, 1994). Η τιμή για της γλυκόζης που χρησιμοποιήθηκε για τη κυτταρίνη και την ημικυτταρίνη (14,1 MJ / kg) η τιμή της φαινόλης για τη λιγνίνη (31,1 MJ / kg) και 0 MJ / kg χρησιμοποιήθηκε για τη στάχτη. Η τιμή της φαινόλη εφαρμόστηκε για τη λιγνίνη δεδομένου ότι είναι ένα πολύπλοκο δίκτυο φαινυλπροπάνων. Το υπολειμματικό κλάσμα περιέχει κυρίως οξικό, πηκτίνη και πρωτεΐνες με ενεργειακό περιεχόμενο κατώτερο ή παρόμοιο με αυτό της γλυκόζης. Λόγω της αβεβαιότητας σχετικά με τη σύνθεση του υπολειμματικού κλάσματος, η ενθαλπία καύσης εκτιμήθηκαν προσεγγιστικά  $10 \pm 4$  MJ /kg. Οι εξισώσεις της αντιδράσης και οι τιμές που χρησιμοποιούνται για τον υπολογισμό δείχνονται παρακάτω (Mette Hedegaard Thomsen, 2008)



$$E_{\text{Phenol}} = (6 \cdot (-394 \text{ kJ/mol}) + 3 \cdot (-242 \text{ kJ/mol}) - (-165 \text{ kJ/mol}))/94 \text{ g/mol} = 31.1 \text{ MJ/kg} \quad (3)$$

$$E_{\text{Glucose}} = (6 \cdot (-394 \text{ kJ/mol}) + 6 \cdot (-242 \text{ kJ/mol}) - (-1274 \text{ kJ/mol}))/180 \text{ g/mol} = 14.1 \text{ MJ/kg}$$

$$E_{\text{Lignocellulose}} = (x_{\text{cellulose}} + x_{\text{hemicellulose}}) \cdot 14.1 \text{ MJ/kg} + x_{\text{lignin}} \cdot 31.1 \text{ MJ/kg} + x_{\text{residual}} \cdot (10 \pm 4) \text{ MJ/kg}$$



Εικόνα 9: Διαταξη του πειραματος (Mai Østergaard Petersena,2009)

## 2.5 Ανάκτηση σακχάρων

### 2.5.1 Ανάκτηση κυτταρίνης

Σε όλα τα πειράματα, εκτός από τη προκατεργασία, πραγματοποιούντουσαν στους 205°C για 6 λεπτά συνολική διάρκεια της ανάκτησης της κυτταρίνης μετά την προεπεξεργασία με αποδοσης ανω του 90%. Η ανάκτηση της κυτταρίνης γενικά μειώνονταν με αύξηση της σοβαρότητα. Ωστόσο, όταν το άχυρο σιτου προεπεξεργαζοταν στους 205°C για 6min, η περισσότερη κυτταρίνη αποικοδομουνταν. Το υψηλότερο ποσοστο ανάκτησης της κυτταρίνης επιτευχθηκε πειράματα με προκατεργασία στους 195°C και 9 ή 12 λεπτά. Τα πειράματα δείχνουν ότι η ποσότητα της κυτταρίνης στο υγρό κλάσμα (ως ελεύθερη γλυκόζη, κελλοβιόζη ή ολιγομερη κυτταρίνης) αυξάνονταν αναλογα με το χρόνος παραμονής του άχυρου στον αντιδραστήρα. Το μεγαλύτερο μέρος της γλυκόζης /κυτταρίνης που βρέθηκε στο υγρό κλάσμα σε ολιγομερή ηταν μεταξύ 91 και 96% ανάλογα με σοβαρότητα της προκατεργασιας.

### 2.5.2 Ανάκτηση ημικυτταρίνης

Όπως ήταν αναμενόμενο, η ανάκτηση της ημικυτταρίνης εξαρτάται σε μεγάλο βαθμό από τη σοβαρότητα του πειράματος, όπου η ανάκτηση της ημικυτταρίνης κυμαίνεται από 60 έως 90% ανάλογα με τη σοβαρότητα. Το υψηλότερο ποσοστο ανάκτησης ημικυτταρίνης επιτευχθηκε με άχυρο σίτου σε προεπεξεργασία στους 185°C για 6min. Στα περισσότερα πειράματα, το 30% της ημικυτταρίνης βρέθηκε στο υγρό κλάσμα ενώ το ποσοστο της στο κλάσμα των φυτικων ίνων μειώνονταν αντιστοιχα από 70% εως 30%. Η ανάλυση επίσης δείχνει 83-94% της ξυλανης / ξυλόζης στο υγρό βρίσκεται ως ολιγομερή, και το 44 έως 66% της αραβινόζης / αραβινάνης είναι ολιγομερή.(Mai Østergaard Petersena,2009)

### 2.5.3 Ανάκτηση Λιγνίνης

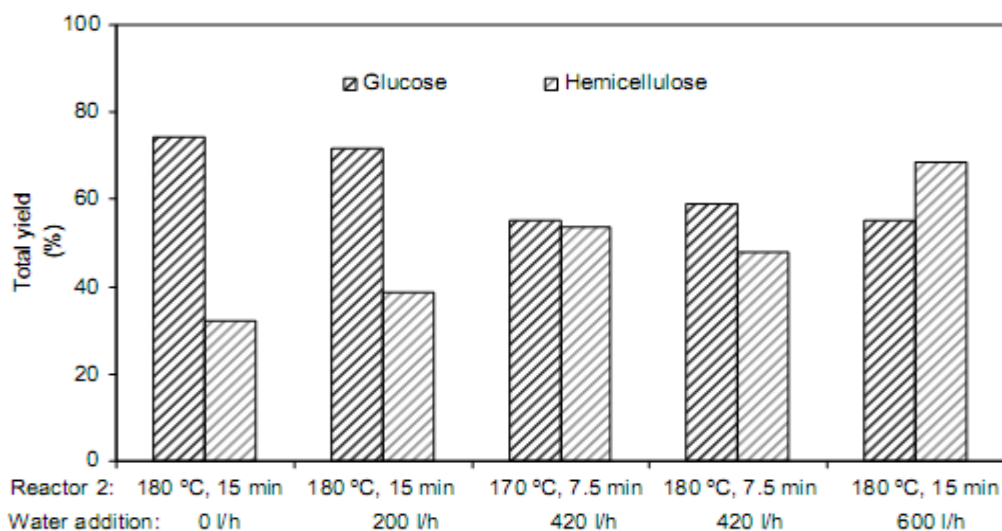
Η λιγνίνη είναι το συστατικό στο άχυρο σίτου με την υψηλότερη θερμογόνο δύναμη και αξία. Στη μέθοδο IBUs στη ζυμωση της λιγνίνης τα υπολείμματα της αποστάξεως χρησιμοποιουνται για την παραγωγή της ενέργειας από την καύση σε εγκαταστάσεις παραγωγής ενέργειας. Συνεπώς, είναι σημαντικό να ανακτηθεί όσο το δυνατόν μεγαλύτερο ποσοστο της λιγνίνης. Η αποδοση της

ανακτησης της λιγνίνης στις φυτικές ίνες στη προεπεξεργασία επηρεάζεται από πολλές παραμέτρους, όπως είναι η υποβάθμιση και η διαλυτοποίηση των σακχάρων και επίσης η αναλογία της πρώτης υλής σε ανόργανα άλατα, πρωτεΐνες κ.α.. Ωστόσο, κάτω από ορισμένες συνθήκες η λιγνίνη από το άχυρο αποικοδομείται ή διαλύεται στο υγρό κλάσμα κατά τη διάρκεια της προκατεργασίας, π.χ. ως ελεύθερες φαινόλες.

Τα πειράματα δείχνουν ότι τουλάχιστον το 90% της λιγνίνης ανακτάται στα κλάσμα φυτικής ίνας μετά την προεπεξεργασία. Ωστόσο, σε μερικά πειράματα το ποσοστό της λιγνίνης των κλασμάτων φυτικών ίνων βρέθηκε μεγαλύτερο από 100%. Αυτό μπορεί να δικαιολογηθεί από σφάλματα στην αναλυτική μέθοδο που χρησιμοποιείται όπου, δεν μετρούν λιγνίνη συγκεκριμένα, αλλά όλα τα μη-διαλυμένα οργανικά υλικά κατά την διάρκεια της ισχυρής όξινης υδρόλυσης, όπως λιγνίνη. (Mai Østergaard Petersena, 2009)

## 2.5.4 Θεωρητική απόδοση αιθανόλης

Στο πίνακα 5 φαίνεται το άθροισμα των σακχάρων που εκχυλίστηκαν από την προεπεξεργασία και τα μονομερή σάκχαρα που παράγονται από ενζυματική υδρόλυση στο υπόλοιπο του στερεού κλάσματος που μένει στον αντιδραστήρα 3. Η συνολική απόδοση της γλυκόζης ήταν μικρότερη στο πείραμα με μεγάλη ποσότητα προσθήκης νερού (55 g/100 g γλυκόζης στο σε άχυρο). Η απόδοση της γλυκόζης ήταν υψηλότερη (75 g/100 g γλυκόζης σε άχυρο) χωρίς προσθήκη νερού, πράγμα το οποίο εξηγείται από την υψηλή βαρυντικότητα της προκατεργασίας (Πίνακας 5). Η απόδοση της ημικυτταρίνης ήταν μικρότερη (32 g/100 g ξυλόζης σε σε άχυρο) χωρίς προσθήκη νερού και μεγάλωνε αναλογα (69 g/100 g ξυλόζης σε σε άχυρο) με τις μεγαλύτερες ποσοτητες προσθηκης νερου.



Πίνακας 6: Άθροισμα των σακχάρων που εκχυλίστηκαν



Η θεωρητική παραγωγή αιθανόλης και η απόδοση υπολογίστηκε βάσει της μετατροπής ολόκληρης της ποσοτήτας των ζακχαρων συμπεριλαμβανομένων και της γλυκόζης από κυτταρίνη και της ξυλόζης και της αραβινόζης από ημικυτταρίνη. Η απόδοση ήταν υψηλότερη όταν υπήρχε μικρή προσθήκη ύδατος (0-200 kg / h και 184-186 κιλά αιθανόλη / τοννο άχυρου) λόγω της υψηλής ενζυματικής μετατροπής της κυτταρίνης σε αυτό το πείραμα. Χρησιμοποιώντας μεγαλύτερες ποσοτητες νερού (600 kg / h), η απόδοση αιθανόλης ήταν επίσης υψηλή (192 kg αιθανόλης / τοννους άχυρου), γιατί σε αυτή την περίπτωση υπήρχε δυνατότητα ανακτησης μεγάλης ποσοτητας της ημικυτταρίνης κατά την εκχύλιση. Αυτές οι τιμές πρέπει να συγκριθούν ως προς την απόδοση αιθανόλης που θα λαμβάνοταν αν ολη η ποσοτητας της κυτταρίνης και ημικυτταρίνης στο άχυρο υδρόλυοταν σε μονομερική σάκχαρα (318 kg αιθανόλης / τόνο άχυρου).

Κανονικά η απόδοση της υδρόλυσης της κυτταρίνης σε προεπεξεργασμένο άχυρο που χρησιμοποιείτε σε αυτή τη πιλοτική μονάδα πρέπει να φτάσει κοντά στο 95-100% με ταυτόχρονη σακχαροποίηση και ζύμωση με ζυμομυκητες που ανάσχηματίζονται επειδή οι αναστολεις των προϊόντων αποφεύγονται. Επομένως, η απόδοση υπολογίστηκε με βάση το 95% της μετατροπή της κυτταρίνης. Η απόδοση της αιθανόλης υπολογίστηκε σε 223 kg / τόνο άχυρου χωρίς προσθήκη ύδατος ενώ αυξάνεται έως 270 kg / τόνο με 600 kg νερού / h πραγμα που οφείλεται στην αύξηση της δυναοτητας ανάκτησης της ημικυτταρίνης.(Mette Hedegaard Thomsen,2008)

## 2.5.5 Σύγκριση των μεθόδων

Οι συνθήκες αντίδρασης για υψηλότερη απόδοση στη γλυκόζη μετά από την ενζυματική υδρόλυση επιτευχθηκαν με την αποφυγη προσθήκης ύδατος στον αντιδραστήρα 3 στους 195 °C και 3 min χρόνος παραμονής σε αυτο το βήμα. Αν επιθυμουμε υψηλη αποδοση της ημικυτταρίνης επιλεγουμε προσθήκη μεγάλης ποσοτητας νερού (600 kg / h) και στον αντιδραστήρα 2, η θερμοκρασία και ο χρόνος θα πρέπει να είναι 180°C και 15 λεπτά, αντίστοιχα. Η προσθήκη του νερού είχε θετική επίδραση στη παραγωγή ημικυτταρίνης λόγω μειωμένης αποικοδόμησης της ξυλόζης και της αραβινόζης. Η μεγαλύτερη ποσοτητα ημικυτταρίνης ήταν 83 g/100 g ημικυτταρίνης σε άχυρο που λαμβάνεται με 600 kg νερό / h. Τα χαμηλότερα εκχυλισματα ήταν 33 g/100 g ημικυτταρίνης σε άχυρο και ληφθηκε σε πειράματα χωρίς τη προσθήκη νερού (ατμοθεραπεία). Η υψηλότερη ενζυμική μετατρεψιμότητα της κυτταρίνη στο στερεό κλάσμα επιτευχθηκε με τη προ-επεξεργασία μη χρησιμοποιώντας νερο στη διαδικασία (72 g/100 g γλυκόζης στο άχυρο) λόγω της υψηλής βαρύτητας διαδικασία. Αυτό το στερεό κλάσμα ήταν επίσης πολύ πλούσιο σε λιγνίνη (32%), προφανώς λόγω παραγωγής προϊόντων αποικοδόμησης από την

ημικυτταρίνη. Αυτό διαθέτει μια υψηλή τιμή ενθαλπία καύσης (19 MJ / kg) σε σύγκριση με το άχυρο σίτου (15 MJ / kg). Η υψηλή περιεκτικότητα σε λιγνίνη δεν φαίνεται να αναστέλλει τα ένζυμα της κελλουλάσης λόγω της υψηλής μετατρεψιμότητας της κυτταρίνης σε λιγνίνη. Ωστόσο δεν ήταν δυνατό να επιτευχθεί μεγάλο ποσοστό ανάκτησης της ημικυτταρίνης και υψηλή μετατρεψιμότητα της κυτταρίνης ταυτόχρονα. (Mette Hedegaard Thomsen,2008)

# **ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ**

## 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<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> (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 - Πρώτες Ύλες

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

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). Τα υλικά διατηρήθηκαν στους -18 °C. Πριν τη χρήση του υλικού έγινε ξήρανση στους 65 °C μέχρι σταθερού βάρους και τεμαχίστηκε σε κομμάτια μικρότερα των 3mm.

## Χημικά και διαλύματα

Όλα τα χημικά είναι προϊόντα της 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  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ , 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 σπάδικα 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 σε 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 20L 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<sub>2</sub> (Ingold, Steinbach, Germany).

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

Μετά το πέρας της ανάπτυξης η καλλιέργεια συλλέχθηκε και φυγοκεντρήθηκε στις 14,000 στροφές ανά λεπτό (4 °C) για 20min. Τελικά το υπερκείμενο υγρό συμπυκνώθηκε 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<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 0.30 g/L CaCl<sub>2</sub>•2H<sub>2</sub>O , 0.30 g/L MgSO<sub>4</sub>•7H<sub>2</sub>O, 10.0 g/L (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 6.94 g/L NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>•2H<sub>2</sub>O και 9.52 g/L Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>•2H<sub>2</sub>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.

## **Ενζυμικά συστήματα**

### **Ενζυμα *Fusarium oxysporum***

Το στάδιο της παραγωγής του ενζύμου διεξάγεται σε βιοαντιδραστήρα κάτω από συγκεκριμένες συνθήκες. Η πηγή άνθρακα που χρησιμοποιείται είναι μίγμα της BG και CC σε αναλογία 2/1. Στο

τελικό στάδιο παραγωγής του ενζύμου το υπερκείμενο της καλλιέργειας φυγοκεντρείται (14000 rpm, 4C, 20 min) και το υπερκείμενο συμπυκνώνεται με τη χρήση υπερ μεμβρανών διήθησης.

Η δραστηριότητα της ενδογλυκανάσης αυξήθηκε σημαντικά μετά από 45h καλλιέργειας σε βιοαντιδραστήρα και έφτασε τα μέγιστα επίπεδα σε 108h (5,7 U / mL). Οι άλλες δραστηριότητες κυτταρινολυτικών επιτυγχάνονται μέγιστες τιμές μετά από 70h καλλιέργειας (0,85, 0.77and 0,35 U / mL για FPA, β-Γλυκοσιδάση και κελλοβιοϋδρολάσης αντίστοιχα). Το υπερκείμενο της καλλιέργειας χρησιμοποιείται ως πηγή ενζύμων σε υδρολυτικές αντιδράσεις. Το κυτταρινολυτικό προφίλ δραστηριότητες του συμπυκνωμένου εκχυλίσματος ήταν για 1FPU:12,5U ενδογλυκανάσης, 1,5 U κελλοβιοϋδρολάσης, 2,5 U β-Γλυκοσιδάση. Αυτό το ενζυματικό προφίλ είναι παρόμοιο με το προφίλ του κυτταρινολυτικού και ευρέως χρησιμοποιούμενου μίγματος των εμπορικών παρασκευασμάτων Celluclast 1,5 L και Novozyme 188 (Novozymes) σε αναλογία 5:1, με την εξαίρεση της δραστηριότητας β-Γλυκοσιδάση που στην παρούσα περίπτωση είναι περίπου δύο ή τρεις φορές υψηλότερη.

Οι αποδόσεις ενζύμου ήταν 550, 22.5, 6.5, 3.225, 0.3, 1.25 και 3 U ανά g της πηγής άνθρακα της ενδογλυκανάσης, κελλοβιοϋδρολάσης, β-γλυκοσιδάση, ξυλανάση, feruloyl εστεράση, β-D-ξυλοσιδάση και α-L-αραβινοφουρανοσιδάσης αντίστοιχως, και ελήφθησαν κατά τη διάρκεια του σταδίου της ανάπτυξης υπό ιδανικές συνθήκες.

### **Celluclast - Novozyme**

Τα εμπορικά ενζυμα προέρχονται από την εταιρία Novozymes (USA).

### **Thermomix**

Το ενζυμικό αυτό σύστημα σχεδιάστηκε και αναπτύχθηκε από το Τεχνολογικό Πανεπιστήμιο του Ελσίνκι (VTT). Το συστημά αυτό περιέχει ενεργότητες ενζύμων At CBHI/Cel7A, Ct CBHII/Cel6A, Ta EGII/Cel5A και Ta XYL/Xyn10A σε αναλογίες 3.6:1.2:1.2:1 με επιπρόσθετη β-γλυκοζιδάση At Bg/Cel3A σε συγκέντρωση 1 mg/g στερεών (ΞΜ). Η τελική ενεργότητα του ενζύμου είναι 135 FPU/ml.

## Μετρήσεις ενζυμικών ενεργοτήτων

### Κυτταρινάσες (Filter paper activity)

Για τον προσδιορισμό της δραστηριότητας των κυτταρινασών χρησιμοποιήθηκε ως υπόστρωμα διηθητικό χαρτί Watman No 1 (50 mg)(6cm\*1cm). Το αντιδρών μίγμα 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 κυτταρινασών 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 δραστηριότητας των ενδογλυκανασών 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 ως 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.



## Ιξωδόμετρία

Για τη μέτρηση του ιξώδους χρησιμοποιήθηκε περιστροφικό ιξωδόμετρο RHEOTEST RC1 (Medingen GmbH, Radeburg, Germany) (Σχήμα 4.8), το οποίο είναι συνδεδεμένο με ηλεκτρονικό υπολογιστή. Το ιξωδόμετρο περιλαμβάνει μια ηλεκτρονική μονάδα με πρότυπα DIN συστήματα ομόκεντρων κυλίνδρων για τη μέτρηση διαφορετικού εύρους ιξώδους, ένα θερμοστοιχείο Pt100 για τη μέτρηση της θερμοκρασίας, ένα θερμοστατούμενο μανδύα FTK-CC (-10°C έως 90°C) και λογισμικό RHEO 2000.

Το σύστημα μέτρησης που χρησιμοποιήθηκε (double gap cylinder DG DIN) αποτελείται από δύο ομόκεντρους κυλίνδρους, έναν ακίνητο (εξωτερικό) και έναν περιστρεφόμενο (εσωτερικό)



*Εικόνα 11:* Ιξωδόμετρο RHEOTEST RC1

## Ιξώδες και ρυθμός διάτμησης

Ιξώδες ορίζεται η αντίσταση των ρευστών στη ροή. Ο μαθηματικός τύπος που συνδέει το ιξώδες με το ρυθμό διάτμησης είναι ότι η διατμητική τάση ( $d$ ) είναι ίση με το γινόμενο του ιξώδους ( $\mu$ ) επί το ρυθμό διάτμησης ( $1/D$ ) υψωμένο στη  $n$  μείον ένα. [ $d = \mu \cdot (1/D)^{n-1}$ ]. Η διατμητική τάση είναι ο λόγος της δύναμης που εφαρμόζεται στο ρευστό προς την επιφάνεια εφαρμογής.

## 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 Α, Β, και Γ), ως μέρος του ελέγχου της μονάδας

προεπεξεργασίας. Οι συνθήκες προεπεξεργασίας ήταν: ρυθμός τροφοδοσίας 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 εμποτίστηκε στο νερό στους 808 °C για 6min και στη συνέχεια μεταφέρθηκε στον αντιδραστήρα. Για άχυρο A ο χρόνος παραμονής στον αντιδραστήρα ήταν κατά μέσο όρο 6min και η θερμοκρασία του αντιδραστήρα διατηρήθηκε σε 1958 °C με έγχυση ατμού. Για άχυρο B η θερμοκρασία ήταν 1958 °C και ο χρόνος παραμονής στα 12min. Για το άχυρο C η θερμοκρασία ήταν 2058 °C και ο χρόνος παραμονής 6min. 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, το βάρος του ήταν 30-50Kg και φυλάχθηκε στους 4 °C για 1-5 μήνες πριν χρησιμοποιηθεί. Το προεπεξεργασμένο άχυρο χρησιμοποιήθηκε για την ενζυματική υγροποίηση, τη σακχαροποίηση, και τη ζύμωση [Henning Jørgensen, et al., 2006] .

### ***Υγροποίησης, Σακχαροποίηση, και Ζύμωση και παρουσίαση του Mixer***

Η υγροποίηση και η σακχαροποίηση έγιναν με τη χρήση μίγματος ενζύμου, που αποτελείται από Celluclast 1,5 FG L και Novozym 188 (και τα δυο από Novozymes A / S, Bagsværd, 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).

### ***Υγροποίηση και Σακχαροποίηση σε αντιδραστήρα υγροποίησης***

Ένας αντιδραστήρας υγροποίησης σχεδιάστηκε για την υγροποίηση και την σακχαροποίηση σε στερεές συγκεντρώσεις άνω του 20% (w/w) DM. Ο αντιδραστήρας αποτελείται από δυο τοποθετημένα οριζόντια σφαιρικά τμήματα (δωμάτια). Το μοτέρ συνδέεται με ένα διαφορικό που μεταφέρει την κίνηση στα δυο δωμάτια με την ίδια φορά και ταχύτητα περιστροφής. Οι άξονες μέσα στο δωμάτια συνδέονται με τρία “φτερά”, αποσπώμενα από τον άξονα, που είναι αναγκαία για την υδρόλυση και την ανάδευση του μίγματος. Το μοτέρ 1,1 kW, που χρησιμοποιήθηκε για να δώσει κίνηση και περιστροφή στο σύστημα μετρήθηκε στις 2,5 με 16,5 rpm. Τα δωμάτια χρησιμοποιούσαν ως θερμαντικό μέσο το λάδι στο εξωτερικό μέρος του κάθε σφαιρικού τμήματος και με σύστημα ελέγχου θερμοκρασίας (διπλό θερμοστάτη) έλεγχαν τη θερμοκρασία τους ξεχωριστά για το καθένα. Τέλος υπήρχε η δυνατότητα να λειτουργεί μόνο το ένα από τα δυο δωμάτια βγάζοντας τα τρία πτερύγια και μη ενεργοποιώντας τη θέρμανση του ενός δωματίου. Σύστημα ψύξης δεν είχε εγκατασταθεί. Με αυτό το τρόπο το κόστος εγκατάστασης, των

πρώτων υλών και οι καταναλώσει ενέργειας μειώθηκε σημαντικά σε σχέση με το προηγούμενο mixer. Τα πειράματα έγιναν χρησιμοποιώντας 0,3 kg από άχυρο (20%DM) με προσθήκη ενζύμων 5 FPU / g DM και ρυθμισμένο pH στο 5,5. Μετά από 15-30min ισορροπίας, η θερμοκρασία έφτασε το  $50 \pm 1$  °C. Ο συνολικός χρόνος παραμονής είναι 6 h. Η θερμοκρασία κατά τη διάρκεια της υγροποίησης και σακχαροποίησης μετράται στους  $50 \pm 1$  °C (Jorgensen et al. 2006).



Εικόνα 12:Μεγαλου απλου mixer και μικρου διπλου mixer

## **ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ**

## **Προϋδρόλυσες και Σακχαροποιήσεις**

## 1. Προϋδρόλυση

### 1.1 Προϋδρόλυση με συνδιασμό εμπορικών ενζύμων και ενζυμικού συστήματος *F.oxysporum*

Η συγκεκριμένη διεργασία της προϋδρόλυσης πραγματοποιήθηκε στους 30<sup>0</sup>C και 50<sup>0</sup>C για 6 h με ένζυμα από 3 έως 7 FPU/gr DM. Αρχικά έγινε ξήρανση του άχυρου σίτου (με σκοπό την απομάκρυνση της περιεχόμενης υγρασίας) σε φούρνο στους 60<sup>0</sup>C. Ακολούθησε άλεση του άχυρου, ώστε το δείγμα να είναι ομοιογενές και χωρίς μεγάλα συμπαγή κομμάτια, ανάμιξη είτε με τα εμπορικά ένζυμα Celluclast και Novozym 188 είτε με μίγμα εμπορικών ενζύμων με ένζυμα του *F.oxysporum* με σκοπό την εύρεση της βέλτιστης θερμοκρασίας δράσης του μίγματος και την βέλτιστη αναλογία στην προσθήκη ενζύμων, εμπορίου ή εργαστηρίου. Θεωρήθηκε γνωστό ότι, τα εμπορικά ένζυμα έχουν ως βέλτιστη θερμοκρασία λειτουργίας κοντά στους 50 <sup>0</sup>C. Παρακάτω φαίνονται τα αποτελέσματα από τα πειράματα ανάλογα με τη θερμοκρασία και την προσθήκη ενζύμων σε συγκέντρωση 23% DM.:



Εικόνα 13: Προϋδρόλυση με 23%DM στους 50<sup>0</sup>C με 7 FPU ενζύμων

Πίνακας 7: Προϋδρολύσεις 23%DM με διαφορετικές προσθήκες ενζύμων και θερμοκρασιών

| Ενζυμικό σύστημα                                      | Θερμοκρασία<br>( <sup>0</sup> C) | Συγκέντρωση<br>(% DM) | FPU              | Σακχάρα<br>(g/L) |
|---|----------------------------------|-----------------------|------------------|------------------|
| <b>Celluclast 1,5<br/>L -Novozyme 188</b>             | <b>50</b>                        | <b>23</b>             | <b>3</b>         | <b>28</b>        |
|   |                                  |                       | <b>5</b>         | <b>51</b>        |
|   |                                  |                       | <b>7</b>         | <b>68</b>        |
| <b>Celluclast-<br/>Novozyme + <i>F. oxysporum</i></b> | <b>30</b>                        | <b>23</b>             | <b>2 + 5</b>     | <b>35</b>        |
|   |                                  |                       | <b>3.5 + 3.5</b> | <b>31</b>        |
|   |                                  |                       | <b>5+2</b>       | <b>28</b>        |
| <b>Celluclast-<br/>Novozyme + <i>F. oxysporum</i></b> | <b>50</b>                        | <b>23</b>             | <b>2 + 5</b>     | <b>32</b>        |
|   |                                  |                       | <b>3.5 + 3.5</b> | <b>37</b>        |
|   |                                  |                       | <b>5+2</b>       | <b>70</b>        |

Στον πίνακα αρχικά παρουσιάζεται η προϋδρολύση στους 50<sup>0</sup>C χωρίς την προσθήκη του μύκητα του *F. oxysporum*. Είναι γνωστό ότι, η θερμοκρασία λειτουργίας των ενζύμων είναι στους 50<sup>0</sup>C. Παρατηρείται ότι, στην αρχή με την αύξηση της ενεργότητας των εμπορικών ενζύμων Celluclast 1,5 L -Novozyme 188, αυξάνεται και η ποσότητα των σακχάρων σχεδόν αναλογικά, δηλαδή με μια προσέγγιση 1 FPU ενζύμων αντιστοιχεί σε 10g/L σακχάρων που υδρολύονται.

Στη συνέχεια γίνεται η προϋδρολύση στους 30<sup>0</sup>C. Είναι γνωστό ότι, σε αυτή τη θερμοκρασία πραγματοποιείται η ζύμωση με τη μέγιστη απόδοση, ενώ τα εμπορικά ένζυμα δρουν με παρά πολύ μικρή απόδοση. Από τα αποτελέσματα φαίνεται ποιο ένζυμο έχει την μεγαλύτερη απόδοση στη βέλτιστη θερμοκρασία, ενώ παράλληλα γίνεται παρατήρηση των αποτελεσμάτων μεταξύ διαφορετικών αναλογιών των ενζύμων. Διαπιστώνεται αρχικά ότι, η ποσότητα των σακχάρων σε οποιαδήποτε αναλογία του *F. oxysporum* και το Celluclast 1,5 και L -Novozyme 188 είναι παρά πολύ μικρή και μπορεί να συγκριθεί με την προϋδρολύση στους 50<sup>0</sup>C με 3 FPU Celluclast 1,5 και L -Novozyme 188. Παρόλα αυτά παρατηρείται ότι, όσο μειώνονται τα FPU των ενζύμων του *F. oxysporum* μειώνεται σε πολύ μικρό ποσοστό και η ποσότητα σακχάρων. Συμπεραίνεται λοιπόν ότι, με την αύξηση των FPU των ενζύμων του *F. oxysporum*, αυξάνεται η ποσότητα των σακχάρων σε μικρό βαθμό αλλά και ότι, έχουν παρόμοια απόδοση με προϋδρολύση στους 50<sup>0</sup>C με 3 FPU Celluclast 1,5 και L -Novozyme 188. Επιβεβαιώνεται με αυτό το τρόπο ότι τα ένζυμα Celluclast 1,5 και L -Novozyme 188 δεν λειτουργούν σε προϋδρολύση στους 30<sup>0</sup>C αλλά και ότι, στις βέλτιστες συνθήκες τα ένζυμα Celluclast 1,5 και L -Novozyme 188 έχουν πολύ μεγαλύτερη απόδοση σε σχέση με τα ένζυμα του *F. oxysporum*.

Στο τρίτο μέρος του πίνακα παρατηρείται ότι, η προϋδρολύση γίνεται στους 50<sup>0</sup>C όπου τα

ενζύμα Celluclast 1,5 και L -Novozyme 188 έχουν την μεγαλύτερη απόδοση. Παράλληλα γίνεται προσπάθεια να διαπιστωθεί αν ο μύκητας του *F. oxysporum* μπορεί να αυξήσει το βαθμό απόδοσης της προυδρολύσης και αν ναι με ποια αναλογία των ενζύμων. Στην πρώτη αναλογία 2 και 5 FPU ενζύμων Celluclast 1,5 και L -Novozyme 188 και μύκητα *F. oxysporum* η ποσότητα των σακχάρων είναι παρόμοια με προϋδρόλυση με 3 FPU ενζύμων Celluclast 1,5 και L -Novozyme 188. Συμπεραίνεται ότι ο *F. oxysporum* βοηθάει στην προϋδρόλυση με μικρή αλλά αισθητή απόδοση. Στην αναλογία ενζύμων 3,5 και 3,5 FPU ενζύμων Celluclast 1,5 και L -Novozyme 188 και ενζύμων του *F. oxysporum* διαπιστώνεται ότι τα συνολικά σάκχαρα έχουν μεν αυξηθεί αλλά όχι σε τέτοιο βαθμό όσο ήταν το αναμενόμενο. Το συγκεκριμένο αποτέλεσμα θα μπορούσε να χαρακτηριστεί και ως πειραματικό σφάλμα, αν ληφθεί υπόψη και η επόμενη αναλογία ενζύμων. Όμως έτσι δεν είναι δυνατή η ασφαλής διατύπωση των συμπερασμάτων.

Στη τελευταία προϋδρόλυση με αναλογία ενζύμων 5 και 2 FPU ενζύμων Celluclast 1,5 και L -Novozyme 188 και μύκητα του *F. oxysporum* αντίστοιχα παράχθηκε σχεδόν όση ποσότητα σακχάρων και αιθανόλης αντιστοιχα με μόνο προϋδρόλυση με 7 FPU ενζύμων Celluclast 1,5 και L -Novozyme 188. Από το πείραμα συμπεραίνεται ότι, ο *F. oxysporum* βοήθησε την προϋδρόλυση και μπορεί να αντικαταστήσει τα 2FPU ενζύμων Celluclast 1,5 και L -Novozyme 188, ενώ η απόδοση της υδρόλυσης παραμένει σχεδόν ίδια. Συνοψίζοντας θα μπορούσε να λεχθεί ότι, μόνο στην τελευταία και συγκεκριμένη αναλογία του *F. oxysporum* μπορεί να βοηθήσει την υδρόλυση και ότι, το κύριο μέρος της προυδρολύσης γίνεται κυρίως λόγω των εμπορικών ενζύμων που δε μπορούν να λείπουν πλήρως από αυτή τη διαδικασία. Απόδειξη αυτού είναι τα αποτελέσματα των προϋδρολύσεων στους 30<sup>0</sup>C. Παρόλα αυτά η απόδοση της προϋδρόλυσης θα μπορούσε να αυξηθεί παραπάνω άφου παρατηρήθηκαν αδιάλυτα σάκχαρα μετά το τέλος των προϋδρολύσεων

## **1.2. Προϋδρολση με πιλοτικό μίγμα ενζύμων (Thermomix)**

Ένας δείκτης για το πόσο έχει προχωρήσει η υδρόλυσης είναι το κατά πόσο το μίγμα έχει ρευστοποιηθεί και ομογενοποιηθεί. Επίσης, όσο μεγαλύτερος είναι ο βαθμός απόδοσης της προϋδρόλυσης, που φαίνεται από τα παρακάτω αποτελέσματα, τόσο μικρότερο είναι το ιξώδες. Αυτό μπορεί να φανεί και από την εικόνα του δείγματος κατά την προϋδρόλυση αλλά και από την μέτρηση του ιξώδους. Παρακάτω έχουν παρθεί δείγματα στις 3 και 6 h προϋδρόλυσης στους 50<sup>0</sup>C και έχουν αναλυθεί με ιξωδόμετρο. Επίσης έχουν παρθεί δείγματα με 3, 5 και 7 FPU θερμοενζύμων στην προϋδρόλυση.

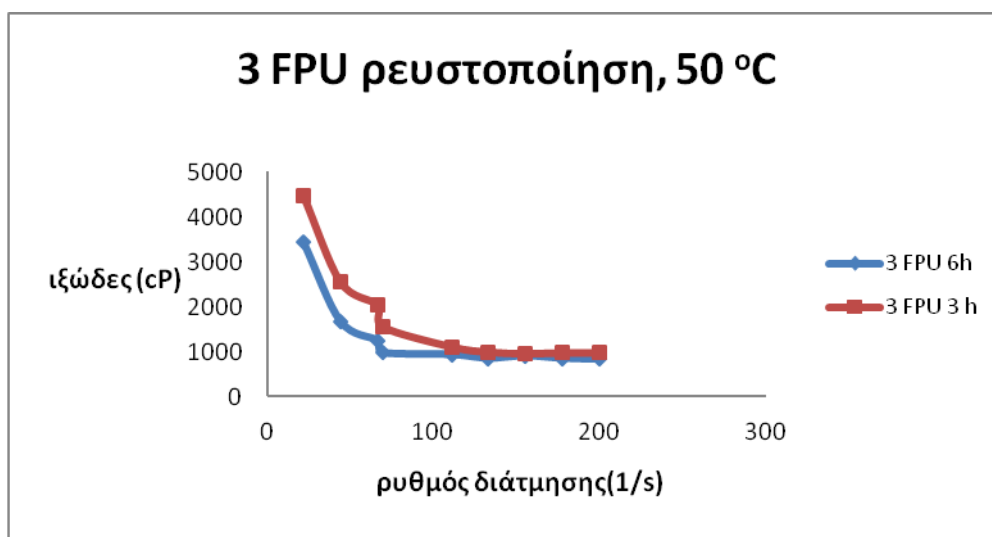


Πίνακας 8: Ιξώδες και ρυθμός διάτμησης από δείγματα σε διαφορετικό στάδιο προυδρολύσης και διαφορετική ποσότητα προσθήκης θερμοενζύμων

|         | 7 FPU 6h    | 7 FPU 3h    | 5 FPU 6h    | 5 FPU 3h    | 3 FPU 6h    | 3 FPU 3 h   |
|---------|-------------|-------------|-------------|-------------|-------------|-------------|
| D (1/s) | ιξώδες (cP) | ιξώδες (cP) | ιξώδες (cP) | ιξώδες (cP) | ιξώδες (cP) | ιξώδες (cP) |
| 22,22   | 1520        | 2179        | 1649        | 2810        | 3446        | 4465        |
| 44,45   | 965         | 1327        | 966         | 1905        | 1672        | 2546        |
| 66,65   | 876         | 1083        | 834         | 1467        | 1242        | 2034        |
| 69,76   | 803         | 987         | 706         | 1310        | 974         | 1551        |
| 111,12  | 723         | 785         | 586         | 1268        | 931         | 1104        |
| 133,33  | 569         | 739         | 567         | 1254        | 850         | 986         |
| 155,55  | 576         | 613         | 701         | 1281        | 904         | 954         |
| 177,77  | 510         | 640         | 706         | 1299        | 847         | 970         |
| 200     | 477         | 613         | 737         | 1299        | 827         | 971         |

Επειδή ο παραπάνω πίνακας είναι δύσκολο να αναγνωστεί και να βγουν εύκολα συμπεράσματα έχουν φτιαχτεί διαγράμματα για κάθε μια προυδρολύσης ξεχωριστά με σκοπό να φανούν πιο εύκολα και πιο σαφή τα συμπεράσματα από τα αποτελέσματα και παραλληλα παρατείνονται και εικονες απο πριν και απο μετα την προυδρολύση.

### Προϋδρόλυση με 3 FPU



Διαγραμμα 1: Ιξώδες και ρυθμός διάτμησης για δείγματα, σε διαφορετικό στάδιο προϋδρόλυσης, στους 50°C με 3 FPU θερμοενζύμων.

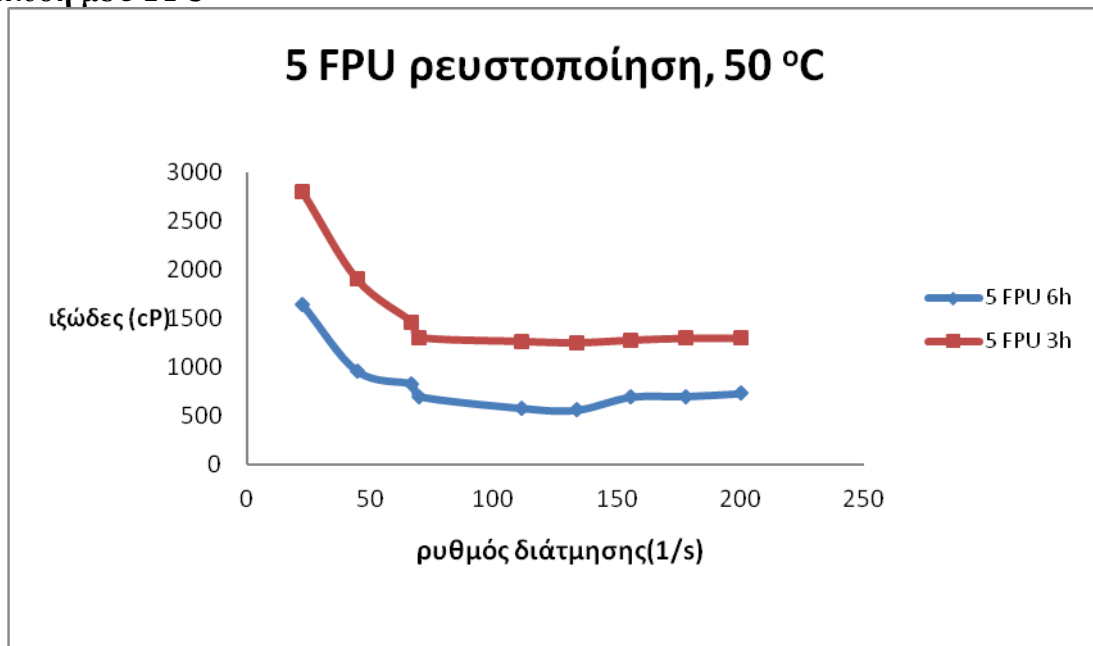
Όπως φαίνεται από το διάγραμμα και στις δυο περιπτώσεις τα ιξώδη είναι πάρα πολύ μεγάλα, συγκρινόμενα με τα προηγούμενα διαγράμματα με τα 5 και 7 FPU. Προφανώς με τη χρήση των 3 FPU η προϋδρόλυση δεν έχει ολοκληρωθεί ούτε στις 3h αλλά ούτε και στις 6h. Επίσης

παρατηρείται ότι το ιξώδες των 3 FPU με 6h προϋδρόλυση είναι ίσο με αυτό των 5 FPU και 3h προϋδρόλυσης. Τέλος η συνάρτηση ιξώδους και ρυθμού διάτμησης και των δυο δειγμάτων έχει μεγάλη κλίση μέχρι τα 50 1/s ενώ μετά τα 120 1/s παραμένει σταθερό και ίσο περίπου με 1000 cP και στις δυο γραμμές.



εικονα 14 : Δείγμα με 3 FPU

### Προϋδρόλυση με 5 FPU



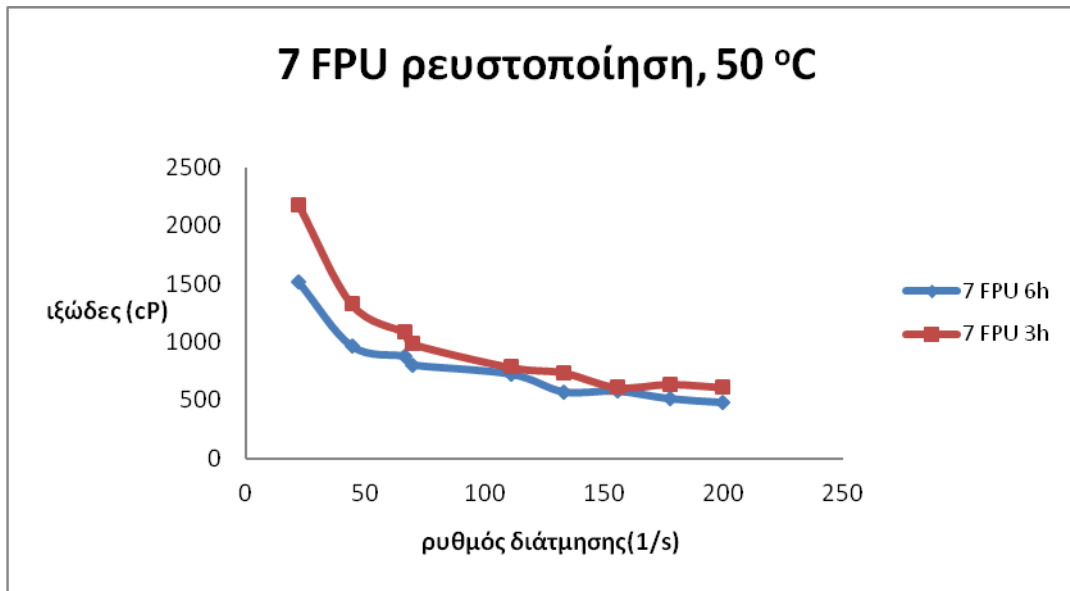
Διάγραμμα 2: Ιξώδες και ρυθμός διάτμησης για δείγματα, σε διαφορετικό στάδιο προϋδρόλυσης, στους 50<sup>0</sup>C με 5 FPU θερμοενζύμων.

Από τη σύγκριση των πινάκων με προϋδρόλυση με 7 και 5 FPU προκύπτει ότι, η διαφορά μεταξύ των δειγμάτων 3h και 6h είναι πολύ μεγαλύτερη. Επίσης οι γραμμές των 5 και 7 FPU στις 6h είναι σχεδόν πανομοιότυπες, γεγονός που αποδεικνύει ότι η μέγιστη προϋδρόλυση έχει ολοκληρωθεί. Είναι προφανές ότι, η προϋδρόλυση στις 3h έχει ακόμα πολλές πρώτες ύλες να προϋδρόλυσει σε σάκχαρα. Άρα μια προϋδρόλυση με 5 FPU δε θα πρέπει να σταματά στις 3h. Επίσης στο διάγραμμα παρατηρείται ότι, οι κλίσεις των δυο ευθειών είναι παρόμοιες σε οποιοδήποτε ρυθμό διάτμησης. Στην αρχή έχουν την ίδια κλίση και η μείωση του ιξώδους είναι ο ρυθμός μείωσης του ιξώδους είναι ο ίδιος και στα δυο δείγματα. Όταν ο ρυθμός διάτμησης φτάσει όμως περίπου στο 75 1/s και στα δυο δείγματα το ιξώδες παραμένει σταθερό (το δείγμα των 3h κοντά στα 1500 cP και στο δείγμα των 6h στα 750 cP).



Εικόνα15 : Δείγμα με 5 FPU

## Προϋδρόλωση με 7 FPU



Διαγραμμα 3: Ιξώδες και ρυθμός διάτμησης για δείγματα, σε διαφορετικό σταδιο προυδρόλωσης, στους 50<sup>0</sup>C με 7 FPU θερμοενζυμων.

Παρατηρείται ότι, το αρχικό ιξώδες (των 6h προυδρόλωσης) είναι πολύ πιο χαμηλό από αυτό των 3h, γεγονός απόλυτα λογικό αφού το δείγμα έχει προϋδρόλυθεί επιπλέον 3h. Φαίνεται λοιπόν ότι, όσο και να ανεβαίνει ο ρυθμός διάτμησης, το ιξώδες από το δείγμα με τις περισσότερες ώρες υδρόλωσης έχει μικρότερο ιξώδες. Επίσης, η κλίση της ευθείας στο αρχικό κομμάτι και των δυο δειγμάτων είναι αρκετά μεγάλη, με μεγαλύτερη αυτή του δείγματος των τριών ωρών. Όταν ο ρυθμός διάτμησης ξεπερνά τα 150 1/s το δείγμα των τριων ωρών σταθεροποιείται ενώ στο άλλο δείγμα συνεχίζει να μικραίνει το ιξώδες του έστω και με πολύ αργό ρυθμό. Συμπεραίνεται λοιπόν ότι, η προϋδρόλωση είχε προχωρήσει σε ικανοποιητικό βαθμό στις τρεις ώρες.



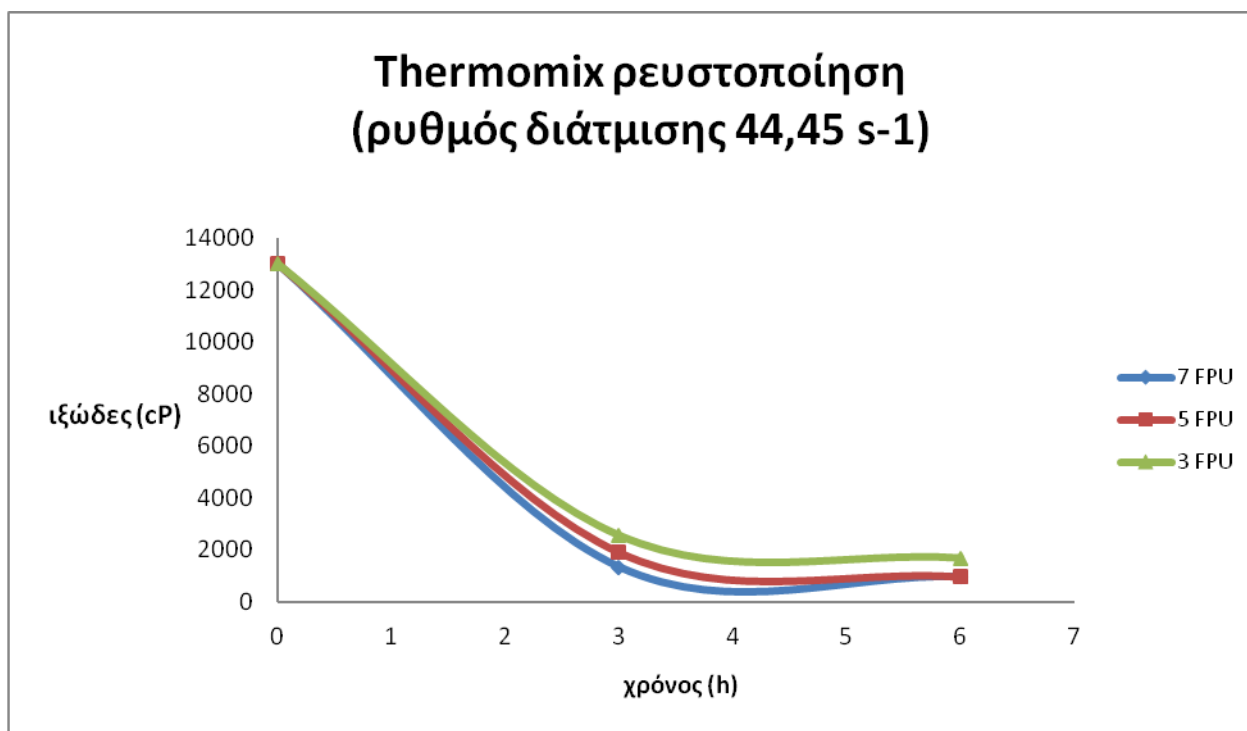
Εικόνα 16: Δείγμα με 7 FPU

Ο επόμενος πίνακας δείχνει συνολικά τη συνάρτηση του χρόνου με το ιξώδες και άρα το βαθμό που έχουν υδρολυθεί τα δείγματα.

Πινάκας 9: Ιξώδους συναρτήσε του χρόνου προϋδρόλυσης για διαφορετικές ποσότητες προσθήκης θερμοενζύμου

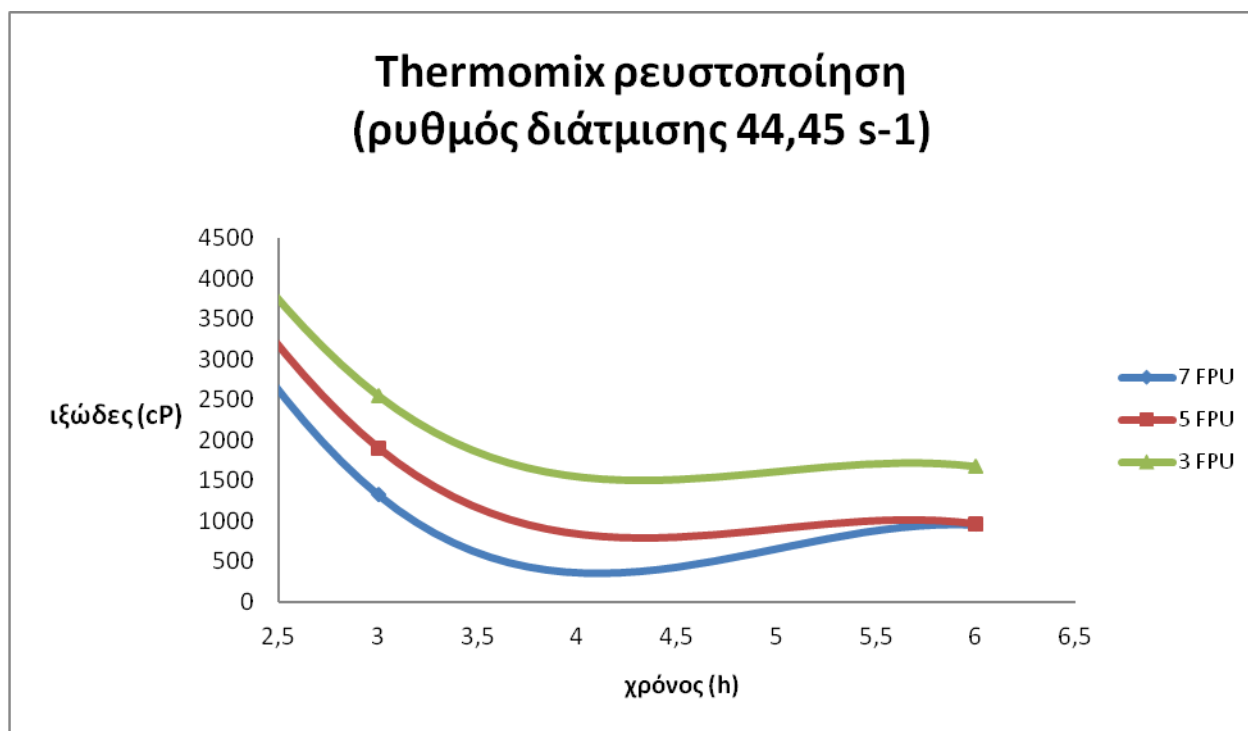
|            | Ιξώδες (cP) | Ιξώδες (cP) | Ιξώδες (cP) |
|------------|-------------|-------------|-------------|
| χρόνος (h) | 7 FPU       | 5 FPU       | 3 FPU       |
| 0          | 13000       | 13000       | 13000       |
| 3          | 1327        | 1905        | 2546        |
| 6          | 959         | 966         | 1672        |

Ο πίνακας επιβεβαιώνει τα μέχρι στιγμής αποτελέσματα. Πιο συγκεκριμένα, με τα 7 FPU το ιξώδες φτάνει σε πολύ μικρές τιμές στο συντομότερο χρόνο και μετά σταθεροποιείται, γεγονός που δείχνει ότι η διαδικασία της προυδρόλυσης έχει τελειώσει πιο νωρίς από τις 6h. Στο δείγμα των 5FPU το ιξώδες αργεί να φτάσει σε χαμηλά επίπεδα αλλά στις 6h έχει ολοκληρωθεί η υδρόλυση. Τέλος το δείγμα με τα 3FPU δε φτάνει ποτέ σε χαμηλά επίπεδα ιξώδους, με αποτέλεσμα να μη προλαβαίνει να ολοκληρωθεί η διεργασία και ότι, τα 3 FPU είναι μη επαρκή για την προϋδρόλυση. Τα παρακάτω διαγράμματα μας δείχνουν και σχηματικά τα παραπάνω αποτελέσματα.



Διάγραμμα 4: Ιξώδες συναρτήσε του χρόνου προϋδρόλυσης στους 50°C για διαφορετική ποσότητα προσθήκης θερμοενζύμων

Από το διάγραμμα φαίνεται ότι, την μεγαλύτερη κλίση την έχει το δείγμα με 7 FPU και ότι, φτάνει πιο γρήγορα σε χαμηλές τιμές ιξώδους. Ταυτόχρονα το δείγμα με τα 3 FPU φαίνεται να μην φτάνει ποτέ τη ίδια απόδοση με τα άλλα δείγματα. Σημαντική είναι το μέρος του διαγράμματος όπου απεικονίζεται το πως κυμαίνεται το ιξώδες τις τρεις τελευταίες ώρες της υδρόλυσης.



*Διάγραμμα 5:* Ιξώδες συναρτήσει του χρόνου προϋδρόλυσης στους 50<sup>0</sup>C για διαφορετική ποσότητα προσθήκης θερμοενζύμων (από 3h -6h προϋδρόλυσης)

Συμπερασματικά θα μπορούσε να λεχθεί ότι, η υδρόλυση για το δείγμα με τα 7 FPU έχει ολοκληρωθεί πριν τις 6h, για το δείγμα με τα 5 FPU οι 6h επαρκούν και γίνεται σε ικανοποιητικό βαθμό η προϋδρόλυση και τέλος για το δείγμα με τα 3 FPU δεν επαρκεί ούτε ο χρόνος ούτε η ποσότητα των ενζύμων.

Ακλουθούν τα αποτελέσματα μιας προυδρόλυσης στους 55<sup>0</sup>C με θερμοενζύμα σε συγκέντρωση 7mg/g DM και συγκέντρωση του άχυρου σίτου 20% DM. Στη συνέχεια προσδιορίζεται η ποσότητα των αρχικών σακχάρων, της γλυκόζης και της ξυλόζης. Παρατίθενται τα αποτελέσματα:

Πινάκας 10: Ποσοότητες και ποσοστά σακχάρων, γλυκόζης και ξυλόζης μετά από προϋδρόλυση με τη χρήση θερμοενζύμων στους 55<sup>0</sup>C

|                                       | <b>7 FPU</b> | <b>5 FPU</b> | <b>3FPU</b> |
|---------------------------------------|--------------|--------------|-------------|
| <b>συνολικά σακχαρα (g/L)</b>         | 121,00       | 121,00       | 121,00      |
| <b>υδρολυμενα σακχαρα (g/L)</b>       | 70,60        | 54,70        | 23,60       |
| <b>ποσοστο υδρολυμενων σακχαρων %</b> | 58,35        | 45,21        | 19,50       |
| <b>υδρολυμενη γλυκοζη (g/L)</b>       | 38,50        | 25,10        | 14,60       |
| <b>υδρολυμενη ξυλοζη (g/L)</b>        | 8,20         | 5,40         | 3.20        |

Από τον πίνακα φαίνεται ότι με τη προϋδρόλυση στους 55<sup>0</sup>C με 7 FPU/gr από τα συνολικά σάκχαρα του δείγματος απελευθερώθηκε περίπου το 60% των συνολικών σακχάρων απόδοση μεγαλύτερη απο 7 FPU ενζύμων Celluclast ή μίγμα ενζύμων Celluclast και μύκητα *F. oxysporum*. Παρατηρείται ότι οι ποσότητες των υδρολυμένων σακχάρων μειώνονται γραμμικά ανάλογα με τα FPU/gr. Από τα συνολικά υδρολυμενα σάκχαρα και στα τρια πειραματα το 53 με 55 % είναι γλυκόζη και το 10 με 12 % ξυλόζη, οι οποίες αποτελούν πρώτη υλη για την μετέπειτα ζύμωση σε αιθανόλη. Οι ποσότητες αυτες δείχνουν οτι υπάρχουν πολλά σάκχαρα το οποία δεν έχουν μετατραπεί σε γλυκόζη και ξυλόζη και άρα θα πρέπει να ερευνηθεί άυξηση της απόδοσης της προϋδρόλυσης. Για αυτό το λόγο θα προστεθούν έπιπλεον ποσότητες ενζύμων Celluclast και *F. oxysporum* στο στάδιο της παραγωγής αιθανόλης.

## 2. Διαδικασία παραγωγής αιθανόλης

Η διαδικασία που ακολουθήθηκε είναι η παραλαβή των δειγμάτων και η τοποθέτηση τους στους 30°C με ήπια ανάδευση για να πραγματοποιηθεί η ζύμωση. Τα πρώτα πειράματα έγιναν χωρίς τη προσθήκη ενζύμων. Μετά από αυτά τα πειράματα έγινε επιπλέον προσθήκη του μύκητα *F.oxysporum* και ενζύμου Celluclast στο προϋδρολυμένο άχυρο με σκοπό τη ζύμωση των ελευθέρων σακχάρων και τη μετατροπή τους σε αιθανόλη, και παράλληλα την υδρόλυση των ποσυσακχαριτών που έχουν απομείνει στο μίγμα. Κατά την διάρκεια της ζύμωσης πραγματοποιείται με αυτό το τρόπο ταυτόχρονα απελευθέρωση επιπλέον σακχάρων από το προϋδρολυμένο άχυρο σιτου και η μετατροπή τους σε αιθανόλη. Το κύριο κριτήριο της διαδικασίας αυτής είναι η παραγωγή και η απόδοση της μετατροπής των σακχάρων σε αιθανόλη.

### 2.1 Διαδικασία παραγωγής αιθανόλης χωρίς τη προσθήκη επιπλέον ενζύμων

Η διαδικασία που ακολουθήθηκε για τη παράγωγή αιθανόλης ήταν η παραλαβή των δειγμάτων από το στάδιο της προϋδρολυσης και η προετοιμασία τους για τη διαδικασία της ζύμωσης. Αρχικά τοποθετήθηκαν σε φιάλες και μετά σε αναδευτήρα με ήπια ανάδευση. Η ζύμωση γινόταν αναερόβια για 144 ώρες στους 30°C χωρίς τη προσθήκη επιπλέον ενζύμων. Παρακάτω παρατίθενται τα αποτελέσματα από τις ζυμώσεις αλλά και οι συνθήκες προϋδρολυσης:



Πινάκας 11: Ζυμώσεις χωρίς την προσθήκη επιπλέον ενζύμων

| Ενζυμικό σύστημα                              | Θερμοκρασία προϋδρόλυσης (°C) | Θερμοκρασία ζύμωσης (°C) | FPU       | Αιθανόλη (g/L) |
|---|-------------------------------|--------------------------|-----------|----------------|
| Celluclast 1,5 L –<br>Novozyme 188            | 50                            | 30                       | 3         | 9              |
|   |                               |                          | 5         | 17             |
|   |                               |                          | 7         | 22             |
| Celluclast-<br>Novozyme + <i>F. oxysporum</i> | 30                            | 30                       | 2 + 5     | 7              |
|   |                               |                          | 3.5 + 3.5 | 8              |
|   |                               |                          | 5+2       | 8              |
| Celluclast-<br>Novozyme + <i>F. oxysporum</i> | 50                            | 30                       | 2 + 5     | 8              |
|   |                               |                          | 3.5 + 3.5 | 11             |
|   |                               |                          | 5+2       | 23             |

Ένα κομμάτι του παραπάνω πίνακα έχει σχολιαστεί και στο κεφάλαιο 1.1 πίνακας (7). Προϋδρόλυση με συνδυασμό εμπορικών ενζύμων και μύκητα *F. oxysporum* στο κομμάτι της απόδοσης της προυδρόλυσης και το ποσό των σακχάρων που ελευθερώνονται και μπορούν να ζυμωθούν σε αιθανόλη. Σε αυτό το κεφάλαιο σχολιάζεται ταυτόχρονα η απόδοση των ενζύμων και του μύκητα προς την απόδοση τους στην παράγωγη αιθανόλης και η συνέχιση της διαδικασίας της υδρόλυσης παράλληλα με τη διαδικασία της ζύμωσης.

Παρατηρείται για το δείγμα που είχε προστεθεί ενζυμο Celluclast πριν τη διαδικασία της προυδρόλυσης η απόδοση της παράγωγη αιθανόλης να είναι ανάμεσα στο 30 με 35% των ελεύθερων σακχάρων. Η ποσότητα της αιθανόλης φαίνεται να έχει γραμμική σχέση με τα σάκχαρα και η μέγιστη ποσότητα αιθανόλης παραχθηκε με προσθήκη 7 FPU ενζύμων. Για την σύγκριση των παρακάτω αποτελεσμάτων χρησιμοποιείται το δείγμα με 7 FPU ενζύμων Celluclast γιατί στα υπόλοιπα δείγματα προστέθηκε ποσότητα 7 FPU αθροιστικά ενζύμων και μύκητα.

Παρατηρείται ότι με τη προυδρόλυση στους 30°C με ενζυμο celluclast και μύκητα *F. oxysporum* 7 FPU αθροιστικά τα ελευθέρα σάκχαρα είναι μειωμένα κατά 50 με 60% σε σχέση μετά ελευθέρα σάκχαρα που είχαμε με προυδρόλυση στους 50°C με 7 FPU με ενζυμο Celluclast. Για αυτό το λόγο αναμενόταν και μείωση της ποσότητας παράγωγης αιθανόλης κατά την ζύμωση. Η ποσότητα αιθανόλης ήταν 60 με 70% χαμηλότερη της ποσότητας αιθανόλης που παραχθηκε κατά τη ζύμωση με 7 FPU με ενζυμο Celluclast δηλαδή κατά 15 με 20% μειωμένη η απόδοση της παράγωγης αιθανόλης από τα ελευθέρα σάκχαρα. Με τη προυδρόλυση στους 50°C με ενζυμο

Celluclast και μύκητα *F. oxysporum* 7 FPU αρχικά παρατηρείται ότι με την αύξηση του ενζύμου Celluclast αυξάνεται και η ποσότητα ελεύθερων σακχάρων που μπορούν να ζυμωθούν σε αιθανόλη. Η απόδοση της παράγωγης αιθανόλης κυμαίνεται από 25 με 35% συνάρτηση των ελεύθερων σακχάρων και αυξάνεται με την αύξηση της ποσότητας του ενζύμου. Διαπιστώνεται ότι παρόμοια απόδοση της ζύμωσης και παραγόμενη ποσότητα αιθανόλης επιτεύχθηκε με 7 FPU ένζυμων Celluclast και 5 FPU ένζυμων Celluclast μαζί με 2FPU μύκητα *F. oxysporum*.

Βάσει των αποτελεσμάτων συμπεραίνεται ότι και στη ζύμωση από τα 7 FPU ένζυμων celluclast τα 2 FPU μπορούν να αντικατασταθούν με 2 FPU μύκητα *F. oxysporum*. Παρόλα αυτά οι αποδόσεις κάτω από όλες της συνθήκες ήταν κατά 50% μειωμένες σε σχέση με τα αναμενόμενα αποτελέσματα.

## 2.2 Διαδικασία παραγωγής αιθανόλης με τη προσθήκη επιπλέον ενζύμων

Βάση των παραπάνω συμπερασμάτων κρίθηκε αναγκαία η προσθήκη επιπλέον ενζύμων ή μικροοργανισμών για τη παράγωγή αιθανόλης με υψηλότερη απόδοση. Οι προυδρολύσεις έγιναν με θερμοενζύμα με προσθήκη 5 και 7 FPU στους 55<sup>0</sup>C. Προστέθηκαν στα αραιωμένα δείγματα είτε ενζύμα Celluclast είτε ο μύκητας *F. oxysporum* σε διαφορές συγκεντρώσεις.

### 2.2.1. Διαδικασία παραγωγής αιθανόλης με ταυτόχρονη προσθήκη εμπορικών ενζύμων

Τα αποτελέσματα του δευτέρου πειράματος παρατίθενται παρακάτω. Σε αυτό το πείραμα δόθηκε έμφαση στη τελική απόδοση της αιθανόλης αλλά και στις ποσότητες των σακχάρων που υπήρχαν στα δείγματα και μπορούσαν να ζυμωθούν σε αιθανόλη.

Πίνακας 12: Τελικά αποτελέσματα ποσοτήτας αιθανόλης και ποσοστα αιθανόλης με τα συνολικά σακχαρα και τη γλυκοζη στα πειράματα

|                             |            | Αίθανολη (g/L) | Ποσοστο μετατροπής των συνολικών σακχαρων σε αιθανολη | Ποσοστο μετατροπής, με βάση τη γλυκοζης, σε αιθανολη | Αιθανολη / συνολικά σακχαρα (g/g) | Αιθανολη /γλυκοζη (g/g) |
|-----------------------------|------------|----------------|---|--|-----------------------------------|-------------------------|
| <b>EM</b>                   | <b>15%</b> |                |   |  |                                   |                         |
| <b>celluclast (FPU/gDM)</b> | <b>5</b>   | <b>27,34</b>   | <b>0,60</b>   | <b>0,75</b>  | <b>0,30</b>                       | <b>0,38</b>             |
| <b>Celluclast (FPU/gDM)</b> | <b>3</b>   | <b>23,51</b>   | <b>0,52</b>   | <b>0,65</b>  | <b>0,26</b>                       | <b>0,32</b>             |
|                             |            |                |   |  |                                   |                         |
| <b>EM</b>                   | <b>10%</b> |                |   |  |                                   |                         |
| <b>Celluclast (FPU/gDM)</b> | <b>5</b>   | <b>24,47</b>   | <b>0,80</b>   | <b>1,01</b>  | <b>0,40</b>                       | <b>0,50</b>             |
| <b>Celluclast (FPU/gDM)</b> | <b>3</b>   | <b>21,92</b>   | <b>0,73</b>   | <b>0,91</b>  | <b>0,36</b>                       | <b>0,45</b>             |

Στο πινάκα παρατηρούνται τα αποτελέσματα μετά από μια υδρόλυση στους 55<sup>0</sup>C. Δυο διαφορετικές περιεκτικότητες EM, 10% και 15% κατά την διάρκεια της ζύμωσης. Και στις δυο περιπτώσεις προστέθηκαν celluclast 3 και 5 FPU/gDM ώστε να μπορούν να συγκριθούν τα αποτελέσματα και να βγουν ασφαλή συμπεράσματα τόσο για την επίδραση της διαφορετικής

περιεκτικότητας όσο και για την διαφορετική ποσότητα προσθήκης Celluclast και του τρόπου που επιδρά στην παραγωγή αιθανόλης.

Αρχικά συγκρίθηκε η επίδραση της περιεκτικότητας στην απόδοση αιθανόλης χρησιμοποιώντας τον μέσο όρο των δύο περιπτώσεων για κάθε περιεκτικότητα. Παρατηρήθηκε ότι, η συνολική ποσότητα αιθανόλης αυξήθηκε με την αύξηση της περιεκτικότητας κατά 5% (δηλαδή στο 15%). Όμως η ποσότητα της αιθανόλης δεν αυξήθηκε ανάλογα με την αύξηση της περιεκτικότητας. Η αύξηση της περιεκτικότητας ήταν 50% ενώ η αύξηση της αιθανόλης ήταν περίπου 10%, γεγονός που δείχνει ότι, με την αύξηση αυτή η απόδοση της αιθανόλης μειώθηκε. Αυτό επιβεβαιώθηκε από το αποτέλεσμα το οποίο δείχνει την απόδοση της αιθανόλης σε σχέση με την θεωρητική απόδοση της αιθανόλης βάσει των συνολικών σακχάρων. Στη περιεκτικότητα του 10% ο μέσος όρος της απόδοσης ήταν περίπου στο 0,76 ενώ στο 15% η απόδοση πλησίαζε το 0,55. Πολύ πιο χαρακτηριστική μέτρηση ήταν η απόδοση της αιθανόλης. Βάσει της θεωρητικής απόδοσης της αιθανόλης από την κυτταρίνη, όπου η περιεκτικότητα του άχυρου ήταν 10%, η απόδοση βρέθηκε να είναι στο 0,95 δηλαδή η κυτταρίνη μετατράπηκε εξολοκλήρου σε αιθανόλη γεγονός πρακτικά αδύνατο που διχνην την μετατροπή και της ημικυτταρίνης σε αιθανόλη. Με τη περιεκτικότητα του 15% ήταν κοντά στο 0,7. Αξίζει να σημειωθεί ότι, τα ποσοστά αυτά είχαν μια πάρα πολύ μεγάλη διαφορά μεταξύ τους. Παρόμοια αποτελέσματα με αυτά του πίνακα () διαπιστώνονται αν αντί για τους πίνακες της απόδοσης με βάση την θεωρητική απόδοση αιθανόλης χρησιμοποιηθούν οι πίνακες με τα γραμμάρια αιθανόλης ανά γραμμάρια συνολικών σακχάρων και γραμμάρια κυτταρίνης αντίστοιχα.

Η επιπλέον προσθήκη Celluclast 5 FPU/gDM ήταν φανερό ότι, αύξησε την απόδοση της παράγωγης αιθανόλης τουλάχιστον κατά 10% σε κάθε περίπτωση σε σχέση με τη προσθήκη Celluclast 3 FPU/gDM. Άρα ένα ασφαλές συμπέρασμα είναι ότι η προσθήκη Celluclast 5 FPU/gDM επιτυγχάνει την μεγαλύτερη απόδοση για την αιθανόλη σε όποια περιεκτικότητα και αν είναι αυτή.

Η μεγαλύτερη ποσότητα αιθανόλης παραχθηκε με περιεκτικότητα ΞΜ 15% και Celluclast 5 FPU/gDM αλλά με απόδοση σε σχέση τη παραγωγή αιθανόλης βάσει των συνολικών σακχάρων στο 0,6 και βάσει της κυτταρίνης στο 0,75. Η μεγαλύτερη απόδοση στην παραγωγή αιθανόλης ήταν με DM 10% και Celluclast 5 FPU/gDM με απόδοση με σχέση τα συνολικά σάκχαρα στο 0,81 ενώ παράλληλα κατανάλωσε όλη την κυτταρίνη από το δείγμα.

Πίνακας 13: Παραθεση συνολικής ποσότητας σακχαρών κυτταρινής και ημικυτταρινής πριν και μετά την προυδρολυση, διαλυμένα και αδιαλυτα σακχαρα κυτταρινής και ημικυτταρινής και τελικη ποσοτητα αιθανολης

|                                       | <b>Συνολικά σακχαρα (g/L)</b> | <b>Σακχαρα με την προυδρολυση (g/L)</b> | <b>Τελικά διαλυμένα σακχαρα (g/L)</b> | <b>Τελικά μη διαλυμένα σακχαρα (g/L)</b> | <b>Ποσοστο καταναλωσης του υποστρωματος (%)</b> | <b>αιθανολη (g/L)</b> |
|---------------------------------------|-------------------------------|---|---------------------------------------|--|---|-----------------------|
| <b>EM 10% (+3 FPU/gDM Celluclast)</b> | <b>60,5</b>                   | <b>35,3</b>                             | <b>3,7</b>                            | <b>9,96</b>                              | <b>77,42</b>                                    | <b>21,92</b>          |
| <b>EM10% (+5 FPU/gDM Celluclast)</b>  |                               |   | <b>4,6</b>                            | <b>7,6</b>                               | <b>79,83</b>                                    | <b>24,47</b>          |
| <b>EM15% (+3 FPU/gDM Celluclast)</b>  | <b>90,75</b>                  | <b>53,0</b>                             | <b>8,1</b>                            | <b>27,41</b>                             | <b>60,87</b>                                    | <b>23,51</b>          |
| <b>EM15% (+5 FPU/gDM Celluclast)</b>  |                               |   | <b>12,7</b>                           | <b>21,1</b>                              | <b>62,75</b>                                    | <b>27,34</b>          |

Παρατηρείται ότι, με υδρόλυση στους 55<sup>0</sup>C η περιεκτικότητα της EM δεν επηρέασε τη ποσότητα των υδρολυμένων σακχάρων, αφού ήταν ανάλογη των συνολικών αρχικών σακχάρων. Η απόδοση των σακχάρων που υδρολύθηκαν κάτω από αυτές τις συνθήκες και στις δυο περιπτώσεις ήταν κοντά στο 57 με 59% . Για τα παρακάτω συμπεράσματα χρειαστηκε να ομαδοποιηθούν τα αποτελέσματα με παρόμοιο τρόπο όπως έγινε και στο σχολιασμό του πίνακα(12).

Στο πρώτο κομμάτι ο σχολιασμός θα γίνει με βάση τη περιεκτικότητας του EM. Παρατηρείται ότι τα τελικά διαλυμένα σάκχαρα ήταν έως και τρεις φορές περισσότερα στη περιεκτικότητα του 15% EM σε σχέση με το 10%. Στη περιεκτικότητα του 10% τα τελικά διαλυμένα σάκχαρα ήταν το 10-15% των υδρολυμένων σακχάρων και το 5-7% των συνολικών σακχάρων ενώ στην περίπτωση του 15% τα διαλυμένα ήταν 15-22% και 8-13% αντίστοιχα. Στα μη διαλυμένα σάκχαρα παρατηρείται η ίδια αναλογία με τα διαλυμένα σάκχαρα μεταξύ του 10% και 15%EM δηλαδή ο μέσος όρος των συνολικά μη διαλυμένων σακχάρων του 15% EM να ήταν τριπλάσιος από το 10% EM. Με αυτό το αποτέλεσμα επαληθεύτηκε η υπόθεση που έγινε και επαληθεύτηκε το πείραμα αφού παρατηρήθηκε ότι τα συνολικά μη διαλυμένα σάκχαρα υπήρχαν σε μεγάλη ποσότητα στα δείγματα μας και η βελτίωση της προυδρολυσης αποτέλεσε πολύ σημαντικό παράγοντα στη ζύμωση. Το ποσοστό των συνολικά μη διαλυμένων σακχάρων στα 10% DM ήταν μεταξύ του 21 με 28% σε σχέση με τα συνολικά υδρολυμένα σάκχαρα και 13 με 17% σε σχέση με τα συνολικά σάκχαρα ενώ στη περιεκτικότητα του 15% EM τα ποσοστά ήταν αντίστοιχα 42 με 50% και 23 με 30%. Το % ποσοστό κατανάλωσης του υποστρώματος παρατηρήθηκε στη

περιεκτικότητα του 10% ήταν κοντά στο 78% και ήταν υψηλότερο σε σχέση με το 15% που η κατανάλωση του κυμαινόταν κοντά το 60%. Μια σημαντική παρατήρηση στο πίνακα είναι το τα % ποσοστά κατανάλωσης του υποστρώματος ήταν πολύ υψηλά. Τα αποτελέσματα δείχνουν ότι ο μύκητας *F. oxysporum* κατανάλωσε και τα σάκχαρα γλυκόζης και ξυλόζης. Τέλος τα ποσά της αιθανόλης που έχουν σχολιαστεί στον παραπάνω πίνακα παρατηρείται ότι όσο αυξάνεται η περιεκτικότητα αυξάνεται και η αιθανόλη αλλά παράλληλα μειώνεται και η συνολική απόδοση της διεργασίας.

Η προσθήκη 5 FPU/gDM celluclast αύξησε κατά 30 με 50% τη συνολική ποσότητα διαλυμένων σακχάρων σε σχέση με τη προσθήκη 3 FPU/gDM Celluclast ενώ παράλληλα μείωσε κατά 20 με 25% τα συνολικά μη διαλυμένα σάκχαρα. Επίσης με τη μεγαλύτερη ποσότητα προσθήκης celluclast η % κατανάλωση του υποστρώματος αυξήθηκε. Βρέθηκε σα συμπέρασμα ότι η προσθήκη 5 FPU/gDM celluclast ήταν πιο αποτελεσματική και αύξησε την απόδοση της διεργασίας.

Η μεγαλύτερη ποσότητα τελικών διαλυμένων σακχάρων επιτεύχθηκε με EM 15% και 5 FPU/gDM Celluclast ενώ η τα λιγότερα αδιάλυτα σάκχαρα και το μεγαλύτερο % ποσοστό κατανάλωσης του υποστρώματος επιτευχθηκαν με EM 10% και 5 FPU/gDM Celluclast.

Πίνακας 14: Παραθεση συνολικής ποσότητας σακχαρών κυτταρινής πριν και μετά την προυδρολύση, διαλυμένα και αδιάλυτα σακχαρα κυτταρινής και ποσοστο καταναλωσης του υποστρωματος

|                                       | Συνολική ποσότητα κυτταρινής πριν τη προυδρολύση (g/L) | Υδρολυμένη κυτταρινή (g/L) | Τελική διαλυμένη κυτταρινή (g/L) | Τελική μη διαλυμένη κυτταρινή (g/L) | Ποσοστο καταναλωσης του υποστρωματος (%) |
|---------------------------------------|--|----------------------------|----------------------------------|-------------------------------------|--|
| <b>EM10% (+3 FPU/gDM Celluclast)</b>  | <b>48,4</b>  | <b>9,25</b>                | <b>1,3</b>                       | <b>6,75</b>                         | <b>75,03</b>                             |
| <b>EM 10% (+5 FPU/gDM Celluclast)</b> |  |                            | <b>2,6</b>                       | <b>5,4</b>                          | <b>75,12</b>                             |
| <b>EM 15% (+3 FPU/gDM Celluclast)</b> | <b>72,6</b>  | <b>13,87</b>               | <b>4,4</b>                       | <b>18,7</b>                         | <b>61,36</b>                             |
| <b>EM 15% (+5 FPU/gDM Celluclast)</b> |  |                            | <b>5,4</b>                       | <b>16,1</b>                         | <b>63,35</b>                             |

Παρατηρήθηκε ότι η υδρολυμενη γλυκόζη δεν επηρεάζεται από το ποσοστό του ΞΜ, αφού ήταν ανάλογη του ποσοστού, και ήταν περίπου στο 18 με 20% της συνολικής αρχικής γλυκόζης στο δείγμα. Για την σύγκριση των αποτελεσμάτων θα ομαδοποιούνται τα αποτελέσματα αρχικά ανάλογα με την περιεκτικότητα τους και μετά ανάλογα με τη ποσότητα της προσθήκης celluclast.

Ένα πρωτοφανές αποτέλεσμα ήταν ότι η ποσότητα τελικής διαλυμένης γλυκόζης ήταν πάρα πολύ μικρή. Στο 10%ΞΜ ο μέσος όρος της τελικής διαλυμένης γλυκόζης ήταν κοντά στο 2(g/L) δηλαδή μόλις το 4% της συνολικής γλυκόζης και το 20% της υδρολυμενης γλυκόζης. Επίσης μικρό ποσοστό παρατηρήθηκε και στη περιεκτικότητα του 15%ΞΜ δηλαδή το 7% της συνολικής γλυκόζης και το 36% της υδρολυμενης γλυκόζης. Αξιοσημείωτο ήταν ότι η συνολική γλυκόζη αυξήθηκε κατά 50%, όπως ήταν αναμενόμενο, με την αύξηση του %ΞΜ το ποσοστό διαλυμένης γλυκόζης σχεδόν διπλασιάστηκε με την αύξηση αυτή ενώ σε καθαρά νούμερα ήταν περίπου δύομιση φορές μεγαλύτερη ποσότητα διαλυμένης γλυκόζης, δηλαδή από 2g/L σε 5 g/L. Η τελική ποσότητα διαλυμένης γλυκόζης στη περιεκτικότητα του 10%ΞΜ σε μέσο όρο ήταν κοντά στα 6 g/L δηλαδή το 12% της συνολικής γλυκόζης. Στο 15%ΞΜ όμως παρατηρείται ότι τριπλασιάζεται η ποσότητα μη διαλυμένης γλυκόζης δηλαδή κοντά στα 17g/L και το 24% της συνολικής γλυκόζης. Τέλος παρατηρούνται τα ποσοστά κατανάλωσης της κυτταρίνης όπου με την αύξηση του %ΞΜ διαπιστώνεται ταυτοχρονη μείωση του ποσοστού αυτού. Σαν αποτέλεσμα μπορεί να βγει ότι με την αύξηση της περιεκτικότητας μεγαλώνει και σε μεγάλο ποσοστό της μη διαλυμενης γλυκοζης ενώ παράλληλα μειώθηκε το ποσοστό της κατανάλωσης της κυτταρίνης.

Με την αύξηση της ποσότητας του celluclast από 3 mg/gΞΜ σε 5 FPU/gDM παρατηρείται ότι η ποσότητα διαλυμένης γλυκόζης αυξήθηκε κατά 25% και 100% στις περιεκτικότητες 10 και 15%ΞΜ αντίστοιχα, ενώ παράλληλα μειώνεται κατά 10 με 15% τη συνολική ποσότητα μη διαλυμένης γλυκόζης. Τέλος δε μπορούν να βγουν ασφαλή συμπεράσματα για το αν και κατά ποσό η αύξηση του ποσοστού αυξάνει την κατανάλωση της κυτταρίνης.

Η μεγαλύτερη ποσότητα διαλυμένης γλυκόζης ήταν με ΞΜ 15% και 5 FPU/gDM celluclast. Το μικρότερο ποσοστό μη διαλυμένης γλυκόζης και μεγαλύτερης κατανάλωσης της κυτταρίνης ήταν με ΞΜ 10% και 5 FPU/gDM Celluclast που παράλληλα από τα 48,4 g/L μετατράπηκαν σε 9,25g/L υδρολυμενης γλυκόζης και 2,6g/L τελικής διαλυμενης γλυκόζης.

Πίνακας 15: Παραθεση συνολικής ποσοτητας σακχαρων ημικυτταρινης πριν και μετα την προυδρολυση, διαλυμενα και αδιαλυτα σακχαρα ημικυτταρινης και ποσοστο καταναλωσης του υποστρωματος

|  | Συνολικη<br>ξυλοζη<br>(g/L) | Υδρολυμενη<br>ξυλοζη<br>(g/L) | Τελικη<br>διαλυμενη<br>ξυλοζη<br>(g/L) | Τελικη μη<br>διαλυμενη<br>ξυλοζη<br>(g/L) | Ποσοστο<br>καταναλωσης<br>του<br>υποστρωματος<br>(%) |
|--|-----------------------------|-------------------------------|--|---|--|
| <b>EM 10%</b><br><b>(+3 FPU/gDM</b><br><b>Celluclast)</b>  | 12,1                        | 4,1                           | 4,4                                    | 2,4                                       | 38,98  |
| <b>EM 10%</b><br><b>(+5 FPU/gDM</b><br><b>Celluclast)</b>  |                             |                               | 5,3                                    | 1,8                                       | 36,78  |
| <b>EM 15%</b><br><b>(+3 FPU/gDM</b><br><b>Celluclast)</b>  | 18,15                       | 5,2                           | 6,2                                    | 4,5                                       | 36,53  |
| <b>EM 15 %</b><br><b>(+5 FPU/gDM</b><br><b>Celluclast)</b> |                             |                               | 7,4                                    | 3,1                                       | 37,51  |

Για τη σύγκριση και τη διαπίστωση ασφαλών συμπερασμάτων από τους πίνακες γίνεται ομαδοποίηση στα νούμερα. Αρχικά συγκριθήκαν οι αποδόσεις βάσει της %EM και μετά συνάρτηση της προσθήκης ένζυμων celluclast. Η πρώτη παρατήρηση ήταν ότι δεν υδρολύεται το ίδιο ποσοστό ξυλοζης Στη περιεκτικότητα του 10% EM υδρολύεται το 34% δηλαδή 4,1g/L. Στη περιεκτικότητα του 15%EM μόλις το 28% ενώ τα ποσοστά έχουν τη μικροτερη απόκλιση και η ποσοτητα υδρευόμενης ξυλοζης να ήταν πάνω από 6g/L και όχι 5,2g/L. Για αυτό το λόγο η σύγκριση των υπολοίπων αποτελεσμάτων χρησιμοποιει τις αρχικες ποσότητες της ξυλοζης για το σχολιασμό των αποτελεσμάτων.

Για την τελική διαλυμένη ξυλοζη παρατηρείται ότι η περιεκτικότητα δε επηρεάζει την απόδοση της. Χρησιμοποιείται ο μέσος όρος των δυο δειγμάτων και διαπιστώνεται ότι τα ποσοστά κυμαίνονται από 36 με 40%. Η αναλογία αλλάζει όμως μεταξύ της υδρολυμενης ξυλοζης και της τελικής διαλυμένης ξυλοζης όπου στο 10% EM η αναλογία ήταν περίπου 1:1 με 1:1,2 κατά g/L γίνεται στη περιεκτικότητα του 15%EM 1:1,4 με 1:1,7 κατά g/L. Η ποσότητα της αδιάλυτης ξυλοζης στη περιεκτικότητα του 10%EM ήταν κατα μέσο όρο 2,1g/L δηλαδή περίπου το 17,5% της αρχικής ξυλοζης. Στη περιεκτικότητα το 15%EM ήταν κατα μέσο όρο 3,8 g/L δηλαδή το 20% της αρχικής ξυλοζης έτσι αφού συγκριθήκαν οι αποδόσεις έγινε δυνατή η διαπίστωση ότι το ποσοστό αδιάλυτης ξυλοζης ήταν ανεξάρτητο από τη περιεκτικότητα. Τέλος παρατηρήθηκε ότι το % υπόστρωμα της ημικυτταρινης που δεν μετατράπηκε κυμαινοταν από 36 μέχρι 40% σε όλες της



περιπτώσεις. Τα παραπάνω αποτελέσματα δείχνουν ότι μπορούν να βγάλουν με ασφαλή συμπεράσματα ότι αν επιθυμείτε μεγαλύτερη ποσότητα διαλυμένης ξυλίζης πρέπει να αυξηθεί η περιεκτικότητα αφού τα ποσοστά μη διαλυμένης ξυλοζης και κατανάλωσης της ημικυταρινης ήταν ισα.

Η αύξηση της προσθήκης celluclast από 3 FPU/gDM Celluclast σε 5 FPU/gDM Celluclast είχε θετικά αποτελέσματα. Αύξησε κατά μέσο όρο 20% την τελική ποσότητα της διαλυμένης ξυλοζης ενώ παράλληλα μείωσε κατά 30% τη ποσότητα μη διαλυμένης ξυλοζης. Το ποσοστό κατανάλωσης της ημικυταρινης δε επηρεάζεται ούτε και από την ποσότητα προσθήκης celluclast στα δείγματα και παράμενε σταθερή ανάμεσα στο 36 με 40%.

Η μεγαλύτερη ποσότητα υδρολυμενης ξυλοζης, η μεγαλύτερη ποσότητα τελικής διαλυμένης ξυλοζης και η μικρότερη ποσότητα μη διαλυμένης ξυλοζης επιτεύχθηκε με 15%ΞΜ και προσθήκη 5 FPU/gDM Celluclast ενώ το ποσοστό κατανάλωσης του υποστρώματος της ημικυταρινης ήταν 37,5%. Το μεγαλύτερο όμως ποσοστό υδρολυμενης ξυλοζης επιτεύχθηκε με 10%ΞΜ και προσθήκη 5 FPU/gDM Celluclast δηλαδή 34% επί της αρχικής ξυλοζης και ενώ όλες οι ποσότητες και τα ποσοστά αναλύθηκαν παραπάνω και βρεθήκαν περίπου ανάλογα και περίπου ισα αντίστοιχα.

## 2.2.2. Διαδικασία παραγωγής αιθανόλης με ταυτόχρονη προσθήκη του ενζυμικού συστήματος του μύκητα *F. oxysporum*

Σε αυτό το πείραμα έγινε προσπάθεια να αντικατασταθούν τα ενζυμα του celluclast με το μικροοργανισμό του *F.oxysporum*. Χρησιμοποιήθηκαν σαν πρώτη υλη σακχάρων το προυδρολυμένο άχυρο στους 55 βαθμούς κελσίου με 7 FPU ενζυμων. Επίσης σε αυτό το πείραμα δοθηκε έμφαση κυριως με την τελική ποσότητα της αιθανόλης και το ποσοστό μετατροπής σε αιθανόλη σε σχέση με τη μέγιστη δυνατή ποσότητα αιθανόλης που θα μπορούσε να παραχθει. Παρακάτω παρατίθενται τα αποτελέσματα:

Πίνακας16 : Αποτελέσματα των πειραμάτων με 3 και 5 FPU μύκητα *f.ox.* σε 10 και 15% DM προυδρολυμένου άχυρου

| ΞΜ (%)                                     | Αιθανολη (g/L) | Ποσοστό αιθανόλης προς τη θεωρητική αιθανόλη που θα μπορούσε να παραχθει (g/g) | Ποσοστό αιθανόλης προς το ΞΜ (g/g) |
|--|----------------|--|------------------------------------|
| <b>Πείραμα με 3 FPU <i>F.oxysporum</i></b> |                |  |                                    |
| 10   | 12,558         | 0,418  | 0,125                              |
| 15   | 19,020         | 0,422  | 0,126                              |
| <b>Πείραμα με 5 FPU <i>F.oxysporum</i></b> |                |  |                                    |
| 10   | 11,735         | 0,391  | 0,117                              |
| 15   | 22,06          | 0,490  | 0,147                              |

Παρατηρείται ότι τα δείγματα των 3 FPU ενζύμων του *F.oxysporum* η ποσότητα παραγωγής αιθανόλης ήταν ανάλογα της περιεκτικότητας της ξηρής μάζας. Παρατηρείται μια αύξηση στο ποσοστό αιθανόλης προς τη θεωρητική αιθανόλη που μπορεί να παραχθεί και στο ποσοστό αιθανόλης προς την ΞΜ, παρόλα αυτά οι τιμές αυτές κυμαίνονται μέσα στα πειραματικά σφάλματα. Συμπεραίνεται ότι με 3 FPU ενζύμων *F.oxysporum* η ποσότητα της αιθανόλης που παράγεται ήταν ανάλογη των ελεύθερων σακχάρων. Στο πείραμα με τα 5 FPU ενζύμων *F.oxysporum* παρατηρείται ότι τόσο η ποσότητα της αιθανόλης αλλά και τα δυο ποσοστά που εμφανίζονται στο πινάκα ήταν ιδιαίτερα αυξημένα ειδικά σε σχέση με το δείγμα του 10% ΞΜ. Η ποσοστητα της αιθανόλης και τα ποσοστά από το δείγμα με 10% ΞΜ κυμαίνονται σε παρομοια αποτελέσματα με τα δυο πειράματα του 3 FPU μύκητα *f.ox.* Συμπεραίνουμε λοιπόν με 5 FPU μύκητα του *f.ox* σε 15% ΞΜ πετυχαίνεται 20% αύξηση της παραγωγής αιθανόλης σε σχέση με τα υπόλοιπα δείγματα γεγονός που φαίνεται και στις αυξημένες τιμές του ποσοστού αιθανόλης προς τη θεωρητική αιθανόλη που θα μπορεί να παραχθει και του ποσοστού αιθανόλης προς το ΞΜ.

Πίνακας 17: Παράθεση συνολικής ποσότητας σακχάρων κυτταρίνης και ημικυτταρίνης πριν και μετά την προυδρολυση, διαλυμένα και αδιάλυτα σάκχαρα κυτταρίνης και ημικυτταρίνης και τελική ποσότητα αιθανόλης

|  | Συνολικά σακχαρα (g/L) | Σακχαρα με την προυδρολυση (g/L) | Τελικά διαλυμένα σακχαρα (g/L) | Τελικά μη διαλυμένα σακχαρα (g/L) | Ποσοστο καταναλωσης του υποστρωματος | Αιθανολη (g/L) |
|--|------------------------|----------------------------------|--------------------------------|-----------------------------------|--------------------------------------|----------------|
| <b>EM 10%</b><br>(+3 FPU/gDM<br><i>F.oxysporum</i> ) | 60,5                   | 35,3                             | 7,2                            | 18,1                              | 0,58                                 | 11,5           |
| <b>EM 10%</b><br>(+5 FPU/gDM<br><i>F.oxysporum</i> ) |                        |                                  | 8,3                            | 14,3                              | 0,63                                 | 11,7           |
| <b>EM 15%</b><br>(+3 FPU/gDM<br><i>F.oxysporum</i> ) | 90,8                   | 53,0                             | 14,1                           | 37,1                              | 0,44                                 | 19,0           |
| <b>EM 15%</b><br>(+5 FPU/gDM<br><i>F.oxysporum</i> ) |                        |                                  | 19,8                           | 31,6                              | 0,43                                 | 22,1           |

Ο σχολιασμός του πίνακα θα γίνεται με το ίδιο σκεπτικό όπως ο πίνακας (13). Αρχικά παρατηρείται ότι, η αύξηση των τελικών διαλυμένων σακχάρων επιτευχθηκε με την αύξηση των FPU/gDM *F.oxysporum*. Με την αύξηση της EM από 10% σε 15% παρατηρήθηκε ότι, τα αντίστοιχα ποσά των διαλυμένων σακχάρων υπερδιπλαστηκαν και η μεγαλύτερη ποσότητα διαλυμένων σακχάρων επετεύχθηκε με EM 15% και 5 FPU/gDM *F.oxysporum*. Τα τελικά μη διαλυμένα σάκχαρα μειώθηκαν με την αύξηση της ποσότητας των FPU/gDM *F.oxysporum* και παράλληλα αυξήθηκαν με την αύξηση της EM. Χαρακτηριστικό παράδειγμα του προηγούμενου σχολίου ήταν το δείγμα του 10% EM όπου με αύξηση των FPU/gDM *F.oxysporum* διαπιστώθηκε μείωση 20 με 25% των μη διαλυμένων σακχάρων και με την αύξηση της EM από 10% σε 15% αυξήθηκε η ποσότητα κατά 200 με 210%. Το ποσοστό της κατανάλωσης του εξαρτάται μόνο από το % EM όπου για δείγματα του 10%EM ήταν 60% και σε δείγματα 15%EM κυμάνθηκε από 42 με 45%.

Η ποσότητα της αιθανόλης που παράχθηκε αυξάνεται σε ποσοστό 170 με 200% ανάλογα με της αύξηση της EM ενώ αυξάνεται και με την αύξηση προσθήκης FPU/gDM *F.oxysporum*. Η παράγωγη της αιθανόλης παρατηρείται ότι συνδέεται άμεσα με τη %EM. Παρόλα αυτά οι ποσότητες αιθανόλης που παράχθηκαν με ένζυμα *F.oxysporum* συγκρίνοντας με το πίνακα (13) οι ήταν μικρότερες σε σχέση με το Celluclast κάτω υπό όλες της συνθήκες.

Πίνακας 18: παράθεση συνολικής ποσότητας σακχάρων κυτταρίνης πριν και μετά την προϋδρόλυση, διαλυμένα και αδιάλυτα σάκχαρα κυτταρίνης και ποσοστό κατανάλωσης του υποστρώματος

|  | Συνολική ποσότητα κυτταρίνης πριν τη προϋδρόλυση (g/L) | Υδρολυμένη κυτταρίνη (g/L) | Τελική διαλυμένη κυτταρίνη (g/L) | Τελική μη διαλυμένη κυτταρίνη (g/L) | Ποσοστό κατανάλωσης του υποστρώματος |
|--|--|----------------------------|----------------------------------|-------------------------------------|--------------------------------------|
| <b>EM 10%</b><br><b>(+3FPU/gDM</b><br><b><i>F.oxysporum</i>)</b> | 48,4   | 9,3                        | 5,5                              | 10,8                                | 0,66                                 |
| <b>EM 10%</b><br><b>(+5FPU/gDM</b><br><b><i>F.oxysporum</i>)</b> |  |                            | 4,1                              | 8,4                                 | 0,74                                 |
| <b>EM 15%</b><br><b>(+3FPU/gDM</b><br><b><i>F.oxysporum</i>)</b> | 72,6   | 13,9                       | 5,1                              | 28,1                                | 0,54                                 |
| <b>EM 15%</b><br><b>(+5FPU/gDM</b><br><b><i>F.oxysporum</i>)</b> |  |                            | 4,3                              | 23,6                                | 0,62                                 |

Η τελική ποσότητα κυτταρίνης παρατηρήθηκε ότι εξαρτάται κυρίως από τη ποσότητα FPU/gDM *F.oxysporum*. Με την αύξηση της μειώθηκε η τελική ποσότητα διαλυμένης κυτταρίνης. Επίσης με την αύξηση των FPU/gDM *F.oxysporum* η ποσότητα μη διαλυμένης κυτταρίνης μειώθηκε μέχρι και 20%, μείωση που δε φαίνεται να επηρεάζεται από το της %EM. Με την αύξηση της EM από 10 σε 15% διαπιστώθηκε ότι η ποσότητα της τελικής μη διαλυμένης κυτταρίνης αυξήθηκε κατά 300%. Η μικρότερη ποσότητα διαλυμένης αλλά και μη διαλυμένης κυτταρίνης παρατηρήθηκε με 10%EM και 5 FPU/gDM *F.oxysporum*, όπου σε αυτό το δείγμα υπήρξε και το μεγαλύτερο ποσοστό κατανάλωσης του υποστρώματος. Το ποσοστό κατανάλωσης του υποστρώματος αυξήθηκε με την αύξηση των FPU/gDM *F.oxysporum* και μειώθηκε με την αύξηση της %EM. Σε σύγκριση με το πινάκα (14) τα ποσοστά κατανάλωσης του υποστρώματος ήταν παρόμοια με τα δείγματα όπου χρησιμοποιήθηκε ενζύμο Celluclast σε κάθε αναλογία %EM και FPU/gDM ενζύμων.

Πινάκας 19: παράθεση συνολικής ποσότητας σακχάρων ημικυτταρινής πριν και μετά την προυδρολύση, διαλυμένα και αδιάλυτα σάκχαρα ημικυτταρινής και ποσοστό κατανάλωσης του υποστρώματος

|  | Συνολική<br>ξυλοζη<br>(g/L) | Υδρολυμένη<br>ξυλοζη<br>(g/L) | Τελική<br>διαλυμένη<br>ξυλοζη<br>(g/L) | Τελική μη<br>διαλυμένη<br>ξυλοζη<br>(g/L) | Ποσοστό<br>κατανάλωσης<br>του<br>υποστρώματος |
|--|-----------------------------|-------------------------------|--|---|---|
| <b>EM 10%</b><br>(+3 FPU/gDM<br><b>F.oxysporum</b> ) | 12,1                        | 4,1                           | 1,1                                    | 7,1                                       | 0,32  |
| <b>EM 10%</b><br>(+5 FPU/gDM<br><b>F.oxysporum</b> ) |                             |                               | 2,8                                    | 5,4                                       | 0,32  |
| <b>EM 15%</b><br>(+3 FPU/gDM<br><b>F.oxysporum</b> ) | 18,2                        | 5,2                           | 5,4                                    | 7,2                                       | 0,31  |
| <b>EM 15%</b><br>(+5 FPU/gDM<br><b>F.oxysporum</b> ) |                             |                               | 7,1                                    | 5,8                                       | 0,29  |

Παρατηρήθηκε ότι, στα δείγματα με 10% EM η τελική ποσότητα διαλυμένης ξυλόζης ήταν περίπου το ¼ σε σχέση με τα δείγματα του 15%EM. Επίσης η ποσότητα τελικής διαλυμένης ξυλόζης αυξήθηκε με την αύξηση των FPU/gDM *F.oxysporum*. Η τελική ποσότητα αδιάλυτης ξυλόζης στα δείγματα με 10%EM φάνηκε να μειώνεται κατά 20% με την αύξηση FPU/gDM *F.oxysporum*, ενώ παρόμοια ήταν η μεταβολή και στα δείγματα με 15%EM. Το ποσοστό κατανάλωσης του υποστρώματος παραμείνει σταθερό και να κυμάνθηκε από 29 έως 32% σε όλα τα δείγματα. Σε σύγκριση με το πινάκα (15) και τα δείγματα του Celluclast το ποσοστό κατανάλωσης του υποστρώματος ήταν 10 - 15% μικρότερο.

## 2.3. Σύγκριση των μεθόδων της διαδικασίας παραγωγής αιθανόλης

Σε αυτό το κεφάλαιο έγινε προσπάθεια σύγκρισης του ενζύμου celluclast και του μύκητα του *f.ox.* που χρησιμοποιήθηκαν στα πειράματα και κάτω υπό ποιες συνθήκες επιτεύχθηκε η μεγαλύτερη απόδοση για το καθένα. Παρακάτω ακολουθεί ένας πίνακας συγκριτικός για τις δυο σειρές πειραμάτων.

Πίνακας 20: αποτελέσματα ζυμώσεων με ενζυμο του celluclast και μύκητα του *f.ox.* με 3 και 5 FPU σε 10 και 15% ΞΜ του προυδρολυμένου άχυρου σίτου

|                            | Με χρήση εμπορικών ενζύμων<br>Celluclast-Novozyme |   | Με χρήση ενζύμων του <i>F.oxysporum</i> |   |
|----------------------------|---|---|---|---|
|                            | Αιθανόλη<br>(g/L)                                 | Ποσοστό αιθανόλης προς<br>τη θεωρητική αιθανόλη που<br>θα μπορούσε να παραχθεί<br>(g/g) | Αιθανόλη<br>(g/L)                       | Ποσοστό αιθανόλης προς<br>τη θεωρητική αιθανόλη που<br>θα μπορούσε να παραχθεί<br>(g/g) |
| <b>πειράματα με 10% ΞΜ</b> |   |   |   |   |
| 3 FPU                      | 21,9  | 0,730   | 12,6                                    | 0,418   |
| 5 FPU                      | 24,4  | 0,801   | 11,7                                    | 0,391   |
| <b>πειράματα με 15% ΞΜ</b> |   |   |   |   |
| 3 FPU                      | 23,5  | 0,521   | 19,0                                    | 0,422   |
| 5 FPU                      | 27,3  | 0,601   | 22,1                                    | 0,490   |

Παρατηρείται ότι για τα πειράματα με 10% ΞΜ η ποσότητα της αιθανόλης που παράχθηκε ήταν μεγαλύτερη με τη χρήση των ενζύμων celluclast. Διαπιστώθηκε ότι σε δείγμα με 10% ΞΜ η παραγωγή αιθανόλης με τη χρήση του μύκητα του *F.oxysporum* είτε με 3 είτε με 5 FPU ήταν ίδια μέσα στα όρια προφανώς του πειραματικού σφάλματος. Με την αύξηση της ποσότητας των ενζύμων του celluclast από 3 σε 5 FPU αυξήθηκε και η ποσότητα της αιθανόλης και η αποδοση της ζύμωσης έφτασε κοντά στο 80% παράγοντας τη διπλασία ποσότητα αιθανόλης στις ίδιες συνθήκες από ότι με την παρουσία ενζύμων του *F.oxysporum*. Η μεταβολή από 10 σε 15% ΞΜ στα δείγματα που προστεθηκε το ενζυμο celluclast παρατηρήθηκε ότι το ποσοστό αιθανόλης προς τη θεωρητική αιθανόλη που θα μπορούσε να παραχθεί μειώθηκε κατά 20 με 25% περίπου σε κάθε περίπτωση. Σε αντίθεση με τη χρήση αυτών του μύκητα *F.oxysporum*. όπου αύξησε και το ποσοστό αιθανόλης προς τη θεωρητική αιθανόλη που θα μπορούσε να παραχθεί κατά 15 με 20% αλλά και

διπλασίασε υπό συγκεκριμένες συνθήκες τη ποσότητα παραγωγής τη αιθανόλης. Η αποδοση και οι ποσότητες που παράχθηκαν με τη ζύμωσης με την παρουσία ενζύμων του μύκητα *F.oxysporum* ήταν μικρότερες από τη ζύμωση με το ενζυμο celluclast σε κάθε περίπτωση του πειράματος. Παρατηρήθηκε τέλος ότι και με τα δύο σε συγκέντρωση του άχυρου 15%DM ότι με την αύξηση των FPU υπήρξε αύξηση της παραγωγής της αιθανόλης και του ποσοστού αιθανόλης προς τη θεωρητική αιθανόλη που θα μπορούσε να παραχθεί.

## Συμπεράσματα και προτάσεις

Συνοψίζοντας, στη παρούσα εργασία μελετήθηκε η παραγωγή αιθανόλης με τη χρήση του μυκητα *Fusarium oxysporum* στο στάδιο της προυδρολυσης και της ζύμωσης του άχυρου σίτου (PWS) για τη παραγωγή αιθανόλης. Επίσης συγκρίθηκε με τα ενζυμα του Celluclast 1,5L - Novozyme 188 και την απόδοσή τους στην προυδρολυση και ζύμωση του άχυρου σίτου (PWS) για την παραγωγή αιθανόλης.

Από μελέτη της προυδρολυσης του άχυρου σίτου με το μύκητα του *Fusarium oxysporum* και τα ενζυμα του Celluclast 1,5L -Novozyme 188 καταλήξαμε στα παρακάτω συμπεράσματα:

- Η διαδικασία της προυδρολυσης για να ολοκληρωθεί πλήρως χρειάζεται τουλάχιστον έξι ώρες και για μικρές ποσότητες προσθήκης ενζύμου ενδέχεται να μην αρκούν οι έξι ώρες.
- Η προυδρολυση στους 30 βαθμούς κελσίου, θερμοκρασία ζύμωσης με το μυκητα *Fusarium oxysporum*, έχει μικρή απόδοση με αποτέλεσμα να μην απελευθερώνεται επαρκής ποσότητα σακχάρων αλλά και ούτε να παράγεται ικανή ποσότητα αιθανόλης για να θεωρήσουμε επιτυχημένη τη διαδικασία.
- Η βέλτιστη θερμοκρασία για την προυδρολυσης είναι άνω των 55 βαθμών κελσίου και με την προσθήκη 7 FPU ενζύμων.
- Ο μυκητας *Fusarium oxysporum* δε επαρκεί μονός του για να απελευθερωθεί η μέγιστη δυνατή ποσότητα σακχάρων και έχει μικρότερη απόδοση σε σχέση με το ενζυμικό σύστημα Celluclast 1,5L - Novozyme 188. Παρόλα αυτά μικρή ποσότητα ενζύμων Celluclast 1,5L -Novozyme 188, της τάξης 25 με 35%, μπορεί να αντικατασταθεί με αντίστοιχη ποσοτητα ενζύμων του μύκητα *Fusarium oxysporum* και να έχουμε παρόμοιες αποδόσεις στη προυδρολυση.

Από μελέτη της ζύμωσης του άχυρου σίτου καταλήξαμε στα παρακάτω συμπεράσματα:

- Βασικός παράγοντας για να επιτευχθεί μεγάλος βαθμός απόδοσης της ζύμωσης είναι η προυδρολυση ώστε να υπάρχουν αρκετά ελεύθερα σάκχαρα να ζυμωθούν σε αιθανόλη.
- Η ποσότητα του μύκητα *Fusarium oxysporum* που προστέθηκε μετα την προϋδρολυση δεν επαρκει για να πραγματοποιηθεί ικανοποιητική ζύμωση και χρειάζεται επιπλέον προσθήκη του ενζύμου.



- Η μέγιστη απόδοση της ζύμωσης με ένζυμα Celluclast επιτεύχθηκε με 5 FPU σε 10% ΞΜ ενώ η μεγαλύτερη παραγόμενη ποσότητα αιθανόλης επιτεύχθηκε με 5 FPU σε 15% ΞΜ με χαμηλότερο όμως βαθμό απόδοσης της διαδικασίας παραγωγής αιθανόλης
- Τα ένζυμα Celluclast έχουν μεγαλύτερη απόδοση στη παραγωγή αιθανόλης σε σχέση με τα ένζυμα του μύκητα *Fusarium oxysporum*
- Η μέγιστη απόδοση της ζύμωσης αλλά και μεγαλύτερη παραγωγή αιθανόλης από το μύκητα του *Fusarium oxysporum* επιτεύχθηκε με 5 FPU σε 15% ΞΜ όπου όμως δεν έφτασε την απόδοση ζύμωσης και τη παραγωγή της αιθανόλης σε επίπεδα των ενζύμων Celluclast 1,5L - Novozyme 188. Στη συγκεκριμένη συνθήκη όμως διαφορές μεταξύ των δυο ενζύμων στη ζύμωση αμβλύθηκαν.

Λαμβάνοντας υπόψη τα παραπάνω συμπεράσματα προτείνεται η διεργασία της προυδρολύσης να διερευνηθεί περισσότερο σε θερμοκρασίες κοντά στους 50 βαθμούς κελσίου καθώς και να διερευνηθεί περισσότερο η αναλογία των ενζύμων του Celluclast 1,5L -Novozyme 188 με το μύκητα του *Fusarium oxysporum* σε αναλογίες από 60 και 40% μέχρι και 85 και 15% αντίστοιχα. Η διεργασία της ζύμωσης να διερευνηθεί σε υψηλότερες συγκεντρώσεις του προεδρευόμενου άχυρου σίτου (PPWS) και με μεγαλύτερες ποσότητες προσθήκης ενζύμων και μύκητα όπως 6 και 7 FPU. Η παραπάνω ερευνά δείχνει ότι μύκητας του *Fusarium oxysporum* μπορεί να αντικαταστήσει ακόμα και πλήρως, υπό συνθήκες, εμπορικά ένζυμα όπως το Celluclast στη διεργασία της προυδρολύσης και της ζύμωσης για τη παραγωγή αιθανόλης.

## Βιβλιογραφία

1. A. Demirbas (2008): *The Importance of Bioethanol and Biodiesel from Biomass*, Energy Sources, Part B: Economics, Planning, and Policy, 3:2, 177-185.
2. Bioenergy International Magazine, No 51, April 2011, page 21
3. Boerrigter, H., Galis, H.P., Slort, D.J., and Bodenstaff, H., Gas Cleaning for Integrated Biomass Gasification (BG) and Fischer-Tropsch (FT) Systems; Experimental Demonstration of Two BG-FT Systems, Presented at the 2<sup>nd</sup> World Conference and Technology Exhibition on Biomass for Energy, Industry and Climate Protection, Rome, Italy, May 2004.
4. 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.
5. Demirbas A. Ethanol from cellulosic biomass resources. Int J Green Ener 1, pp. 79–87, 2004
6. Demirbas, A., 2005. Bioethanol from cellulosic materials: a renewable motor fuel from biomass. Energy sources 27, 327–337.
7. 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>.
8. Farid Talebnia, Dimitar Karakashev, Irimi Angelidaki (2009), Production of bioethanol from wheat straw: An overview on pretreatment, hydrolysis and fermentation.
9. Fernanda da Cunha-Pereira, Lilian Raquel Hickert, Nicole Teixeira Sehnema, Priscila Brasil de Souza-Cruz, Carlos Augusto Rosa, Marco Antônio Záchia Ayub, (2010), Conversion of sugars present in rice hull hydrolysates into ethanol by *Spathaspora arborariae*, *Saccharomyces cerevisiae*, and their co-fermentations
10. Galbe, M., Zacchi, G., 2002. A review of the production of ethanol from softwood. Applied Microbiology and Biotechnology 59, 618–628.

11. Garcia-Cubero, M.T., Gonzalez-Benito, G., Indacoechea, I., Coca, M., Bolado, S., 2009. Effect of ozonolysis pretreatment on enzymatic digestibility of wheat and rye straw. *Bioresource Technology* 100, 1608–1613.
12. Gianni Panagiotou, Evangelos Topakas, Maria Moukouli, Paul Christakopoulos, Lisbeth Olsson, (2011), Studying the ability of *Fusarium oxysporum* and recombinant *Saccharomyces cerevisiae* to efficiently cooperate in decomposition and ethanolic fermentation of wheat straw
13. Gianni Panagiotou, Evangelos Topakas, Maria Moukouli, Paul Christakopoulos, Lisbeth Olsson, 2011, Studying the ability of *Fusarium oxysporum* and recombinant *Saccharomyces cerevisiae* to efficiently cooperate in decomposition and ethanolic fermentation of wheat straw
14. Hendriks, A., Zeeman, G., 2009. Pretreatments to enhance the digestibility of lignocellulosic biomass. *Bioresource Technology* 100, 10–18
15. Jian Xu\*, Mette Hedegaard Thomsen, Anne Belinda Thomsen Ethanol production from hydrothermal pretreated corn stover with a loop reactor
16. Jost Marva Cervera<sup>a</sup>, Pernille Anastasia Skovgaard<sup>b</sup>, Claus Felby<sup>b</sup>, 2009 Enzymatic hydrolysis and fermentation of palm kernel press cake for production of bioethanol
17. Kerstetter, J.D., Lyons, J.K., 2001. Wheat Straw for Ethanol Production in Washington: A Resource, Technical, and Economic Assessment. Washington State University Cooperative Extension. <http://www.energy.wsu.edu/documents/renewables/WheatstrawForEthanol.pdf>.
18. Kim, H-J., Kang, B-S., Kim, M-J., Park, Y.M., Kim, D-K, Lee, J-S., Lee, K-Y., Transesterification of vegetable oil to biodiesel using heterogeneous base catalyst, *Catalysis Today*, 93-95, 315-320, 2004
19. Klinke, H.B., Ahring, B.K., Schmidt, A.S., Thomsen, A.B., 2002. Characterization of degradation products from alkaline wet oxidation of wheat straw. *Bioresource Technology* 82, 15–26.

20. 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.
21. 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.
22. Lee, J., 1997 *Biological Conversion of Lignocellulosic Biomass to Ethanol*, J. *Biotechnology*, 56, p.1-24, 1997
23. Machado Filho, H., *Steps taken in the Brazilian Energy and Transportation Sectors that Contribute to the Ultimate Objective of the UNFCCC*. Ministry of Science and Technology of Brazil, 2000
24. Mai Østergaard Petersena, Jan Larsena, Mette Hedegaard Thomsenb, (2009), Optimization of hydrothermal pretreatment of wheat straw for production of bioethanol at low water consumption without addition of chemicals
25. Mette Hedegaard Thomsen, Anders Thygesen, Anne Belinda Thomsen, (2008), 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
26. M. Galbe, G. Zacchi (2002): *A review of the production of ethanol from softwood*. *Appl Microbiol Biotechnol* 59:618–628
27. Okano, K., Kitagawa, M., Sasaki, Y., Watanabe, T., 2005. Conversion of Japanese redcedar (*Cryptomeria japonica*) into a feed for ruminants by white-rot basidiomycetes. *Animal Feed Science and Technology* 120, 235–243.
28. Panagiotou, G., Olsson, L., 2007. Effect of compounds released during pretreatment of wheat straw on microbial growth and enzymatic hydrolysis rates. *Biotechnology and Bioengineering* 96 (2), 250–258.
29. Panagiotou G., Christakopoulos P., Olsson L (2005 $\alpha$ ). The influence of different cultivation conditions on the metabolome of *Fusarium oxysporum*. *Journal of Biotechnology* 118:304-315

30. 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
31. 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
32. 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
33. 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
34. **Steen Riisgaard** Bioenergy International Magazine
35. Stella Berzegiannh, Aggelos Lappas Biofuels
36. .Sudhagar, M., Tabil, L.G., Sokhansanj, S., 2004. Grinding performance and physical properties of wheat and barley straws, corn stover and switchgrass. *Biomass and Bioenergy* 27, 339–352.
37. Summersa M D, Jenkinsa B M, Hydeb P R, Williamsc J F, MuttersdR G, Scardaccie S C, Haire M W. Biomass production and allocation in rice with implications for straw harvesting and utilization. *Biomass and Bioenergy*, 2003, 24(3): 163–173
38. Thygesen, A., Oddershede, J., Lilholt, H., Thomsen, A.B., Sta °hl, K., 2005. On the determination of crystallinity and cellulose content in plant ?bres. *Cellulose* 12, 563–576.
39. Wayne W Fish Watermelon juice: a promising feedstock supplement, diluent, and nitrogen supplement for ethanol biofuel production *Biotechnology for Biofuels*.
40. Ye Sun, Jiayang Cheng (2002): *Hydrolysis of lignocellulosic materials for ethanol production: a review*. *Bioresource Technology* 83, 1-11

41. Yong Tang, Danqing Zhao, Carrasco Cristhian and Jianxin Jiang, (2011), Simultaneous saccharification and cofermentation of lignocellulosic residues from commercial furfural production and corn kernels using different nutrient media
42. Παπαιωανου Αγγελος, 1996, μηχανικη των ρευστων τομος 1
43. . Ξηρός Χ. Αξιολόγηση του ενζυμικού κ μικροβιακού συστήματος του μύκητα *Fuzarium Oxysporum* για την βιομετατροπή κυτταρινούχων κ ημικυτταρινούχων αγροτοβιομηχανικών παραπροϊόντων. 2009
44. Χριστακόπουλος Π. Τόπακας Ε. Βιοτεχνολογια παραγωγής Βιοκαυσίμων 2010