ΕΘΝΙΚΟ ΜΕΤΣΟΒΙΟ ΠΟΛΥΤΕΧΝΕΙΟ

ΣΧΟΛΗ ΧΗΜΙΚΩΝ ΜΗΧΑΝΙΚΩΝ

ΤΟΜΕΑΣ ΣΥΝΘΕΣΗΣ ΚΑΙ ΑΝΑΠΤΥΞΗΣ ΒΙΟΜΗΧΑΝΙΚΩΝ ΔΙΑΔΙΚΑΣΙΩΝ (ΒΙΟΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑΣ)

ΤΙΤΛΟΣ ΔΙΠΛΩΜΑΤΙΚΗΣ ΕΡΓΑΣΙΑΣ:

ΜΕΛΕΤΗ ΤΟΥ ΕΝΖΥΜΙΚΟΥ ΣΥΣΤΗΜΑΤΟΣ ΤΟΥ ΘΕΡΜΟΦΙΛΟΥ ΜΥΚΗΤΑ *Sporotrichum Thermophile* ΩΣ ΠΡΟΣ ΤΗΝ ΙΚΑΝΟΤΗΤΑ ΥΔΡΟΛΥΣΗΣ ΥΔΡΟΘΕΡΜΙΚΑ ΚΑΤΕΡΓΑΣΜΕΝΗΣ ΒΑΓΑΣΣΗΣ.

ΟΝΟΜΑ ΣΠΟΥΔΑΣΤΗ : ΜΠΑΡΜΠΑΤΕΩΡΓΗ ΚΩΝΣΤΑΝΤΙΑ

ΕΠΙΒΛΕΠΩΝ ΚΑΘΗΓΗΤΗΣ: κ. Ευάγγελος ΤΟΠΑΚΑΣ

ΑΘΗΝΑ 2013

ΠΡΟΛΟΓΟΣ

Η παρούσα διπλωματική εργασία διεξήχθη στις εγκαταστάσεις του εργαστηρίου Βιοτεχνολογίας της σχολής Χημικών Μηχανικών του Εθνικού Μετσόβιου Πολυτεχνείου.

Με την ευκαιρία αυτή που μου δίνεται, αισθάνομαι την ανάγκη να ευχαριστήσω όλους τους συντελεστές που συνέβαλαν καθοριστικά στην διεκπεραίωση και ολοκλήρωσης της εργασίας. Συγκεκριμένα, τους επιβλέποντες καθηγητές κ. Χριστακόπουλο Παύλο και κ. Τόπακα Ευάγγελο για την πολύτιμη καθοδήγηση και συμβολή τους σε οποιοδήποτε πρόβλημα και αν προέκυψε.

Επίσης, θα ήθελα να ευχαριστήσω και τον διδακτορικό κ. Μάτσακα Λεωνίδα για την συνεργασία που είχαμε και την πολύτιμη βοήθεια, που μου προσέφερε καθ΄όλη τη διάρκεια των πειραματικών διαδικασιών, η οποία αποτέλεσε ιδιαίτερα σημαντική για την ολοκλήρωση της εργασίας.

Τέλος, να ευχαριστήσω και όλους τους συνεργάτες εντός του εργαστηρίου, με τους οποίους ανέπτυξα μία άψογη σχέση και συνεργασία.

ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ

Περίληψη……...…..5

Abstract…….....……...…...6

1.Εισαγωγή ……8

1.1 Βιοκαύσιμα……..……...8

1.2 Βιοαιθανόλη……...……10

1.3 Φυτική βιομάζα: πρώτη ύλη για την παραγωγή βιοκαυσίμων…..….....13

1.3.1 Βαγάσση γλυκού σόργου……...…15

1.4 Φύση και σύσταση λιγνινοκυτταρινούχου βιομάζας…….……....18

1.4.1 Κυτταρίνη...…….…....19

1.4.2 Ημικυτταρίνη…….…....20

1.4.3 Λιγνίνη…….....23

1.5 Παραγωγή αιθανόλης από λιγνινοκυτταρινούχο βιομάζα……....24

1.5.1 Ενζυμική υδρόλυση……..26

1.5.1.1 Παράγοντες που επηρεάζουν την ενζυμική υδρόλυση….....28

1.6 Διεργασίες παραγωγής αιθανόλης….……31

1.7 Μύκητας Sporotrichum Thermophile……...……...34

2.Υλικά και Μέθοδοι …….....36

2.1 Πρώτη ύλη και μικροοργανισμοί…….…..…36

2.2 Μέτρηση σακχάρων……..…….……....36

2.3 Μέτρηση ενεργότητας ενζύμων……..37

2.4 Ανάπτυξη μικροοργανισμού……...37

2.5 Παραγωγή ενζύμου από Fusarium Oxysporum……39

2.6 Παραλαβή ενζυμικού διαλύματος…….....40

2.7 Παρασκευή βαγάσσης και υδροθερμική κατεργασία αυτής……..41

3.Αποτελέσματα- Συζήτηση……..43

3.1 Παραγωγή ενζύμων από τον μύκητα S. Thermophile……..45

3.2 Πειραματικές Μελέτες……46

3.2.1 Πείραμα 1ο: Μελέτη της επίδρασης της θερμοκρασίας στην ενζυμική υδρόλυση της κυτταρίνης……..…46

3.2.2 Πείραμα 2ο: Μελέτη της επίδρασης του pH στην ενζυμική υδρόλυση της κυτταρίνης ……..…...……50

3.2.3 Πείραμα 3ο: Μελέτη της επίδρασης της ενεργότητας των ενζύμων στην ενζυμική υδρόλυση της κυτταρίνης …….....53

3.2.4 Πείραμα 4ο: Μελέτη της επίδρασης της ποσότητας του υποστρώματος της βαγάσσης στην ενζυμική υδρόλυση της κυτταρίνης ……57

3.2.5 Πείραμα 5ο: Προσδιορισμός του συντελεστή παρεμπόδισης εκ του προϊόντος (K_{IG})……...……...…...61

3.2.6 Πείραμα 6ο: Μελέτη της ανθεκτικότητας του υποστρώματος με τον προσδιορισμό της σταθεράς Krec……...64

3.2.7 Πείραμα 7ο : Μελέτη επίδρασης πρωτεΐνης αλβουμίνης (BSA) και επιφανειοδραστικής ουσίας Tween 80……....69

3.2.8 Πείραμα 8ο: Σύγκριση των ενζυμικών συστημάτων των μυκήτων Fusarium oxysporum, S. thermophile και του εμπορικού Celluclast 1,5L..72

4. Συμπεράσματα……..75

Βιβλιογραφία……..……78

ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Η παρούσα διπλωματική εργασία πραγματοποιήθηκε στις εγκαταστάσεις της σχολής Χημικών Μηχανικών του Εθνικού Μετσόβιου Πολυτεχνείου και συγκεκριμένα στα εργαστήρια του τομέα Σύνθεσης και Ανάπτυξης Βιομηχανικών Διεργασιών (Βιοτεχνολογίας) κατά το χρονικό διάστημα Απριλίου 2012 έως Φεβρουαρίου 2013.

Στην εργασία, πραγματοποιήθηκε η μελέτη του ενζυμικού συστήματος του θερμόφιλου μύκητα Sporotrichum thermophile ATCC 42464 ως προς την ικανότητα υδρόλυσης υδροθερμικά κατεργασμένης βαγάσσης. Συγκεκριμένα, μελετήθηκε η ικανότητα υδρόλυσης της κυτταρίνης που περιέχεται στο υπόστρωμα αυτό από τη δράση του εξωκυτταρικού ενζυμικού συστήματος του μύκητα για διαφορετικές συνθήκες σε κάθε περίπτωση.

Από τις υδρολύσεις, που έλαβαν χώρα, προέκυψαν πειραματικά αποτελέσματα για το ποσοστό υδρόλυσης της κυτταρίνης σε σχέση με διαφορετικές τιμές θερμοκρασίας, pH, ενεργότητας ενζύμων ανά μονάδα υποστρώματος, αρχικής ποσότητας υποστρώματος, καθώς και της επίδρασης που ασκεί η προσθήκη της πρωτεΐνης αλβουμίνης και της επιφανειοδραστικής ουσίας Tween 80.

Η μελέτη και επεξεργασία των αποτελεσμάτων αυτών οδήγησε σε συμπεράσματα για την ενζυμική υδρόλυση της κυτταρίνης που περιέχεται στην υδροθερμικά κατεργασμένη βαγάσση. Συγκεκριμένα, σε ενζυμικό μίγμα του μύκητα S. thermophile βρέθηκε να παρουσιάζει βέλτιστη ενζυμική δράση στους 60ºC και pH 5.5. Παράλληλα, δεν υπήρξε απαίτηση για μεγάλη ενζυμική ενεργότητα, ενώ η αυξανόμενη ποσότητα υποστρώματος βρέθηκε ότι μειώνει την ικανότητα υδρόλυσης. Επίσης, παρατηρήθηκε ότι η προσθήκη πρωτεΐνης και επιφανειοδραστικής ουσίας ενισχύει την διαδικασία της υδρόλυσης και επιδρά σημαντικά ακόμα και για μικρές ποσότητες αυτών των ουσιών.

Συμπερασματικά, μπορούμε να πούμε ότι το ενζυμικό σύστημα του μύκητα S. thermophile μπορεί να χαρακτηριστεί ως πολλά υποσχόμενο ως προς την ικανότητα υδρόλυσης της περιέχουσας κυτταρίνης στην λιγνινοκυτταρινούχο βιομάζα.

ABSTRACT

This Diploma thesis was held at the School of Chemical Engineering, National Technical University of Athens and specific labs sector Synthesis and Development of Industrial Processes (Biotechnology) during the period April 2012 to February 2013.

In this work, a study of the enzyme system of thermophilic fungus Sporotrichum thermophile ATCC 42464 concerning the ability to hydrolyze the cellulose presented in hydrothermally treated bagasse, was evaluated. Specifically, the ability of hydrolyzing cellulose contained in the substrate by the action of extracellular enzyme system of the fungus for different conditions in each case, was examined.

From the hydrolysis, which took place, resulting experimental results for the rate of hydrolysis of cellulose in relation to different values of temperature, pH, enzyme activity per substrate, the initial amount of substrate and the influence of the addition of the protein albumin and surfactant Tween 80.

The study and evaluation of these results led to conclusions on the enzymatic hydrolysis of cellulose contained in the hydrothermally treated bagasse. Specifically, enzyme mixture of the fungus S. thermophile found to exhibit optimal enzyme activity at 60 ° C and pH 5.5. Furthermore, there was no requirement for high enzymatic activity, while the increasing amount of substrate was found to reduce the ability of hydrolysis. It was also observed that the addition of protein and surfactant enhanced the hydrolysis process and has a significant effect even for small amounts of these substances. In conclusion, we can say that the enzyme system of the fungus S. thermophile can be characterized as promising for the ability to hydrolyze the cellulose contained in the lignocellulosic biomass .

1.ΕΙΣΑΓΩΓΗ

Τις τελευταίες δεκαετίες ο άνθρωπος έχει επικεντρωθεί στην ανάπτυξη των ανανεώσιμων πηγών ενέργειας, διότι μπορούν να συμβάλλουν αποτελεσματικά στη μείωση της εξάρτησης από το πετρέλαιο, στην εξασφάλιση της μελλοντικής ενεργειακής επάρκειας και στον περιορισμό των περιβαλλοντικών επιπτώσεων που έχουν τα συμβατικά καύσιμα. Έτσι, λοιπόν, κάνει προσπάθειες, προκειμένου να αντικαταστήσει όσο το δυνατόν περισσότερο τα συμβατικά καύσιμα με εκείνα που προέρχονται από τις ανανεώσιμες αυτές πηγές ενέργειας, δηλαδή τα βιοκαύσιμα.

1.1 ΒΙΟΚΑΥΣΙΜΑ

Τα βιοκαύσιμα, δηλαδή τα καύσιμα των οποίων η πρώτη ύλη, που ονομάζεται βιομάζα, περιλαμβάνει οποιοδήποτε υλικό προέρχεται από ζωντανούς οργανισμούς, καθώς και η βιομάζα αυτούσια ως καύσιμο, έχουν προβληθεί ως μια λύση στο εντεινόμενο πρόβλημα της κλιματικής αλλαγής και της μείωσης των αποθεμάτων των ορυκτών καυσίμων, ενώ ταυτόχρονα μπορούν να δώσουν διεξόδους στην αγροτική οικονομία και γι' αυτό καταβάλλονται πολλές προσπάθειες για την περαιτέρω προώθηση τους. Ωστόσο, οι έρευνες και η πρακτική δείχνουν ότι το μοντέλο παραγωγής των βιοκαυσίμων και η βιασύνη για επέκταση μαζικής κλίμακας μπορεί να επιδεινώσει την περιβαλλοντική και κοινωνική κρίση, ιδιαίτερα στις αναπτυσσόμενες χώρες.

Υπάρχουν πολλά είδη βιοκαυσίμων, αλλά εκείνα στα οποία η τεχνολογία έχει επικεντρωθεί και ενδιαφέρεται περισσότερο είναι η βιοαιθανόλη και το βιοντίζελ. Περίπου 1,3L αιθανόλης ισοδυναμεί ενεργειακά με 1L βενζίνης. Ο πρώτος που αναφέρθηκε στη δυνατότητα χρήσης της αιθανόλης σαν καύσιμο ήταν ο Φόρντ το 1890. Η βιοαιθανόλη, είτε αναμιγνύεται αυτούσια με την βενζίνη, είτε μετατρέπεται πρώτα σε αντικροτικό πρόσθετο (αιθυλο-τριτοταγής-βουτυλαιθέρας- ΕΤΒΕ). Παράγεται με αλκοολική ζύμωση από σακχαρούχα φυτά, όπως σακχαροκάλαμο, σακχαρότευτλα , γλυκό σόργο, κ.ά ή αμυλούχα

φυτά, όπως αραβόσιτος, σίτος, κριθή, καλαμπόκι, καθώς και από την αξιοποίηση του μη εδώδιμου λιγνινοκυτταρινούχου κλάσματος της φυτικής βιομάζας (στελέχοι, κορμοί), όπως επίσης και από απόβλητα (π.χ απόβλητα βιομηχανικών τροφίμων) ή παραπροϊόντα (π.χ ροκανίδια).

Τα βιοκαύσιμα παρέχουν πολλά πλεονεκτήματα και μπορούν να συμβάλλουν αποτελεσματικά στη μείωση της ρύπανσης του περιβάλλοντος ελαττώνοντας κυρίως τις εκπομπές διοξειδίου του άνθρακα. Επίσης, μειώνουν την εξάρτηση από το πετρέλαιο συμβάλλοντας έτσι στην ασφάλεια του ενεργειακού εφοδιασμού και ταυτόχρονα παρέχουν και εναλλακτικές πηγές εισοδήματος στους αγρότες.

Συγκεκριμένα, η χρήση των βιοκαυσίμων συμβάλλει στη μείωση των εκπομπών αερίων του θερμοκηπίου που σχετίζονται με την ενέργεια που χρησιμοποιείται για την παραγωγή του καυσίμου. Το φαινόμενο του θερμοκηπίου είναι φυσικό, ωστόσο ενισχύεται από την ανθρώπινη δραστηριότητα, η οποία οδηγεί στην αύξηση της συγκέντρωσης των αερίων του θερμοκηπίου καθώς και στην έκλυση άλλων επιβλαβών ενώσεων, όπως οι χλωροφθοράνθρακες. Ειδικότερα, στην περίπτωση του διοξειδίου του άνθρακα, οι εκπομπές του αυξήθηκαν σε ποσοστό 80% τα τελευταία 40 χρόνια. Τα τρία τέταρτα της ανθρωπογενούς παραγωγής διοξειδίου του άνθρακα, οφείλεται σε χρήση ορυκτών καυσίμων.

Τα βιοκαύσιμα κατά την χρήση τους ανακυκλώνουν το διοξείδιο του άνθρακα, καθώς το ποσό που εκλύεται κατά την καύση τους, έχει ήδη απομακρυνθεί από την ατμόσφαιρα με τη φωτοσύνθεση κατά τη διάρκεια της ανάπτυξης του φυτού. Αντίθετα, η καύση των πετρελαιοειδών διαχέει στην ατμόσφαιρα επιπλέον ποσότητες της ουσίας, οι οποίες βρίσκονταν θαμμένες υπόγεια για εκατομμύρια χρόνια. Στην πράξη όμως, η μείωση των εκπομπών από τα βιοκαύσιμα που προέρχονται από ενεργειακές καλλιέργειες είναι μικρότερη, γιατί η ανάπτυξη και η καλλιέργεια των φυτών απαιτεί τη χρήση συμβατικών καυσίμων. Ενδεικτικά, αναφέρεται ότι η χρησιμοποίηση αιθανόλης από καλαμπόκι , αντί της βενζίνης, ως καύσιμο μεταφοράς, μειώνει τις εκπομπές των αερίων του θερμοκηπίου κατά

21%, της αιθανόλης, η οποία προέρχεται από σακχαροκάλαμο κατά 56%, ενώ όταν αυτή προέρχεται από λιγνινοκυτταρινούχο βιομάζα κατά 91%.

1.2 ΒΙΟΑΙΘΑΝΟΛΗ

Το πετρελαϊκό ντίζελ και η βενζίνη αποτελούνται από εκατοντάδες διαφορετικούς υδρογονάνθρακες, πολλοί από τους οποίους, όπως το βενζόλιο, τολουόλιο και ξυλένιο, είναι τοξικοί και πτητικοί και απελευθερώνονται στην ατμόσφαιρα κατά την διάρκεια της καύσης τους. Άλλες τοξικές ενώσεις που απελευθερώνονται είναι το μονοξείδιο του άνθρακα , τα οξείδια του αζώτου, του θείου καθώς και αιωρούμενα σωματίδια.

Η αιθανόλη είναι ένα καύσιμο υψηλού αριθμού οκτανίων (περίπου 113) και με υψηλή περιεκτικότητα σε οξυγόνο (περίπου 35% κ.β). Έτσι αυτοαναφλέγεται σε πολύ μεγαλύτερη συμπίεση από την βενζίνη επιτρέποντας στους κινητήρες να αποδίδουν πολύ μεγαλύτερη ισχύ. Μπορεί επομένως να χρησιμοποιηθεί και ως πρόσθετο αύξησης του αριθμού οκτανίων της βενζίνης. Με την ανάμιξή της με βενζίνη επιτυγχάνεται επίσης και ο εμπλουτισμός του καυσίμου μίγματος σε οξυγόνο, με αποτέλεσμα να επιτυγχάνεται μια πιο ολοκληρωμένη καύση και κατά συνέπεια μειωμένες εκπομπές επικίνδυνων καυσαερίων. Η συνεισφορά της στο σχηματισμό οξειδίων του αζώτου είναι ασήμαντη. Από την άλλη, η προσθήκη αιθανόλης, έχει ως αποτέλεσμα την αύξηση των πτητικών οργανικών ρύπων καθώς και τον σχηματισμό μεγαλύτερων αλδεϋδών. Το πρόβλημα όμως αυτό αντιμετωπίζεται από τους τριοδικούς καταλύτες που διαθέτουν τα σύγχρονα οχήματα.

Έτσι, στην Ευρώπη έχει δρομολογηθεί η υποχρεωτική χρήση βιοκαυσίμων στα καύσιμα κίνησης σε ποσοστό τουλάχιστον 20% έως το 2012. Στα ποσοστά αυτά το βιοντίζελ θα υποκαταστήσει το συμβατικό ντίζελ, ενώ η βιοαιθανόλη τη βενζίνη. Με αφορμή τη σχετική οδηγία της ΕΕ για την προώθηση των βιοκασίμων στις μεταφορές, ανοίγεται ένα μεγάλο πεδίο επιχειρηματικής δράσης που μπορεί να προσφέρει μεγάλη προστιθέμενη αξία στη γη και την εργασία του

Έλληνα αγρότη. Στην παραγωγή βιοκαυσίμων από ειδικές καλλιέργειες φυτών μπορεί να βασιστεί το μέλλον της ελληνικής γεωργίας, Η νέα τάση που καθοδηγεί την ελληνική γεωργία είναι οι ενεργειακές καλλιέργειες που μπορούν να χρησιμοποιηθούν για την παραγωγή βιοκαυσίμων. Κατά συνέπεια, οι παραδοσιακές καλλιέργειες μπορούν να μετατραπούν σε ενεργειακές. Για την παραγωγή βιοαιθανόλης, σημαντικό ρόλο αναμένεται να παίξει το γλυκό σόργο, που έχει υψηλότερη στρεμματική απόδοση σε βιοαιθανόλη από τα σακχαρότευτλα, ενώ μετά από δοκιμαστικές καλλιέργειες δείχνει να ευδοκιμεί στην Ελλάδα επιτυγχάνοντας υψηλές αποδόσεις. Είναι προφανώς επιθυμητό, τα βιοκαύσιμα που θα διακινηθούν στην ελληνική αγορά να προέρχονται όχι απλώς από εγχώρια εργοστάσια αλλά και τα εργοστάσια αυτά να χρησιμοποιούν εγχώρια πρώτη ύλη. [Χριστακόπουλος Π., Τόπακας Ε., 2011]

Η συνθετική ***αιθανόλη*** *παράγεται μέσω της καταλυτικής ενυδάτωσης (hydration) του αιθυλενίου, παράγωγου του πετρελαίου, σύμφωνα με την αντίδραση:*

$C_2H_4 + H_20 \rightarrow C_2H_5OH$

αιθυλένιο νερό (ατμός) αιθανόλη

Η ***βιοαιθανόλη*** *μπορεί να παραχθεί από πλήθος υδατανθράκων (με γενικό μοριακό τύπο: $(CH_2O)_n$). Για την αξιοποίηση της σακχαρόζης ως υπόστρωμα για την παραγωγή αιθανόλης, αυτή θα πρέπει πρώτα να υδρολυθεί σε μονομερή σάκχαρα (γλυκόζη και φρουκτόζη) με την βοήθεια του ενζύμου της ινβερτάσης.*

$C_{12}H_{22}O_{11} \rightarrow C_6H_{12}O_6 + C_6H_{12}O_6$

σακχαρόζη γλυκόζη φρουκτόζη

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

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

γλυκόζη (φρουκτόζη) αιθανόλη διοξείδιο του άνθρακα

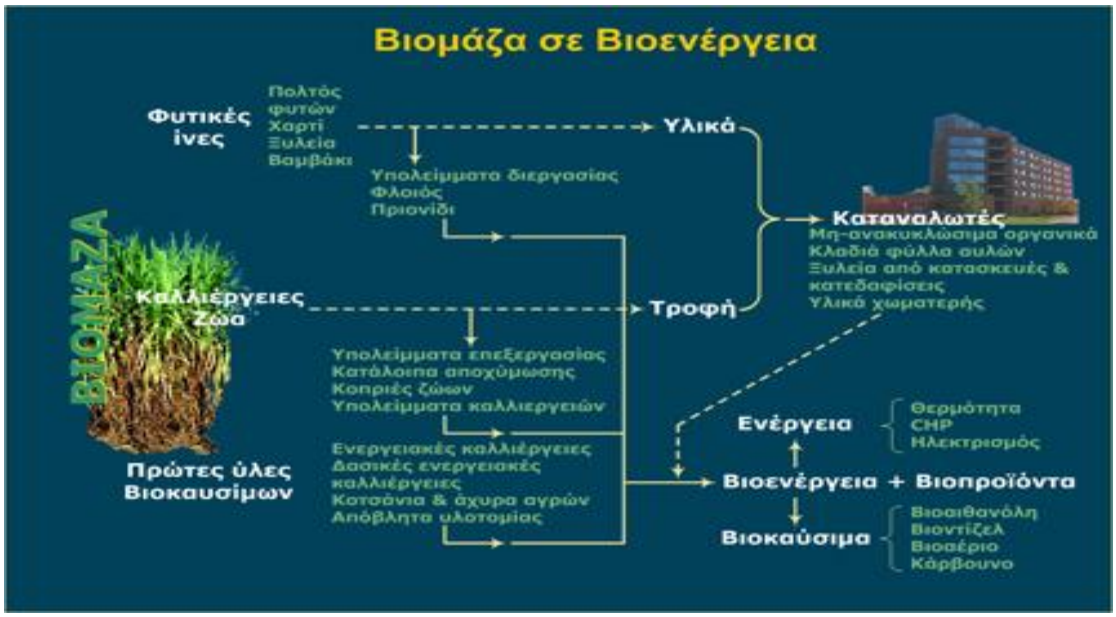
*Επίσης, το **άμυλο** μπορεί να μετατραπεί σε D-γλυκόζη, με τη βοήθεια του ενζύμου γλυκοαμυλάση. Αυτή η **ενζυμική υδρόλυση** ακολουθείται, στη συνέχεια, από τη ζύμωση, την απόσταξη και την αφυδάτωση με σκοπό την παραγωγή άνυδρης βιοαιθανόλης. Το καλαμπόκι, το οποίο περιέχει άμυλο σε ποσοστό 60-70%,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

*Οι υδατάνθρακες (κυτταρίνη και ημικυτταρίνη) που βρίσκονται σε λιγνοκυτταρινούχα υλικά μπορούν να μετατραπούν σε **βιοαιθανόλη**, αφού πρώτα υδρολυθούν σε μονομερή σάκχαρα. Η υδρόλυσή τους πραγματοποιείται με την χρήση εξαιδικευμένων ενζύμων, γνωστών και ως κυτταρινάσες. Παλαιότερα, για την μετατροπή της λιγνινοκυτταρινούχου βιομάζας σε μονομερή σάκχαρα χρησιμοποιούνταν και η όξινη υδρόλυση σε διαλύματα πυκνού οξέος (π.χ θειικό οξύ), το οποίο πλέον τείνει να εγκαταλειφθεί τελείως λόγω των προβλημάτων που δημιουργεί στον εξοπλισμό, καθώς επίσης, και των περιβαλλοντικών ζητημάτων που εγείρει, καθώς τα απόβλητα που δημιουργούνται , θα πρέπει να κατεργαστούν για να αποτοξικοποιηθούν. Για να διευκολυνθεί η ενζυμική υδρόλυση της λιγνινοκυτταρινούχου βιομάζας, ένα στάδιο προκατεργασίας του υλικού πρέπει να συμπεριληφθεί. Έχουν εφαρμοσθεί διάφορες μέθοδοι κατεργασίας (για παράδειγμα υδροθερμική κατεργασία, κατεργασία σε ιονικά υγρά, σε οργανικούς διαλύτες κτλ), με ποικίλα αποτελέσματα.*

Εικόνα 1: Βιοαιθανόλη

1.3 ΦΥΤΙΚΗ ΒΙΟΜΑΖΑ: ΠΡΩΤΗ ΥΛΗ ΓΙΑ ΤΗΝ ΠΑΡΑΓΩΓΗ ΒΙΟΚΑΥΣΙΜΩΝ

Οι δυνατές πηγές βιομάζας που μπορεί να χρησιμοποιηθούν για την παραγωγή αιθανόλης, είναι διάφορα δασικά κατάλοιπα, υπολείμματα καλλιέργειας των δασών (κλαδεμάτων, υλοτομίας), προϊόντα καθαρισμών, υπολείμματα επεξεργασίας του ξύλου, υπολείμματα γεωργικών καλλιεργειών, όπως στελέχη, κλαδιά, φύλλα, άχυρο, κλαδοδέματα, επεξεργασίας γεωργικών προϊόντων, όπως υπολείμματα εκκοκκισμού βαμβακιού, πυρηνόξυλο, πυρήνες φρούτων και τέλος διάφορα ενεργειακά φυτά που διακρίνονται σε σακχαρούχα φυτά, όπως σακχαροκάλαμο, σακχαρότευτλο, σόργο), αμυλούχα φυτά (σπόροι σιτηρών), καθώς και ενεργειακά φυτά λιγνινοκυτταρινούχου σύστασης, όπως ευκάλυπτος, ψευδακακκία, βαγάσση, κενάφ, ινώδες σόργο, μίσχανθος, αγριαγκινάρα, καλάμι κ.ά.



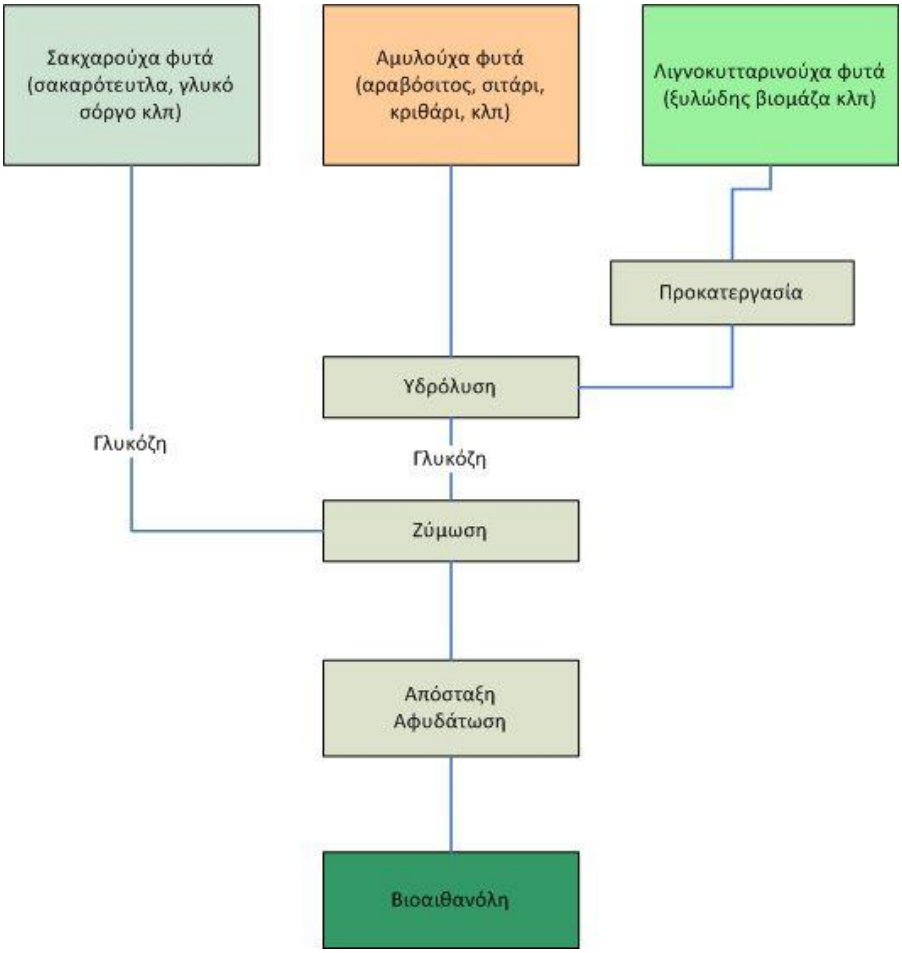
Εικόνα 2: μετατροπή βιομάζας σε βιοκαύσιμα

Ανάλογα με την πηγή της βιομάζας διαφοροποιείται και η ακολουθούμενη διεργασία για την παραγωγή αιθανόλης. Έτσι, όταν η πρώτη ύλη είναι ενεργειακά φυτά σακχαρούχου σύστασης, αυτά υπόκεινται μετά από κατάλληλη προκατεργασία σε άμεση ζύμωση για την παραγωγή αιθανόλης μιας και ο κύριος βιομηχανικός αιθανολοπαραγωγός μικροοργανισμός που είναι η ζύμη Saccharomyces cerevisiae, έχει τη δυνατότητα να παράγει το ένζυμο που υδρολύει την σακχαρόζη σε γλυκόζη και φρουκτόζη, τα οποία και μετατρέπει σε αιθανόλη.

Όταν η πρώτη ύλη είναι ενεργειακά φυτά αμυλούχου σύστασης, απαιτείται πριν από τη ζύμωση για την παραγωγή αιθανόλης, ένα στάδιο υδρόλυσης με την χρήση αμυλασών μιας και η προαναφερθείσα ζύμη δεν έχει τη δυνατότητα παραγωγής των ενζύμων αυτών.

Τέλος, όταν η πηγή της βιομάζας είναι διάφορα δασικά κατάλοιπα λιγνινοκυτταρινούχου σύστασης, απαιτείται ένα στάδιο φυσικοχημικής και ενζυμικής προκατεργασίας, το οποίο κρίνεται απαραίτητο για την μετατροπή της λιγνινοκυτταρινούχου βιομάζας σε γλυκόζη που ζυμώνεται άμεσα από την ζύμη S. cerevisiae σε αιθανόλη.

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: Διεργασίες παραγωγής αιθανόλης από διάφορες πηγές βιομάζας

Όσον αφορά, τις λιγνινοκυτταρινούχες πηγές βιομάζας, διακρίνονται σε αγροτικά παραπροϊόντα και λιγνινοκυτταρινούχα ενεργειακά φυτά. Τα κύρια αγροτικά παραπροϊόντα που μπορεί να χρησιμοποιηθούν σαν πρώτη ύλη για την

παραγωγή βιοαιθανόλης είναι το άχυρο σίτου, με ετήσιο δυναμικό παραγωγής 150 εκ. τόνους στην Ευρώπη, το άχυρο ρυζιού, με ετήσιο δυναμικό 660 εκ. τόνους στην Ασία, τα στελέχη αραβοσίτου, με ετήσιο δυναμικό 20 εκ. τόνους στην Ευρώπη και η βαγάσση των σακχαροκάλαμων με ετήσιο δυναμικό παραγωγής 60 εκ. τόνους στην Ασία και 80 εκ. τόνους στην Ν. Αμερική.

1.3.1 Βαγάσση Γλυκού Σόργου

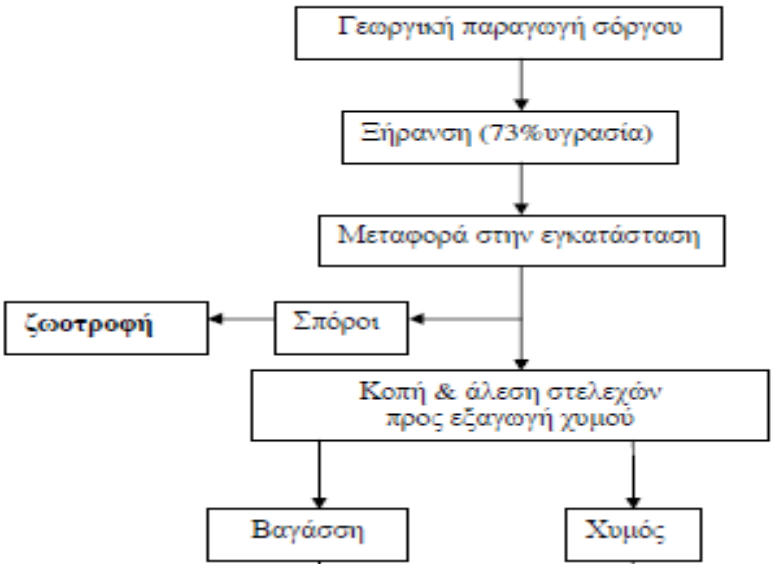
Το γλυκό σόργο (Sorgum bicolor (L.) Moench) αποτελεί ένα από τα πλέον υποσχόμενα καλλιεργούμενα ενεργειακά είδη. Είναι μονοετές φυτό (συγκεκριμένα η διάρκεια καλλιέργειάς του είναι 3-5 μήνες) με υψηλή φωτοσυνθετική ικανότητα, υψηλές αποδόσεις σε βιομάζα και υψηλό ποσοστό σε διαλυτά σάκχαρα (γλυκόζη, φρουκτόζη και σακχαρόζη), καθώς και σε αδιάλυτα (κυτταρίνη και ημικυτταρίνη). Η περιεκτικότητά του σε διαλυτά σάκχαρα είναι 15-23%, σε χυμό 48-50% και σε σάκχαρα 14-20%. Σημαντικό πλεονέκτημά του είναι ότι μπορεί να παράξει σημαντικές ποσότητες βιομάζας ακόμη και σε συνθήκες μειωμένων εισροών (ύδρευσης, λίπανσης, ζιζανιοκτονίας). Το γλυκό σόργο έχει πολλές εφαρμογές. Ο καρπός του μπορεί να χρησιμοποιηθεί ως τροφή (π.χ σιρόπι) είτε ως ζωοτροφή, τα στελέχη του χρησιμοποιούνται για την παραγωγή ζάχαρης ή αιθανόλης, ενώ το υπόλειμμα των στελεχών μπορεί να χρησιμοποιηθεί είτε ως στερεό καύσιμο είτε ως ζωοτροφή με πολύ υψηλή θρεπτική αξία, ενώ μπορεί ακόμη και να αντικαταστήσει το ξύλο ως δομικό υλικό. Αν και το γλυκό σόργο προέρχεται από τη Δ. Αφρική, απαντάται σε περιοχές με υποτροπικό έως εύκρατο κλίμα. Αναπτύσσεται σε όλους τους τύπους εδαφών, εύφορα και υποβαθμισμένα, και η προσαρμογή του στα μεσογειακά οικοσυστήματα της Νότιας Ευρώπης είναι πολύ καλή. Αυτό σημαίνει ότι υπάρχει η δυνατότητα καλλιέργειας του στην Ελλάδα γεγονός απαραίτητο για την συνέχιση της εργασίας αυτής. [Limberopoulou E.,2009]

Η καλλιέργεια του γλυκού σόργου έχει αξιολογηθεί ως μία από τις πιο δυναμικές ενεργειακές καλλιέργειες για την παραγωγή βιοαιθανόλης.

	Απόδοση (kg χλωρό/στρ)	Απόδοση σε βιοαιθανόλη (kg/στρ)	Απόδοση σε βιοαιθανόλη (L/στρ)
Γλυκό σόργο	7.000-10.000	474-711	600-900

Πίνακας 1: αποδόσεις καλλιέργειας γλυκού σόργου ανά στρέμμα

Το γλυκό σόργο θεωρείται εξαιρετική πρώτη ύλη για την παραγωγή βιοαιθανόλης, κυρίως λόγω των υψηλών αποδόσεών του σε βιομάζα και του υψηλού ποσοστού σε άμεσα ζυμώσιμων σακχάρων του χυμού του. Το στερεό υπόλειμμα της εκχύλισης των σακχάρων του, η βαγάσση σόργου, είναι πλούσιο σε κυτταρίνη και ημικυτταρίνη. Για την ενζυμική υδρόλυση της βαγάσσης έχουν χρησιμοποιηθεί τόσο εμπορικά διαθέσιμα ενζυμικά σκευάσματ προερχόμενα από τον μεσόφιλο μύκητα Trichoderma reesei, όσο και το ενζυμικό σύστημα των μεσόφιλων μυκήτων Fusarium oxysporum και Neurospora crassa. Οι δύο τελευταίοι διαθέτουν την ικανότητα να παράγουν ταυτόχρονα και αιθανόλη. Εν τούτοις, δεν υπάρχουν αναφορές όπου γίνεται χρήση θερμοάντοχου ενζυμικού συστήματος για την υδρόλυση της βαγάσσης. [Limberopoulou E.,2009]



Εικόνα 4: διεργασία παραγωγής βαγάσσης από γλυκό σόργο

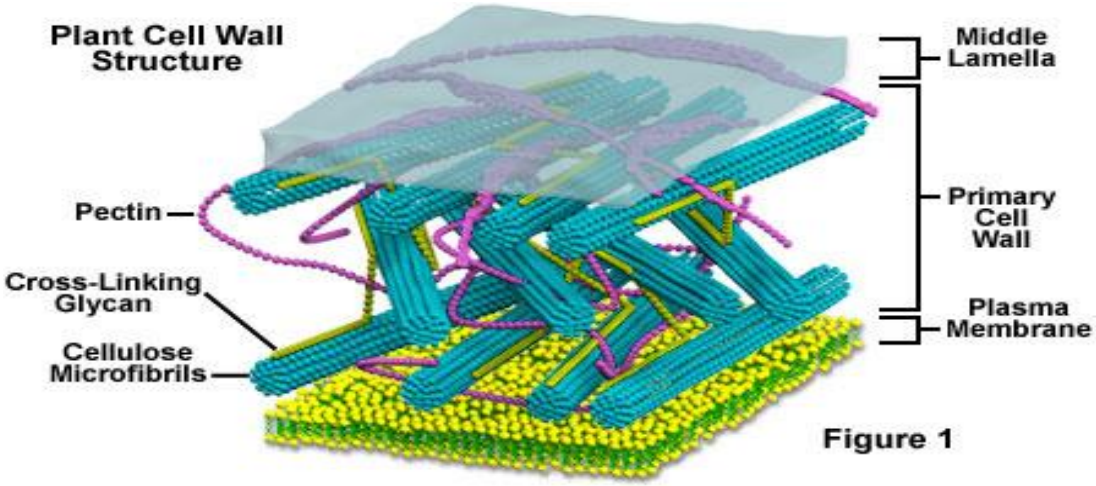
Εικόνα 5: πορεία επεξεργασίας βαγάσσης (ενεργειακά φυτά- γλυκό σόργο, βαγάσση, προκατεργασμένη βαγάσση στο εργαστήριο)

1.4 ΣΥΣΤΑΣΗ ΛΙΓΝΙΝΟΚΥΤΤΑΡΙΝΟΥΧΟΥ ΒΙΟΜΑΖΑΣ

Λιγνινοκυτταρίνη είναι ένας γενικός όρος που περιγράφει σαν σύνολο τα κύρια συστατικά των κυτταρικών τοιχωμάτων των φυτών που είναι: η κυτταρίνη, η ημικυτταρίνη και η λιγνίνη. Η κυτταρίνη είναι ένας πολυσακχαρίτης της γλυκόζης, οι ημικυτταρίνες είναι πολυσακχαρίτες που ο σκελετός τους αποτελείται από διαφορετικές εξόζες (γλυκόζη, μαννόζη, γαλακτόζη) και πεντόζες (ξυλόζη, αραβινόζη) και η λιγνίνη ένα πολύπλοκο δίκτυο από διαφορετικές μονάδες φαινυλοπροπανίου.

Το κυτταρικό τοίχωμα των φυτικών κυττάρων αποτελείται κατά κύριο λόγο από μικροϊνίδια κυτταρίνης που ενσωματώνονται μέσα σε μια μάζα από πρωτεΐνες και άλλους πολυσακχαρίτες όπως είναι οι ημικυτταρίνες. Παράλληλα, δύο γειτονικά φυτικά κύτταρα, δημιουργούν λεπτά και ευλύγιστα τοιχώματα, τα πρωτογενή κυτταρικά τοιχώματα που αποτελούνται από κυτταρίνη και ημικυτταρίνη. Ορισμένα, όμως, κύτταρα δημιουργούν ένα δευτερογενές κυτταρικό τοίχωμα που αποτελείται από λιγνίνη, μεταξύ της κυτταρικής μεμβράνης και του πρωτογενούς τοιχώματος, που ισχυροποιεί επιπρόσθετα τη μηχανική υποστήριξη του φυτού. Γενικά, η κυτταρίνη προσδίδει την ακαμψία στους φυτικούς ιστούς, η

ημικυτταρίνη παρέχει το υλικό επικόλλησης, δηλαδή τους πολυσακχαρίτες, ενώ την κόλλα αποτελεί η λιγνίνη. Γενικά, η κυτταρίνη προσδίδει υψηλή αντοχή σε εφελκυσμό, ενώ οι ημικυτταρίνες και η λιγνίνη προσδίδουν αντοχή σε κάμψη, θλίψη και κρούση.

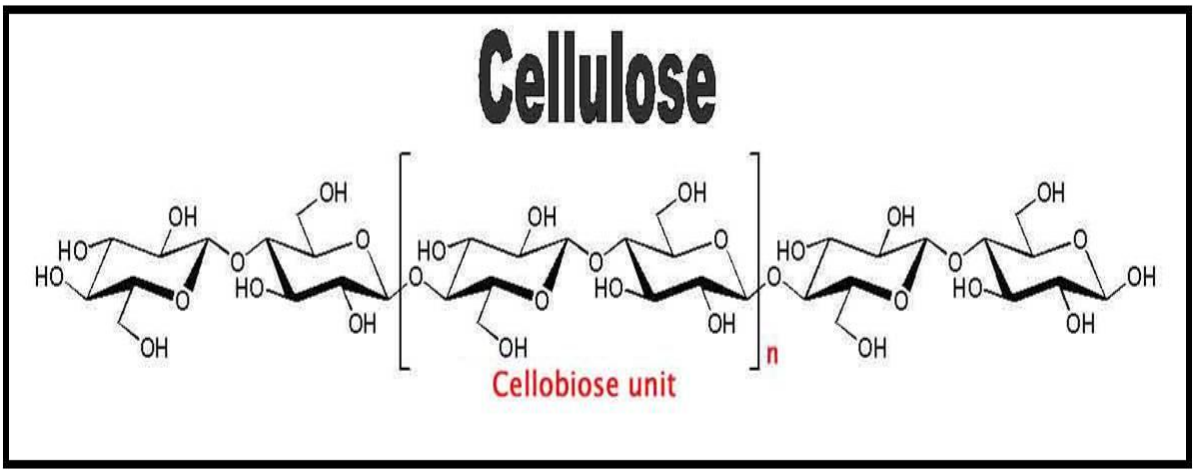


Εικόνα 6: Δομή πρωτογενούς φυτικού κυτταρικού τοιχώματος

1.4.1 ΚΥΤΤΑΡΙΝΗ

Η κυτταρίνη αποτελεί το σημαντικότερο συστατικό των πολυσακχαριτών των κυτταρικών τοιχωμάτων. Αποτελείται από ένα γραμμικό πολυμερές μονάδων D-γλυκόζης, συνδεδεμένων μεταξύ τους με β-1,4 γλυκοζιτικό δεσμό. Λόγω του δεσμού αυτού, ο δισακχαρίτης κελλοβιόζη αποτελεί την επαναλαμβανόμενη δομική μονάδα της αλυσίδας της κυτταρίνης. Ο βαθμός πολυμερισμού της κυτταρίνης έχει ένα εύρος από 7000 έως 15000 μονάδες γλυκόζης. Τα πολυμερή κυτταρίνης παρουσιάζονται ως διατεταγμένες δομές (μικροϊνίδια) και η κύρια λειτουργία τους είναι να εξασφαλίσουν την ακαμψία του κυτταρικού τοιχώματος των φυτών. Τα μικροϊνίδια έχουν διάμετρο 2-20nm και μήκος 100-40000nm και το καθένα περιέχει μέχρι 36 αλυσίδες κυτταρίνης. Η κυτταρίνη είναι ένας αδιάλυτος πολυσακχαρίτης που σχηματίζει κρυσταλλικές περιοχές. Αυτές σχηματίζονται από τους δεσμούς υδρογόνου μεταξύ των μορίων γλυκόζης της

ίδιας αλυσίδας κυτταρίνης καθώς και τους δεσμούς υδρογόνου που σχηματίζονται μεταξύ μορίων γλυκόζης που ανήκουν σε διαφορετικές αλυσίδες κυτταρίνης. Ένα μέρος της κυτταρίνης είναι άμορφο και παρεμβάλλεται μεταξύ των κρυσταλλικών περιοχών. Οι δεσμοί υδρογόνου διευθετούν τις αλυσίδες της κυτταρίνης σε παράλληλη επίπεδη διάταξη προκαλώντας ταυτόχρονα και το σχηματισμό δεσμών υδρογόνου μεταξύ των παράλληλων αυτών επιπέδων, δημιουργώντας έτσι συμπαγείς και δύσκολα αποικοδομήσιμες κρυσταλλικές περιοχές. Οι κρυσταλλικές περιοχές της κυτταρίνης έχουν έναν βαθμό κρυσταλλικότητας περίπου 70% ως προς το συνολικό πολυμερές. Οι άμορφες περιοχές είναι πολύ υγροσκοπικές. Τέλος, η κυτταρίνη διογκώνεται και διαλύεται πλήρως από θειικό οξύ (H_2SO_4), υδροχλωρικό οξύ (HCl) και φωσφορικό οξύ (H_3PO_4).



Εικόνα 7: δομική μονάδα κυτταρίνης

1.4.2 ΗΜΙΚΥΤΤΑΡΙΝΗ

Υπάρχουν πολλοί και διαφορετικοί τύποι ημικυτταρινών, τις οποίες μπορούμε να τις ορίσουμε σαν το μίγμα συμπολυμερών ουσιών που μαζί με την κυτταρίνη και τη λιγνίνη συγκροτούν τα κυτταρικά τοιχώματα των ξύλινων ιστών. Είναι άμορφες (όχι κρυσταλλικές), έχουν χαμηλό βαθμό πολυμερισμού (150-300), είναι έντονα υγροσκοπικές και παρουσιάζουν υψηλή χημική δραστικότητα.

Πιο αναλυτικά, η ημικυτταρίνη είναι ένα πλέγμα διασταυρωμένων φυτικών μη-κυτταρινικών πολυσακχαριτών, οι οποίοι αποτελούνται από πεντόζες όπως D-ξυλόζη, L-αραβινόζη, L-ραμνόζη και L-φρουκτόζη, από εξόζες όπως D-μαννόζη, D-γλυκόζη, D-γαλακτόζη και ουρονικά οξέα όπως D-γλυκουρονικό οξύ, D-4-O-μέθυλ-γλυκουρονικό οξύ και D-γαλακτουρονικό οξύ. Η κατηγοριοποίηση των ημικυτταρινών συνήθως γίνεται με βάση το κυριότερο μονομερές σάκχαρο. Έτσι, οι ημικυτταρίνες διακρίνονται σε γλυκάνες, μαννάνες, αραβινάνες, γαλακτάνες και ξυλάνες. Στη φύση, οι ημικυτταρίνες σπάνια αποτελούνται από ένα μόνο τύπο μονοσακχαρίτη. Συνήθως, έχουν μια πολύπλοκη δομή που περιλαμβάνει πάνω από ένα τύπο πολυσακχαριτών, όπως η γλυκουρονοξυλάνη (ξυλόζη και ουρονικό οξύ), η αραβινογλυκουροξυλάνη (αραβινόζη, ξυλόζη και ουρονικό οξύ), η γλυκομαννάνη (ετεροπολυμερές της γλυκόζης και μαννόζης), η αραβινογαλακτάνη (ετεροπολυμερές της αραβινόζης και γαλακτόζης), η ξυλογλυκάνη (ετεροπολυμερές ξυλόζης και γλυκόζης) και η γαλακτογλυκομαννάνη (ετεροπολυμερές γαλακτόζης, γλυκόζης και μαννόζης).

Η ξυλάνη αποτελεί το κυριότερο συστατικό της ημικυτταρίνης και αποτελεί κιόλας το δεύτερο πιο άφθονο πολυσακχαρίτη στη φύση μετά την κυτταρίνη. Περίπου το ένα τρίτο της ανανεώσιμης πηγής άνθρακα στον πλανήτη βρίσκεται στη μορφή της ξυλάνης. Βρίσκεται στα ξύλα των φυλλοβόλων δέντρων (αγγειόσπερμα) σε μεγάλη περιεκτικότητα 15-30% και στα ξύλα των κωνοφόρων (γυμνόσπερμα) σε περιεκτικότητα 7-12%. Εντοπίζεται κυρίως στην ενδιάμεση περιοχή ανάμεσα στην κυτταρίνη και τη λιγνίνη των δευτεροταγών κυτταρικών τοιχωμάτων των φυτών, και περιέχεται και στα πρωτοταγή κυτταρικά τους τοιχώματα, κυρίως στα μονοκοτυλήδονα.

Ανεξάρτητα, από το είδος του κυτταρικού τοιχώματος στο οποίο βρίσκεται η ξυλάνη αλληλεπιδρά με τα άλλα δομικά συστατικά του και συγκεκριμένα με μικροϊνίδια κυτταρίνης, πρωτεΐνες, πηκτίνη, με άλλα κυτταρινικά πολυμερή και τις περισσότερες φορές με λιγνίνη. Συνήθως, συνδέεται με ομοιοπολικούς δεσμούς με τη λιγνίνη μέσω φαινολικών οξέων και με μη ομοιοπολικούς δεσμούς (δεσμούς

υδρογόνου) με τους άλλους πολυσακχαρίτες. Οι ξυλάνες ουσιαστικά λειτουργούν ως συνδετικός ιστός ανάμεσα στην κυτταρίνη και τη λιγνίνη ώστε να εξασφαλιστεί η συνεκτικότητα και η ακεραιότητα των κυτταρικών τοιχωμάτων.

Η ξυλάνη αποτελείται από μια κεντρική αλυσίδα μορίων D-ξυλοπυρανόζης ενωμένων μεταξύ τους με β-1,4-γλυκοζιτικούς δεσμούς. Σε αντίθεση με την κυτταρίνη, η δομή της ξυλάνης έχει εξαιρετική ποικιλομορφία και εξαρτάται από την πηγή προέλευσής της. Η δομή της μπορεί να είναι από μια απλή σχεδόν γραμμική, μη υποκατεστημένη αλυσίδα, όπως, σε μερικά ποώδη φυτά μέχρι ένα πολύπλοκο σύμπλεγμα ετεροπολυσακχαριτών με πολύ υψηλό βαθμό διακλαδώσεων, όπως αυτή που περιέχεται στους σπόρους των δημητριακών.

Υπάρχουν διάφορα είδη ξυλανών. Ο βαθμός πολυμερισμού της ξυλάνης κυμαίνεται από 150 έως 200 ξυλόζες στα φυλλοβόλα δέντρα και από 70 έως 130 στα κωνοφόρα. Οι ξυλάνες μπορούν να κατηγοριοποιηθούν με βάση τη φύση των υποκαταστατών της κύριας αλυσίδας, σε πέντε οικογένειες, τις ομοξυλάνες, τις γλυκουρονοξυλάνες, τις αραβινοξυλάνες, τις αραβινογλυκουρονοξυλάνες και τις γλυκουρονοαραβινοξυλάνες.

Συγκεκριμένα, για την κάθε ομάδα, η οικογένεια των γραμμικών ομοξυλανών δεν περιλαμβάνει υποκαταστάτες στην κύρια αλυσίδα. Γραμμικές ομοξυλάνες ενωμένες με β-1,3-γλυκοζιδικούς δεσμούς περιέχονται στα κυτταρικά τοιχώματα πράσινων φυκών. Στην οικογένεια των αραβινοξυλανών η κύρια αλυσίδα αποτελείται από μονάδες β-1,4-D-ξυλοπυρανόζης και είναι υποκατεστημένη μόνο με α-L-αραβινοφουρανοζυλικές ομάδες. Οι αραβινοξυλάνες αποτελούν την κύρια ξυλάνη των δημητριακών. Έχουν βρεθεί σε σιτάρι, σίκαλη, κριθάρι, βρώμη, ρύζι, σόργο, καθώς επίσης και σε μερικά άλλα φυτά όπως χλόη, pangola, βλαστούς μπαμπού και χλόη σίκαλης. Η οικογένεια των γλυκουρονοξυλανών φέρει ως υποκαταστάτες το α-D-γλυκουρονικό οξύ και το 4-O-μεθυλο-αιθερικό παράγωγό του, στις θέσεις 2 ή 3 των ξυλοπυρανοζών της κεντρικής αλυσίδας, Τέλος, η οικογένεια των γλυκουρονοαραβινοξυλανών, που συνήθως απαντάται στα

κωνοφόρα, έχει παρόμοια δομή με την γλυκουρονοξυλάνη, αλλά ανά δέκα ξυλοπυρανόζες έχει μια υποκατάσταση α-L-αραβινοφουρανόζης μέσω α-1,3-γλυκοζιτικού δεσμού. Αυτές οι ξυλάνες δεν είναι ακετυλιωμένες εξαιτίας της φουρανοζικής δομής τους οι πλευρικές αλυσίδες της αραβινόζης υδρολύονται εύκολα από τα οξέα.

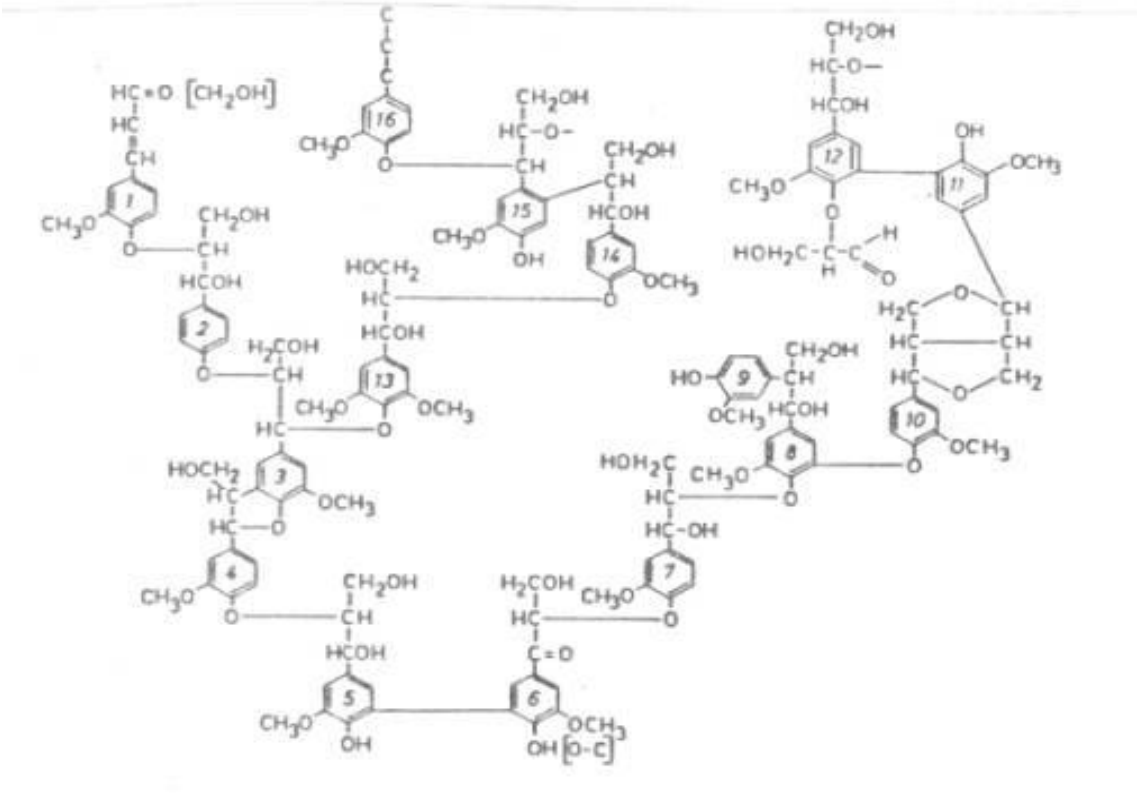
Η οικογένεια των αραβινογλυκουρονοξυλανών διαφέρει από την οικογένεια των γλυκουρονοαραβινοξυλανών μόνο στο ότι οι αραβινοφουρανοζικοί υποκαταστάτες είναι σημαντικά περισσότεροι από τους υποκαταστάτες των ουρονικών οξέων. Αυτός ο τύπος της ξυλάνης απαντάται στα κωνοφόρα και στους λιγνινοκυτταρικούς ιστούς των χόρτων και των μονοετών φυτών. Οι ξυλάνες των ποωδών φυτών περιέχουν μικρότερα ποσοστά ουρονικών οξέων, αλλά ο βαθμός υποκατάστασης τους με μόριο αραβινοφουρανοζών είναι μεγαλύτερος. [Χριστακόπουλος Π., Τόπακας Ε., 2011]

1.4.3 ΛΙΓΝΙΝΗ

Η λιγνίνη είναι ένα από τα σπουδαιότερα και πιο άφθονα συστατικά της φυτικής βιομάζας. Η παρουσία της στη φύση είναι στενά συνδεδεμένη με την κυτταρίνη. Δεν βρίσκεται όμως σε όλα τα φυτικά είδη (βρύα, λειχήνες, φύκη). Το ποσοστό της στα είδη ξύλου ποικίλλει (17-35%), ωστόσο, σε ξύλο κωνοφόρων υπάρχει κατά κανόνα περίπου 20-30% περισσότερη λιγνίνη από ότι σε ξύλο πλατύφυλλων.

Είναι άμορφη και έχει πολύ υψηλό βαθμό πολυμερισμού (100.000-300.000). Είναι πολύπλοκο τρισδιάστατο πολυμερές με βασική δομική μονάδα το φαινυλοπροπάνιο. Στη λιγνίνη υπάρχουν τρία διαφορετικά φαινυλοπροπάνια και αυτό κάνει τη χημική διαφορά μεταξύ των κωνοφόρων και πλατύφυλλων. Επίσης, να τονισθεί ότι είναι έντονα υδρόφοβη ουσία αδιάλυτη στο νερό. Οι δεσμοί στη λιγνίνη είναι αιθερικοί δεσμοί καθώς και δεσμοί άνθρακα-άνθρακα. Η λιγνίνη ενώνεται με χημικούς δεσμούς και με τις ημικυτταρίνες και με την κυτταρίνη. Η διόγκωσή της είναι χαμηλή. Υδρολύεται δύσκολα κυρίως με

αλκαλικά διαλύματα σε υψηλές θερμοκρασίες (150-180°C). Τέλος, πρέπει να σημειωθεί ότι η λιγνίνη προσδίδει υψηλή αντοχή σε κάμψη, θλίψη και κρούση.



Εικόνα 8: Μοντέλο λιγνίνης

Πίνακας 2: Περιεκτικότητα σακχάρων στο κλάσμα των υδατανθράκων της φυτικής ύλης (% κ.β.)

Σάκχαρα	*Μαλακά ξύλα*	*Σκληρά ξύλα*
Γλυκόζη	*61-65*	*55-73*
Ξυλόζη	*9-13*	*20-39*
Μανόζη	*7-16*	*0,4-4*
Γαλακτόζη	*6-17*	*1-4*
Αραβινόζη	*<3,5*	*<1*

[Πηγή: A. Demirbas (2008)]

1.5 ΠΑΡΑΓΩΓΗ ΑΙΘΑΝΟΛΗΣ ΑΠΟ ΛΙΓΝΙΝΟΚΥΤΤΑΡΙΝΟΥΧΟ ΒΙΟΜΑΖΑ

Οι μελέτες για την παραγωγή αιθανόλης έδειξαν ότι είναι σαφώς περισσότερο προσοδοφόρο να γίνεται κυρίως από την λιγνινοκυτταρινούχο βιομάζα. Αυτό μπορεί να επιτευχθεί με δύο τρόπους: με την υδρόλυση της βιομάζας και την μετέπειτα βιομετατροπή της σε αιθανόλη ή δεύτερου με τη θερμοχημική της κατεργασία. Όσον αφορά την υδρόλυση της λιγνινοκυτταρινούχου βιομάζας για την παραγωγή αιθανόλης έχουν προταθεί δύο πιο δημοφιλείς διεργασίες. Αυτές είναι η όξινη υδρόλυση και η ενζυμική υδρόλυση.

Η όξινη υδρόλυση μπορεί να πραγματοποιηθεί με τη χρήση χαμηλών συγκεντρώσεων οξέων (<1%), η οποία όμως απαιτεί και την χρησιμοποίηση υψηλών θερμοκρασιών (180-230°C) και πιέσεων που εφαρμόζονται για ένα σύντομο χρονικό διάστημα μερικών δευτερολέπτων έως λίγων λεπτών. Συνήθως για την διεργασία της όξινης υδρόλυσης χρησιμοποιείται το θειικό οξύ, λόγω της χαμηλότερης τιμής και των λιγότερων προβλημάτων διάβρωσης που παρουσιάζει σε σχέση με άλλα οξέα, όπως το υδροχλωρικό οξύ. Για παράδειγμα, μπορούμε να αναφέρουμε ότι με χρήση 1% θειικού οξέος σε αντιδραστήρα συνεχούς ροής με χρόνο παραμονής 0,22min και θερμοκρασία 237°C επιτυγχάνεται μετατροπή καθαρής κυτταρίνης σε 50% σάκχαρα.

Μειονέκτημα της μεθόδου αυτής αποτελεί το γεγονός της καταστροφής του μεγαλύτερου μέρους των πεντοζών που προέρχονται από την ημικυτταρίνη καθώς και ενός μέρους των εξοζών που προέρχονται από την κυτταρίνη λόγω της εφαρμογής υψηλών θερμοκρασιών. Επίσης, παράγονται και παρεμποδιστές που αναστέλλουν την μικροβιακή ανάπτυξη των μικροοργανισμών της ζύμωσης, καθώς και την δράση των ενζύμων που μπορεί να χρησιμοποιηθούν σαν μέρος της προκατεργασίας.

Ωστόσο, σήμερα η υδρόλυση της λιγνινοκυτταρινούχου βιομάζας χρησιμοποιεί 30-40% θειικό οξύ σε ήπιες θερμοκρασίες (30-35°C) και κανονικές πιέσεις για

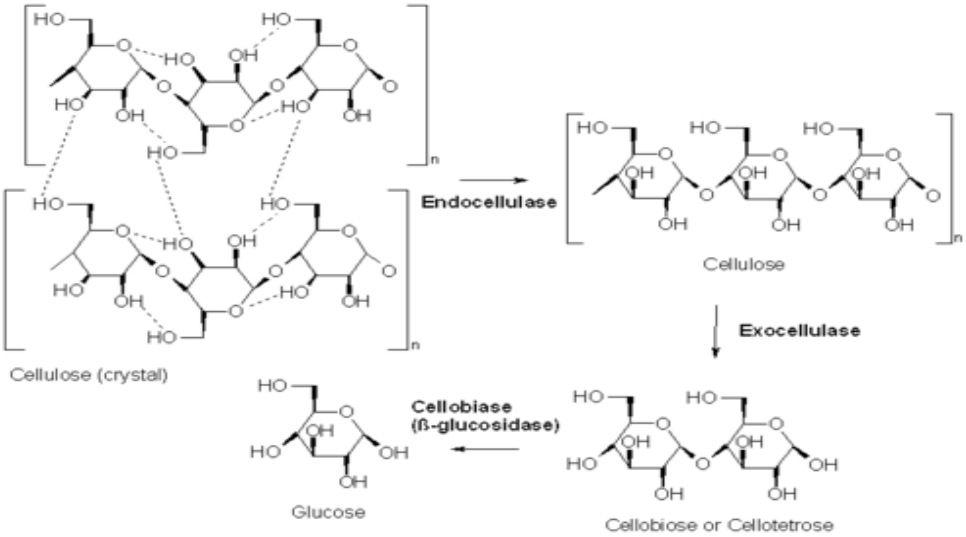
μερικές ώρες. Η διεργασία αυτή έχει σαν αποτέλεσμα την ανάκτηση του 85-90% του συνόλου των εξοζών και πεντοζών με τη ταυτόχρονη παραγωγή ελάχιστων παρεμποδιστών. Το μεγάλο μειονέκτημα αυτής της διεργασίας αποτελεί το γεγονός ότι το μεγαλύτερο μέρος του χρησιμοποιούμενου οξέος πρέπει να ανακυκλώνεται. Επίσης, απαιτείται κατάλληλος εξοπλισμός υψηλού κόστους για την αποφυγή της διάβρωσης εξαιτίας των μεγάλων συγκεντρώσεων οξέος.

1.5.1 ΕΝΖΥΜΙΚΗ ΥΔΡΟΛΥΣΗ

Όσον αφορά την ενζυμική υδρόλυση, η οποία είναι και η διεργασία που επικράτησε στην παρούσα εργασία, είναι απαραίτητο να προηγηθεί μία προκατεργασία της λιγνινοκυτταρινούχου βιομάζας (φυσική ή χημική), η οποία θα αυξήσει την επιδεκτικότητα της κυτταρίνης στις διάφορες ενζυμικές δράσεις, απομακρύνοντας ταυτόχρονα την ημικυτταρίνη και την λιγνίνη που αποτελούν τα φυσικά εμπόδια της δράσης των κυτταρινασών. Παράλληλα, με την προκατεργασία αυτή μπορεί να ελαττωθεί και ο δείκτης κρυσταλλικότητας της κυτταρίνης με αποτέλεσμα την περαιτέρω διευκόλυνση της υδρόλυσης της.

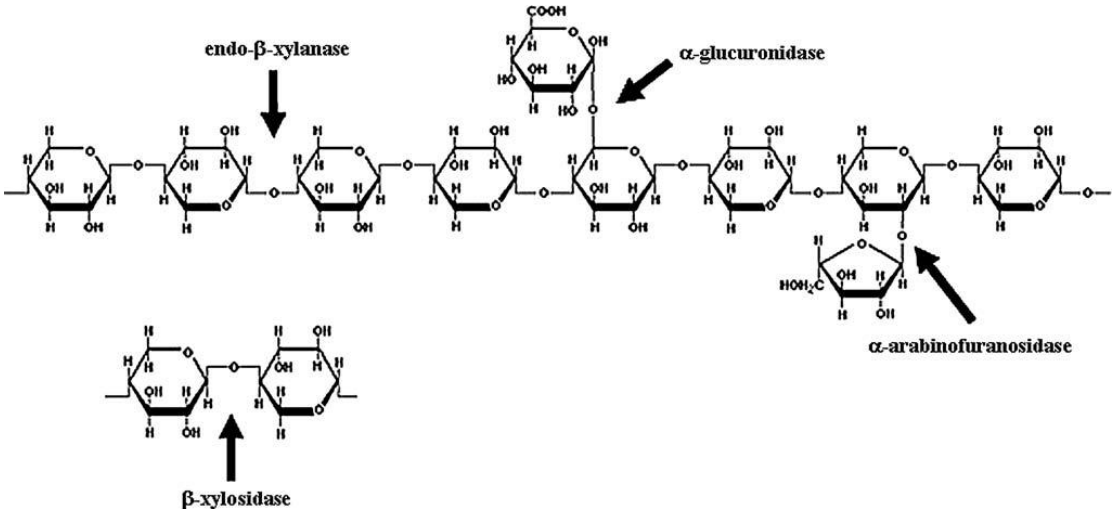
Η προκατεργασία της βιομάζας μπορεί να πραγματοποιηθεί με διάφορους τρόπους: με εκτόνωση ατμού συνδυαζόμενη με αυτοϋδρόλυση, με εκτόνωση ατμού συνδυαζόμενη με την προσθήκη όξινου καταλύτη, με αραιό οξύ σε ήπιες συνθήκες, με υδροθερμική προκατεργασία, με υγρή προκατεργασία οξείδωσης, με έκρηξη αμμωνίας κτλ.

Η κυτταρίνη είναι ο κύριος πολυσακχαρίτης που απομένει μετά από τις περισσότερες προκατεργασίες. Τρία είδη ενζύμων δρουν συνεργιστικά για την υδρόλυση της κυτταρίνης: οι ενδο-1,4-β-γλουκανάσες, προσβάλλουν εσωτερικά τις άμορφες περιοχές της αλυσίδας της κυτταρίνης, οι κελλοβιοϋδρολάσες ή εξωγλουκανάσες προσβάλλουν τα άκρα του πολυμερούς, απελευθερώνοντας κελλοβιόζη, η οποία τελικά διασπάται σε δύο μόρια γλυκόζης από τις β-γλυκοζιδάσες. [Hayes 2009].



Εικόνα 9: Απεικόνιση ενζυμικής υδρόλυσης της κυτταρίνης από τα ένζυμα: ενδο-1,4-β-γλουκανάση, εξω-1,4-β-D-γλουκανάση, β-γλυκοζιδάση.

Για την αποτελεσματική αξιοποίηση των λιγνινοκυτταρινούχων υλικών απαιτείται η αποικοδόμηση τόσο της κυτταρίνης όσο και της ημικυτταρίνης (Lee et al. 2008, Galbe & Zacchi 2002, , Fukuda et al. 2009). Η ξυλάνη, το βασικό πολυμερές της ημικυτταρίνης, υδρολύεται σε ξυλο-ολιγοσακχαρίτες από ενδο-β-1,4-ξυλανάσες και στη συνέχεια οι β-ξυλοζιδάσες υδρολύουν τους ξυλο-ολιγοσακχαρίτες (κυρίως την ξυλοβιόζη) σε μόρια ξυλόζης. Άλλα ένζυμα που συνεισφέρουν στην αποικοδόμηση της ημικυτταρίνης είναι οι α-γλυκουρονιζάσες, οι a-L-αραβινοφουρανοζιδάσες, οι ακετυλ-εστεράσες και οι εστεράσες του φερουλικού οξέος. Η αποικοδόμηση των γλυκομαννάνων γίνεται από β-μαννανάσες και β-μαννοζιδάσες (Kumar et al. 2008, Howard et al. 2003, Gray et al. 2006, , Carvalhiero et al. 2008, Fuduka et al. 2009).



Εικόνα 10: Απεικόνιση ενζυμικής υδρόλυσης της ημικυτταρίνης από τα ένζυμα: ενδο-β-ξυλανάση, α-γλυκουρονοζιδάση, β-ξυλοζιδάση και η α-αραβινοφουρανοζιδάση (Kumar et al. 2008).

1.5.1.1 Παράγοντες που περιορίζουν την ενζυμική υδρόλυση

Όπως έχει αναφερθεί, οι δομικές τροποποιήσεις της λιγνινοκυτταρίνης εξαρτώνται από τον τύπο της προκατεργασίας που έχει εφαρμοσθεί και επηρεάζουν τα μετέπειτα στάδια μετατροπής της σε αιθανόλη και κυρίως το στάδιο της ενζυμικής υδρόλυσης. Οι παράγοντες που επηρεάζουν την ενζυμική υδρόλυση της κυτταρίνης διακρίνονται σε: παράγοντες σχετικοί με το ένζυμο και παράγοντες σχετικοί με το υπόστρωμα, εν τούτοις πολλοί από αυτούς είναι αλληλένδετοι κατά τη διάρκεια της διαδικασίας της υδρόλυσης.

Η μείωση της έντασης της προκατεργασίας απαιτείται μερικές φορές για τη μείωση του κόστους. Ήπια προκατεργασία οδηγεί σε χαμηλά ποσοστά απελευθέρωσης σακχάρων και συνεπώς θα απαιτηθούν μεγαλύτερες ποσότητες και διαφορετικοί τύποι ενζύμων για την επίτευξη υψηλών αποδόσεων σακχάρων από την κυτταρίνη και την ημικυτταρίνη. Σε αυτό το πλαίσιο, η ανάπτυξη των ημικυτταρινασών αλλά και άλλων βοηθητικών ενζύμων που απαιτούνται για

την πλήρη υποβάθμιση των πολυσακχαριτών της λιγνινοκυτταρίνης έχει αποκτήσει σημαντικό ενδιαφέρον.

Οι παράγοντες που σχετίζονται με το υπόστρωμα και περιορίζουν την ενζυμική υδρόλυση συνδέονται άμεσα με την εκάστοτε προκατεργασία που χρησιμοποιήθηκε (Alvira et al. 2009).

Κρυσταλλικότητα κυτταρίνης

Ο βαθμός πολυμερισμού και η κρυσταλλικότητα της κυτταρίνης θεωρούνται σημαντικοί παράγοντες στον καθορισμό του ρυθμού υδρόλυσης κυτταρινούχων υποστρωμάτων, αλλά στοιχεία από διάφορες έρευνες δείχνουν ότι αυτές οι παράμετροι μόνες τους δεν εξηγούν την '' ανθεκτικότητα'' των λιγνινοκυτταρινούχων υποστρωμάτων. Στην πραγματικότητα, σύμπλοκα κυτταρινασών ικανά για την υδρόλυση της κρυσταλλικής κυτταρίνης έχουν προσδιορισθεί. Σε μερικές μελέτες στις οποίες η κρυσταλλικότητα θεωρήθηκε σημαντική, τα λιγνινοκυτταρινούχα υλικά επεξεργάστηκαν μηχανικά, επομένως οποιαδήποτε μείωση στην κρυσταλλικότητα συνοδεύτηκε και από αλλαγή άλλων χαρακτηριστικών του υποστρώματος όπως η μείωση μεγέθους των σωματιδίων ή αύξηση της διαθέσιμης επιφάνειας.

Έχει παρατηρηθεί ότι η προκατεργασία των λιγνινοκυτταρινούχων υλικών βελτιώνει την υδρόλυση τους αλλά σε μερικές περιπτώσεις αυξάνει το δείκτη κρυσταλλικότητας της κυτταρίνης. Αυτό το γεγονός έχει παρατηρηθεί ότι οφείλεται στην απομάκρυνση της άμορφης κυτταρίνης μετά από συγκεκριμένες προκατεργασίες όπως η έκρηξη ατμού. Αντίθετα, οι προκατεργασίες σε υψηλό pH έχει αποδειχθεί ότι έχουν μικρότερη επίδραση στην κρυσταλλικότητα της βιομάζας (Alvira et al. 2009).

Βαθμός πολυμερισμού κυτταρίνης

Ο βαθμός πολυμερισμού της κυτταρίνης σχετίζεται με άλλα χαρακτηριστικά του υποστρώματος, όπως η κρυσταλλικότητα. Παρότι ο ρόλος του μήκους της αλυσίδας της γλουκάνης δεν έχει αποσαφηνισθεί πλήρως, θεωρείται ότι επηρεάζει την ενζυμική υδρόλυση. Τα αποτελέσματα διαφόρων προκατεργασιών στο μήκος των αλυσίδων κυτταρίνης δείχνουν ότι η μείωση του βαθμού πολυμερισμού στο προκατεργασμένο υλικό οφείλεται περισσότερο στην απομάκρυνση της ξυλάνης από ότι στην απομάκρυνση της λιγνίνης (Alvira et al. 2009).

Ενεργή επιφάνεια υλικού

Η ευκολία πρόσβασης των υδρολυτικών ενζύμων στο υλικό είναι ένας από τους πιο σημαντικούς παράγοντες που επηρεάζουν την διαδικασία της υδρόλυσης. Ως εκ τούτου, ένας από τους κύριους στόχους της προκατεργασίας είναι η αύξηση της ενεργής επιφάνειας του υλικού.

Η παρεμπόδιση της λιγνίνης

Η παρουσία της λιγνίνης και την ημικυτταρίνης δυσκολεύει την πρόσβαση των υδρολυτικών ενζύμων στην κυτταρίνη με αποτέλεσμα την μείωση της αποτελεσματικότητας της υδρόλυσης. Η λιγνίνη μειώνει το ρυθμό της ενζυμικής υδρόλυσης δρώντας σαν φυσικό εμπόδιο. Επιπλέον, η λιγνίνη φαίνεται να περιορίζει την υδρόλυση της κυτταρίνης με το να δεσμεύει τις κυτταρινάσες. Η δέσμευση των ενζύμων στη λιγνίνη επηρεάζεται από την φύση του υλικού. Ενώ διάφορες κυτταρινάσες διαφέρουν στην αναστολή τους από τη λιγνίνη, οι ξυλανάσες και οι γλυκοζιδάσες επηρεάζονται λιγότερο.

Η λιγνίνη απομακρύνεται από το υλικό με διάφορους τρόπους ανάλογα και με την μέθοδο προκατεργασίας, για παράδειγμα στην έκρηξη ατμού η λιγνίνη τήκεται και μετατοπίζεται ή στην έκρηξη αμμωνίας διαταράσσονται οι δεσμοί μεταξύ των υδρογονανθράκων του υλικού και της λιγνίνης (Alvira et al. 2009).

Περιεκτικότητα σε ημικυτταρίνη

Η απομάκρυνση της ημικυτταρίνης αυξάνει το μέσο μέγεθος των πόρων του υλικού και επομένως αυξάνει την προσβασιμότητα και την πιθανότητα της κυτταρίνης να υδρολυθεί. Από την άλλη πλευρά, η ανάκτηση των σακχάρων της ημικυτταρίνης από το προκατεργασμένο υλικό θα είχε ενδιαφέρον για να επιτευχθεί υψηλότερη παραγωγή συνολικών ζυμώσιμων σακχάρων. Σε αυτή την περίπτωση πρέπει να ληφθούν υπόψη οι ενζυμικές προϋποθέσεις για την τροποποίηση της ημικυτταρίνης. Επίσης ο βαθμός ακετυλίωσης της ημικυτταρίνης είναι ένας σημαντικός παράγοντας, γιατί η λιγνίνη και οι ακετυλομάδες δεσμεύονται στην μήτρα της ημικυτταρίνης και εμποδίζουν την υδρόλυσή της (Alvira et al. 2009).

Μέγεθος των σωματιδίων του υλικού

Η μείωση του μεγέθους του υλικού αυξάνει την ενεργή επιφάνεια και επομένως αυξάνει την προσβασιμότητα της κυτταρίνης από τα ένζυμα (Alvira et al. 2009).

Πάχος του κυτταρικού τοιχώματος (τραχύτητα)

Το φράγμα που απαντάται στο περίβλημα των χόρτων και στον φλοιό των δέντρων εμποδίζει την διεισδυτικότητα των ενζύμων, ακόμα και αλεσμένα στελέχη των φυτών και ξυλώδεις ιστοί είναι υδρόφοβοι από την φύση τους.

1.6 Διεργασίες παραγωγής αιθανόλης

Η διεργασία βιομετατροπής της λιγνοκυτταρινούχου βιομάζας σε αιθανόλη περιλαμβάνει τέσσερα διαφορετικά στάδια: την παραγωγή σακχαρολυτικών ενζύμων (κυτταρινάσες και ημικυτταρινάσες), την υδρόλυση των υδρογονανθράκων που περιέχονται στη βιομάζα σε απλούστερα σάκχαρα, τη ζύμωση των εξοζών (γλυκόζη, μαννόζη και γαλακτόζη) και τη ζύμωση των πεντοζών (ξυλόζη και αραβινόζη) [Lynd et al 2002].

- *Διακριτή υδρόλυση και ζύμωση (SHF)*

Το σύστημα αυτό, 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 του 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 [Szczodrak and Fiedurek 1995, Alfani et al. 2000, Zaldivar et al.2001].

- *Ταυτόχρονη σακχαροποίηση και ζύμωση (SSF)*

Η διεργασία αυτή πραγματοποιείται σε έναν αντιδραστήρα υπό συνθήκες όσο το δυνατόν πιο άριστες τόσο για τα ένζυμα που χρησιμοποιούνται για την υδρόλυση, όσο και για τον μικροοργανισμό που χρησιμοποιείται για τη ζύμωση. 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 ξεχαωριστά στάδια.

Σε σχέση με την διεργασία της διακριτής υδρόλυσης και ζύμωσης (SHF), η SSF έχει σαν αποτέλεσμα την παραγωγή μεγαλύτερων αποδόσεων παραγωγής αιθανόλης, καθώς η παρεμπόδιση από την παραγωγή της γλυκόζης και κελλοβιόζης αντιμετωπίζεται από την άμεση κατανάλωσή τους κατά τη διάρκεια της ζύμωσης, έχει μικρότερες απαιτήσεις στην ποσότητα των ενζύμων που χρησιμοποιούνται για την υδρόλυση, μικρότερο χρονική διάρκεια της διεργασίας , καθώς επίσης και μικρότερο κίνδυνο μόλυνσης του μέσου καλλιέργειας από ανεπιθύμητους μικροοργανισμούς λόγω της παρουσίας αιθανόλης. Ωστόσο, το

μεγαλύτερο μειονέκτημα της διεργασίας αυτής είναι οι διαφορετικές βέλτιστες συνθήκες που απαιτούνται για την υδρόλυση της κυτταρίνης και τη ζύμωση. Οι κυτταρινάσες υδρολύουν σε ένα άριστο pH 4-5 και σε θερμοκρασία 40-50ºC, ενώ η ζύμωση των εξοζών πραγματοποιείται στους 30ºC και pH 4-5. Για την αποτελεσματική ταυτόχρονη σακχαροποίηση και ζύμωση, πρέπει να χρησιμοποιηθούν ανασυνδυασμένοι μικροοργανισμοί οι οποίοι μπορούν να ζυμώσουν την γλυκόζη, την ξυλόζη και αραβινόζη.

- ***Άμεση μικροβιακή μετατροπή – ενοποιημένη βιοδιεργασία (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 σε αιθανόλη, πραγματοποιούνται σε ένα μόνο στάδιο.

Η βασική διαφορά της άμεσης μικροβιακής μετατροπής από τις υπόλοιπες 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 συνεργεία ενζύμου – μικροοργανισμού. Το αποτέλεσμα είναι η αύξηση του ρυθμού υδρόλυσης και η περαιτέρω μείωση του κόστους επένδυσης λόγω μείωσης του όγκου του αντιδραστήρα. Επιπλέον, με τη μέθοδο αυτή μπορεί να επιτευχθεί μεγαλύτερη παραγωγή του επιθυμητού προϊόντος, καθώς και βελτίωση της σταθερότητας των καλλιεργειών και των στελεχών που χρησιμοποιούνται [Lynd et al. 2005].

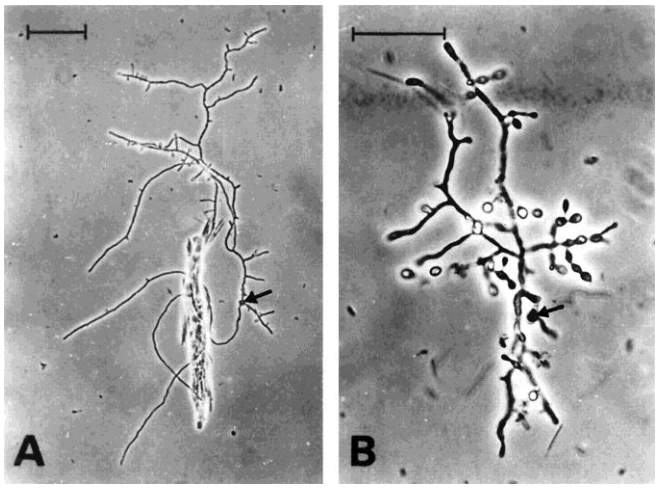
1.7 Μύκητας SPOROTRICHUM THERMOPHILE

Ο μικροοργανισμός Sporotrichum thermophile (Chrysosporium thermophile, Myceliophthora thermophila) και Thielavia heterothallica (Corynascus heterothallicus) αποτελούν, αντίστοιχα, το αγενές στάδιο (αναμορφή) και το εγγενές στάδιο (τελειομορφή) του ίδιου ετεροθαλικού ασκομύκητα [Canevascini, 1991; Cannon, 1990; Salar & Aneja, 2007; Vasil'chenko et al., 2009]. Ο S. thermophile είναι ένας θερμόφιλος, νηματοειδής μύκητας, ο οποίος αναπτύσσεται ταχύτατα σε θρεπτικό μέσο με εκχύλισμα βύνης, φτάνοντας διάμετρο 9cm, μετά από επώαση τριών ημερών περίπου σε θερμοκρασία 45°C. Αναπτύσσεται σε θερμοκρασίες από 25 έως 55°C, με βέλτιστη θερμοκρασία ανάπτυξης 45-50°C, ενώ παρουσιάζει ανοχή έναντι σύντομης έκθεσης σε θερμοκρασίες μέχρι 60°C. Σχηματίζει εκτεταμένες αποικίες με χρωματισμούς που εναλλάσσονται από το λευκό έως το ανοιχτό καφέ των ώριμων αποικιών, και χαρακτηρίζονται από θυσανωτή ή κοκκώδη υφή. Οι αναπτυσσόμενες μικκυλιακές υφές είναι άχρωμες και φτάνουν τα 2μm σε πλάτος. Γενικά, οι βυθισμένες μικκυλιακές υφές είναι διπλάσιες σε πλάτος από τις αέριες υφές. Απιοειδή βλαστοκονίδια, διαστάσεων 4x7μm, εκφύονται από διογκωμένα κύτταρα στα πλευρικά ή ακραία τμήματα των υφών. Σε ορισμένες περιπτώσεις, παράγονται αλυσίδες δευτερογενών βλαστοκονιδίων μέσω κορυφαίας εκβλάστησης [Salar & Aneja, 2007].

Οι αποικίες χαρακτηρίζονται από διαφορετική μορφολογία ανάλογα με το θρεπτικό υπόστρωμα, στο οποίο αναπτύσσονται. Σε υπόστρωμα κελλοβιόζης, διαμορφώνεται το χαρακτηριστικό δίκτυο νηματοειδών σχηματισμών, το μικκύλιο, ενώ σε υπόστρωμα κυτταρίνης, παρατηρείται αυτόλυση και παραγωγή σπορίων [Maheshwari et al., 2000]. Στελέχη έχουν απομονωθεί από το έδαφος και κυτταρινούχο φυτική ύλη.

Ως θερμόφιλος μικροοργανισμός, ο S. thermophile παράγει θερμοανθεκτικά ένζυμα, τα οποία μπορούν να χρησιμοποιηθούν σε βιοδιεργασίες υψηλών θερμοκρασιών, γεγονός που ανάγει τον μικροοργανισμό αυτό σε σημαντικό

σύστημα μελέτης. Ο S. thermophile συνθέτει εξ΄ολοκλήρου το σύστημα κυτταρινολυτικών ενζύμων που απαιτείται για την υδρόλυση της κυτταρίνης. Η σύνθεση αυτή ρυθμίζεται μέσω επαγωγής και καταβολικής καταστολής [Canevascini et al., 1981]. Μεταξύ των ενζύμων που έχουν απομονωθεί και χαρακτηριστεί περιλαμβάνονται αρκετές β-γλυκοζιδάσες [Canevascini & Meyer, 1979; Gaikwad & Mahesawari, 1994; Meyer & Canevascini, 1981]. Τα ένζυμα αυτά διαφέρουν ως προς το μοριακό βάρος, τη βέλτιστη θερμοκρασία και τη βέλτιστη τιμή pH δράσης, τη θερμοκανθεκτικότητα και τη συγγένεια προς ορισμένους β-γλυκοζίτες. Εντοπίζονται στο εσωτερικό του κυττάρου ή στην επιφάνεια του κυτταρικού τοιχώματος, από το οποίο ορισμένες μορφές, ενδέχεται να αποδεσμεύονται υπό συνθήκες που οδηγούν στη λύση του κυτταρικού τοιχώματος. Ακόμη, έχουν απομονωθεί ξυλανολυτικά ένζυμα, όπως μια ενδοξυλάνη της οικογένειας 11 [Katapodis et al., 2003], μια β-ξυλοζιδάση [Katapodis et al., 2006], δύο τύποι εστερασών του φερουλικού οξέος, StFaeA και StFaeC [Topakas et al., 2004; Topakas et al., 2005], καθώς και μια γλυκουρονική εστεράση, StGE1 της οικογένειας 15 [Vafiadi et al., 2009]. Τέλος, από τον μύκητα έχουν απομονωθεί ένζυμα, όπως η δεϋδρογενάση της κελλοβιόζης [EC 1.1.99.18], η μηλική αφυδρογονάση [EC 1.1.1.37], η S-τρανσφεράση του γλουταθείου [EC 2.5.1.13], καθώς και πηκτινάσες [EC 3.2.1.15], λακκάσες [EC 1.10.3.2], λιπάσες [EC 3.1.1.34], αμυλάσες [EC 3.2.1.1] και φυτάσες [EC 3.1.3.8] [Subramaniam et al., 1999; Wall et al., 1979; Sheehan & Casey, 1993; Kaur et al., 2004; Berka et al., 1997; Johri et al., 1990; Adams, 1997; Wyss et al., 1999a; Wyss et al., 1996].



Εικόνα 11: μύκητας sporotrichum thermophile

2. ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ

2.1 Πρώτη ύλη και μικροοργανισμοί

Το γλυκό σόργο (Sorghum bicolor L.} {Moench) που χρησιμοποιήθηκε κατά τη διεξαγωγή της παρούσας διπλωματικής εργασίας άνηκε στην ποικιλία Keller και παραχωρήθηκε ευγενικά από τον καθηγητή Γιώργο Σκαράκης, Τμήμα Επιστήμης Φυτικής Παραγωγής, Γεωπονικό Πανεπιστήμιο Αθηνών. Το εν λόγω γλυκό σόργο καλλιεργήθηκε το Μάιο του 2010 και η συλλογή και συγκομιδή έγινε τον Οκτώβριο από την πεδιάδα της Κωπαΐδας.

Ο μικροοργανισμός που χρησιμοποιήθηκε στην παρούσα διπλωματική εργασία για την παραγωγή του ενζυμικού διαλύματος ήταν ο θερμόφιλος μύκητας Sporotrichum thermophile ATCC 42464.

2.2 Μέτρηση σακχάρων

Εικόνα 12: φωτόμετρο

Ο υπολογισμός των αναγωγικών σακχάρων που απελευθερώνονταν, έγινε σύμφωνα με τη μέθοδο του δινιτροσαλικυλικού οξέος (DNS). Σύμφωνα με τη μέθοδο του

δινιτροσαλικυλικού οξέος, σε 250 μl δείγματος προστίθενται 250 μl διαλύματος DNS και πραγματοποιείται βρασμός για 5min. Ακολουθεί προσθήκη 2 ml απιονισμένου νερού και φωτομέτρηση στα 540nm.

Αντίστοιχα, ο υπολογισμός της γλυκόζης που απελευθερώνονταν πραγματοποιήθηκε με την χρήση του εμπορικού kit της Biosis. Ο προσδιορισμός πραγματοποιήθηκε ενζυμικά με το σύστημα ενζύμων GOD/PAP (Glucose oxidase-peroxidase). Σύμφωνα με την μέθοδο, 200μl από το kit γινόταν προσθήκη 10μl από το αραιωμένο ένζυμα. Αυτά τοποθετούνταν σε μια πλάκα 96-well ELISA microplate, η οποία επωαζόταν για 15min σε θερμοκρασία 37°C και η απορρόφηση μετρούνταν στα 510nm.

2.3 Μέτρηση ενεργότητας ενζύμων

Για τον υπολογισμό της ενεργότητας των κυτταρινασών χρησιμοποιήθηκε ως υπόστρωμα διηθητικό χαρτί Watman No 1. Σε eppendorf των 2ml, τοποθετούνταν 50mg (6x1cm) από το διηθητικό χαρτί, 1 ml ρυθμιστικού διαλύματος 100Mm citrate-phosphate pH=5,5 και 500 μl καταλλήλως αραιωμένου δείγματος. Ακολούθησε επώαση στους 50 °C σε θερμαινόμενο αναδευτήρα Eppendorf Thermomixer comfort για 1h. Μετά το πέρας της επώασης, το δείγμα τοποθετούνταν σε πάγο για να σταματήσει η αντίδραση και ακολουθούσε προσδιορισμός των απελευθερούμενων σακχάρων με την μέθοδο του DNS. Ως 1 Unit ενεργότητας ορίζεται η ποσότητα του ενζύμου που απελευθερώνει 1 μmole γλυκόζης ανά min.

Εικόνα 13: thermomixer για eppendorfs

2.4 Ανάπτυξη του μικροοργανισμού

Ο μύκητας διατηρούταν στο ψυγείο στους 4°C σε κεκλιμένο στερεό υπόστρωμα PDA σε δοκιμαστικούς σωλήνες (sland). Το υπόστρωμα αποτελείτο από 3,9%

PDA (potato-dextrose-agar) και 0,2% Yeast Extract. Το υπόστρωμα προτού χρησιμοποιηθεί αποστειρωνόταν στους 121° C για 20 λεπτά. Ακολουθούσε ανακαλλιέργεια του μύκητα στο sland και επώασή του για 5 ημέρες στους 47° C.

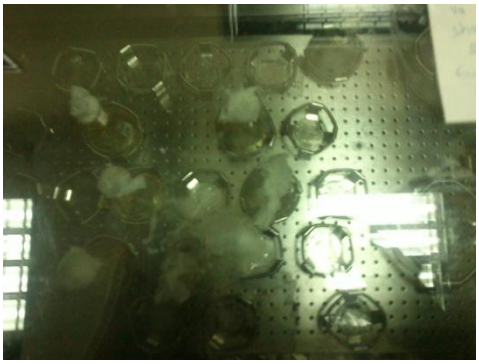
Μετά την ανάπτυξη της καλλιέργειας στα sland, ακολουθούσε ανάπτυξή του σε υγρή προκαλλιέργεια, με την ακόλουθη σύσταση:

Πίνακας 3: σύσταση προκαλλιέργειας μύκητα S. thermophile

Συστατικά προκαλλιέργειας	Ποσότητες συστατικών
KH_2PO_4	3 g/L
K_2HPO_4	2 g/L
$MgSO_4\ 7H_2O$	0,5 g/L
$CaCl_2\ 2H_2O$	0,1 g/L
$NH_4H_2PO_4$	7 g/L
$FeSO_4\ 7H_2O$	5mg/L
$MnSO_4\ 4H_2O$	1,6 mg/L
$ZnSO_4\ 7H2O$	1,4 mg/L
$CoCl_2\ 6H2O$	0,2 mg/L
Corn cobbs	30 g/L

Η προκαλλιέργεια πραγματοποιήθηκε σε κωνικές φιάλες των 250 mL πληρωμένες έως τα 100 mL. Αφού το pH της προκαλλιέργειας ρυθμίστηκε στο 5, ακολούθησε αποστείρωση στους 121 oC για 20 λεπτά. Μετά την αποστείρωση και αφού οι φιάλες αφέθηκαν να κρυώσουν, ακολούθησε εμβολιασμός κάτω από ασηπτικές συνθήκες με την βοήθεια βακτηριολογικού κρίκου. Μετά τον εμβολιασμό ακολούθησε ανάπτυξη του μύκητα σε ανακινούμενο επωαστήρα στους 47 oC και 200 rpm για δύο μέρες.

Τέλος, για την παραγωγή του εξωκυτταρικού ενζυμικού διαλύματος, πραγματοποιήθηκε ανάπτυξη του οργανισμού σε κωνικές φιάλες των 2 L, πληρωμένες έως τα 800 mL με υγρό υπόστρωμα όμοιας σύστασης με το υπόστρωμα της προκαλλιέργειας με την διαφορά ότι ως πηγή άνθρακα περιείχε 7% spent grain (υπόλειμμα βύνης) και ως πηγή αζώτου 0,4% Θειικό αμμώνιο. Το pH της καλλιέργειας διορθώθηκε στο 5 και ακολούθησε αποστείρωση του υποστρώματος. Μετά το πέρας της αποστείρωσης και αφού οι φιάλες να κρυώσουν, ακολούθησε εμβολιασμός υπό ασηπτικές συνθήκες με την βοήθεια αποστειρωμένου ογκομετρικού κυλίνδρου. Ο όγκος του εμβολίου ήταν 5 % v/v. Ακολούθησε ανάπτυξη του οργανισμού για 5 ημέρες σε ανακινούμενο επωαστήρα στου 47°C και 200 rpm. Αξίζει να σημειωθεί ότι συνθήκες καλλιέργειας του μύκητα κατά την φάση παραγωγής του ενζύμου είχαν καθοριστεί από προηγούμενη δουλειά στο εργαστήριο, έτσι ώστε να είναι οι βέλτιστες για την παραγωγή κυτταρινολυτικών ενζύμων.



Εικόνα 14: θάλαμος επώασης καλλιεργειών

2.5 Παραγωγή ενζύμου από τον μύκητα Fusarium oxysporum F3

Για την παραγωγή των ενζύμων χρησιμοποιήθηκαν κωνικές φιάλες 2000 mL με ενεργό όγκο 700mL, οι οποίες είχαν αποστειρωθεί στους 120°C για 20 λεπτά..

Οι φιάλες περιείχαν τα παρακάτω μεταλλικά άλατα: 1.00 g/L KH_2PO_4, 0.30 g/L $CaCl_2 \bullet 2H_2O$, 0.30 g/L $MgSO_4 \bullet 7H_2O$, 10.0 g/L $(NH_4)_2HPO4$, 6.94 g/L $NaH_2PO_4 \cdot 2H_2O$ και 9.52 g/L $Na_2HPO_4 \cdot 2H_2O$, καθώς επίσης και 40 g/L υπόλειμμα βύνης και σπαδικά αραβοσίτου σε αναλογία 2/1. Τέλος η επώαση της προκαλλιέργειας έγινε θερμοκρασία 30°C για 5 ημέρες στις 200 στροφές ανά λεπτό σε περιστροφικό αναδευτήρα.

Μετά το πέρας της ανάπτυξης η καλλιέργεια συλλέχθηκε και φυγοκεντρήθηκε στις 14.000 στροφές ανά λεπτό για 20 λεπτά. Τελικά το υπερκείμενο υγρό συμπυκνώθηκε με μεμβράνη υπερδιήθησης 10.000 Dalton. Το τελικό συμπύκνωμα διατηρήθηκε στους 4°C και χρησιμοποιήθηκε στις υδρολύσεις.

2.6 Παραλαβή του ενζυμικού διαλύματος

Μετά το πέρας των 5 ημερών ανάπτυξης του μύκητα, το υγρό της ζύμωσης (περιλάμβανε και την βιομάζα του μύκητα καθώς και υπολείμματα του υλικού που χρησιμοποιήθηκε ως πηγή άνθρακα), διηθήθηκε με τη χρήση υφάσματος από τούλι, ώστε να περάσει το υγρό και να μαζευτεί σε κωνική φιάλη, ενώ τα μεγάλα κομμάτια στερεών να απορριφθούν. Στο υγρό που συλλέχθηκε, προστέθηκε 0,01% sodium azide, ώστε να αποφευχθούν οι μολύνσεις και φυλάχθηκε στους 4 ^{o}C. Το υγρό χωρίστηκε σε πλαστικά μπουκάλια για να φυγοκεντρηθεί για 45 λεπτά στα 14000 rpm, ώστε να διαχωριστούν πλήρως τα στερεά. Η συγκεκριμένη διαδικασία ακολούθησε 2 φορές για όλη την ποσότητα του υγρού. Μετά το πέρας της διαδικασίας το υγρό φυλάχθηκε στους 4 ^{o}C μέχρις ότου να συμπυκνωθεί.

Εικόνα 15: συσκευή υπερδιήθησης Millipore

Το ενζυμικό διάλυμα (crude) που ήταν αποθηκευμένο, συμπυκνώθηκε με την χρήση συσκευής υπερδιήθησης της Millipore (εικόνα). Οι μεμβράνες υπερδιήθησης που χρησιμοποιήθηκαν ήταν 10.000 Da cutoff. Για να επιβεβαιωθεί η αποτελεσματικότητα της διεργασίας, μετρήθηκε η ενεργότητα και η συγκέντρωση πρωτεΐνης τόσο στο συμπύκνωμα όσο και στο υγρό που διαπέρασε από τις μεμβράνες. Για να αυξηθεί η συγκέντρωση του ενζύμου ανά μονάδα όγκου του crude διαλύματος, η ίδια διαδικασία συνεχίστηκε σε συσκευή υπερδιήθησης Amicon, στην οποία χρησιμοποιήθηκαν μεμβράνες 10 000 Da cutoff. Και σε αυτήν την περίπτωση

πραγματοποιήθηκε μέτρηση τόσο ενεργότητας κυτταρινάσης όσο και της συγκέντρωσης πρωτεΐνης και στο συμπύκνωμα και στο flow-through. Αφού τελείωσε και αυτή η φάση της συμπύκνωσης, το συμπυκνωμένο crude ενζυμικό σκεύασμα χωρίστηκε σε μικρές παρτίδες του 1 mL σε epperdorf των 1,5 mL και φυλάχθηκε στην κατάψυξη έως ότου να γίνει χρήση του στα πειράματα υδρόλυσης.

2.7 Παρασκευή βαγάσσης και υδροθερμική κατεργασία αυτής.

Η διαδικασία παραγωγής της βαγάσσης έχει ως εξής: τα ελεύθερα σάκχαρα απομακρύνονταν από το υλικό με διπλή υδατική εκχύλιση σε διάλυμα γλυκού σόργου 15 % w/v στους 50 ^{O}C. Το στερεό υπόλειμμα (βαγάσση) ξηραίνοντας μέχρι σταθερού βάρους σε θερμοκρασία 60 ^{O}C και έπειτα κοβόταν με εργαστηριακό μύλο σε σωματίδια διαμέτρου 0,5 mm.

Η προκατεργασία της βαγάσσης έγινε σύμφωνα με τα αποτελέσματα παλαιότερης δουλειάς που πραγματοποιήθηκε στο εργαστήριο και είχε ως σκοπό την βελτιστοποίηση της υδροθερμικής κατεργασίας της βαγάσσης με σκοπό την υψηλή συγκέντρωση αυτής σε κυτταρίνη καθώς και την ευκολία υδρόλυσης της από εμπορικά ενζυμικά σκευάσματα. Πιο συγκεκριμένα πραγματοποιήθηκε η εξής διαδικασία: Ζυγίστηκαν 3g βαγάσσης και προστέθηκαν σε κωνικές φιάλες των 100mL, όπου έγινε επίσης προσθήκη 30mL διαλύματος οξικού οξέος 0,3%w/v σε νερό, το οποίο πρωτίστως προθερμάνθηκε στο υδατόλουτρο έως θερμοκρασία 80 ^{o}C. Αφού οι κωνικές φιάλες επωάστηκαν για 1h στο υδατόλουτρο, έτσι ώστε να ενυδατώσουν πλήρως της ίνες της κυτταρίνης, μεταφέρθηκαν σε ειδικά vials και υπέστηκαν προκατεργασία σε φούρνο μικροκυμάτων για 30 λεπτά στους 230 ^{o}C.Μετά το πέρας της διαδικασίας, το περιεχόμενο κάθε vial φιλτραρίστηκε μέσω διηθήσεως υπό κενό και ξηράνθηκε σε φούρνο των 60 ^{o}C μέχρι σταθερού βάρους.
Η συσκευή που πραγματοποιήθηκε η υδροθερμική κατεργασία της βαγάσσης σόργου ήταν ένας φούρνος μικροκυμάτων (speedwave™ MWS-2, Berghof Instruments GmBH, Germany). Το σύστημα ήταν εξοπλισμένο με έναν αισθητήρα

IR, ο οποίος επέτρεπε καθορισμό της θερμοκρασίας χωρίς επαφή. Η ισχύς του φούρνου ορίστηκε στα 700 Watt.

Εικόνα 16: vials

Εικόνα 17: συσκευή διήθησης υπό κενό

3. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ - ΣΥΖΗΤΗΣΗ

Τα πειραματικά αποτελέσματα προήλθαν από τις δειγματοληψίες, που έγιναν σε κάθε πειραματική διαδικασία και αφορούσαν την μέτρηση της απελευθέρωσης των ολικών αναγωγικών σακχάρων (μέτρηση με DNS) καθώς και της γλυκόζης (μέτρηση με glucotest). Σε κάθε περίπτωση τα πειράματα της ενζυμικής υδρόλυσης πραγματοποιούνταν σε thermomixer. Πιο συγκεκριμένα, γινόταν χρήση epperdorf των 2 mL, όπου προστίθεντο 3% w/v βαγάσση (εκτός και αν αναφέρεται κάτι άλλο) σε συνολικό όγκο διαλύματος 1,5 mL, όπου περιέχονται το καταλλήλως αραιωμένο ένζυμο, ούτως ώστε να επιτευχθεί η επιθυμητή ενεργότητα ενζύμου ανά g υποστρώματος. Οι ενζυμικές αντιδράσεις πραγματοποιούνταν σε buffer 100 mM citrate-phosphate ίσο με 5,5 (εκτός και αν αναφέρεται κάποια άλλη τιμή). Για να αποφευχθούν τυχόν μικροβιακές μολύνσεις γινόταν προσθήκη 0,01% w/v sodium azide. Η διάρκεια των ενζυμικών υδρολύσεων καθορίστηκε μέχρι τις 48 ώρες. Αυτή η απόφαση λήφθηκε διότι σκοπός της παρούσας διπλωματικής ήταν η διερεύνηση της ικανότητας χρήσης του ενζυμικού συστήματος του μύκητα S. thermophille σε βιομηχανικές εφαρμογές. Πιο συγκεκριμένα, λόγω της υψηλής θερμο-ανθεκτικότητας του ενζυμικού συστήματος του εν λόγω μύκητα θα μπορούσε να γίνει εφαρμογή του συστήματος της ξεχωριστής σακχαροποίησης και ζύμωσης (Separate Hydrolysis and Fermentation-SHF), ούτως ώστε να μπορέσει να επιτευχθεί υψηλή συγκέντρωση σακχάρων κατά την έναρξη της ζύμωσης και με την χρήση της ζύμης Saccharomyces cerevisiae ως αιθανολοπαραγωγού οργανισμού, η διάρκεια αυτής να είναι μικρή. Το σύστημα της ταυτόχρονης σακχαροποίησης και ζύμωσης (Simultaneous Saccharification and Fermentation-SSF) που εφαρμόζεται ευρέως τα τελευταία χρόνια, μπορεί μεν να οδηγεί σε μειωμένη παρεμπόδιση εκ της παραγόμενης γλυκόζης στα ένζυμα, αλλά εν τούτοις λόγω του ότι η υδρόλυση πραγματοποιείται σε θερμοκρασίες μη ευνοϊκές για την δράση των ενζύμων, η απελευθέρωση των μονομερών σακχάρων γίνεται με αργούς ρυθμούς και κατ'

επέκταση η συνολική διάρκεια της διεργασίας είναι υψηλή. Για την εφαρμογή της διεργασίας SHF ο χρόνος που διαρκεί η υδρόλυση επιλέγεται συνήθως να είναι μέχρι 24 ώρες, για να μπορέσει με αυτόν τον τρόπο να διατηρηθεί ο συνολικός χρόνος της διεργασίας χαμηλός. Στην παρούσα εργασία επιλέχθηκε η διάρκεια των υδρολύσεων να καθοριστεί στις 48 ώρες, για να μελετηθεί τόσο η ικανότητα του ενζυμικού συστήματος να δρα για σημαντική χρονική περίοδο, όσο και η πιθανή αύξηση του χρόνου υδρόλυσης σε μια πιθανή εφαρμογή ενός συστήματος SHF.

Όσον αφορά τη διαδικασία της δειγματοληψίας, αυτή πραγματοποιήθηκε ως εξής: Τα eppendorfs, στα οποία πραγματοποιούνταν οι ενζυμικές υδρολύσεις φυγοκεντρούνταν για 1min περίπου ούτως ώστε να πέσουν τυχόν υπολείμματα από τα τοιχώματα στο υγρό και αναδεύονταν στο vortex προς ομογενοποίησή τους. Η ποσότητα του δείγματος που παραλαμβανόταν ήταν 80μl με τη χρήση πιπέττας των 100 μL και κομμένων στην άκρη tips ανά τακτά χρονικά διαστήματα και για διάστημα έως 48 ώρες. Τέλος, τα δείγματα φυγοκεντρούνταν για 5 λεπτά ώστε να διαχωριστούν τα στερεά και λαμβάνονταν το υπερκείμενο υγρό. Αφού πραγματοποιούνταν κατάλληλες αραιώσεις, γινόταν προσδιορισμός τόσο των συνολικών αναγωγικών σακχάρων όσο και της γλυκόζης. Για να βρεθεί η καθαρή συγκέντρωση των σακχάρων που απελευθερώθηκαν από την δράση των ενζύμων, στο χρόνο μηδέν λαμβάνονταν δείγμα και αναλυόταν όπως και τα άλλα. Από όλες τις επόμενες μετρήσεις αφαιρούνταν οι συγκεντρώσεις των σακχάρων που προϋπήρχαν στο δείγμα.

Η απόδοση της ενζυμικής υδρόλυσης υπολογιζόταν εφαρμόζοντας της ακόλουθης εξίσωση (Vasquez et al, 2007):

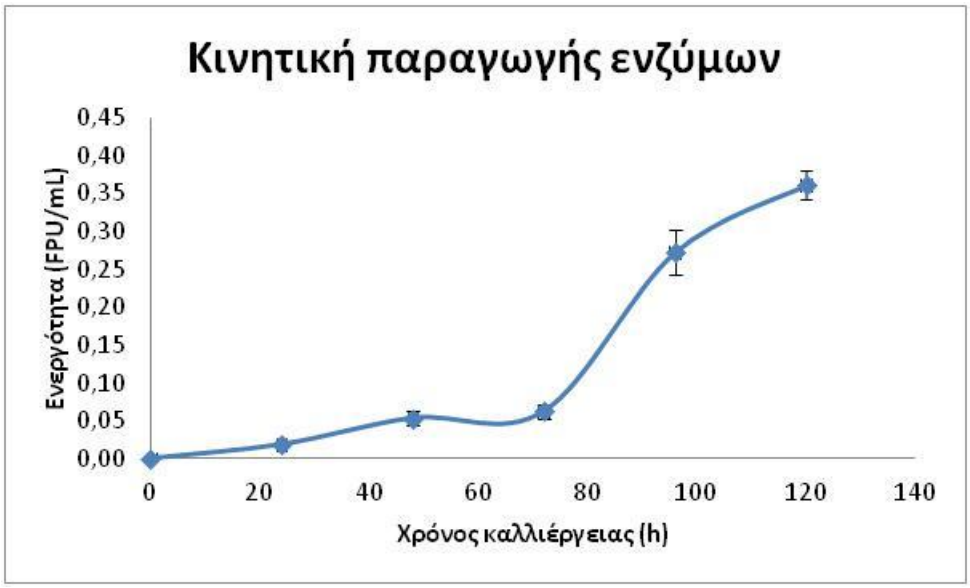
$$Eh = \frac{C_s}{F \cdot \left(CPn_o / WSR\right) \cdot \rho} \qquad \text{Εξ. 1}$$

Όπου το Eh αντιπροσωπεύει την % υδρόλυση της αρχικής ποσότητας κυτταρίνης που περιέχεται στην βαγάσση, Cs είναι η συγκέντρωση των σακχάρων (g/L) που

απελευθερώθηκαν κατά την διάρκεια της υδρόλυσης, F είναι ο στοιχειομετρικός συντελεστής που οφείλεται στην ενυδάτωση των μορίων καθώς αυτά υδρολύονται και είναι ίσος με 1,111 για τις εξόζες, CPn_o είναι η σύσταση του αρχικού υλικού σε κυτταρίνη (στην συγκεκριμένη περίπτωση αυτή ήταν 66,8% w/w), WSR είναι ο λόγος νερού προς στερεα (Water to solid ration – εκφράζεται σε g νερού/g υλικού) και τέλος το ρ είναι η πυκνότητα του υδρολύματος (1025 g/L).

3.1 Παραγωγή ενζύμων από τον μύκητα S. thermophile.

Στην διάρκεια αυτής της διαδικασίας έγινε η παραγωγή της απαραίτητης ποσότητας ενζυμικού διαλύματος για την πραγματοποίηση των πειραμάτων ενζυμικής υδρόλυσης που ακολουθούν. Η κινητική αύξησης της ενεργότητας FPA (Filter Paper Activity – FPU/mL) φαίνεται στο διάγραμμα 1. Κατά τις πρώτες ημέρες ανάπτυξης του μύκητα (συγκεκριμένα μέχρι και τις 72 ώρες) η ενεργότητα που μετριόταν ήταν ιδιαίτερα χαμηλή (έφτανε μέχρι 0,06 FPU/mL). Αντίθετα τις δύο επόμενες ημέρες αυτή αυξήθηκε έντονα και την πέμπτη ημέρα έφτασε τα 0,36 FPU/mL. Από προηγούμενα πειράματα που είχαν διεξαχθεί στο εργαστήριο, βρέθηκε ότι η περαιτέρω παραμονή του μύκητα είχε ως αποτέλεσμα την μικρή μείωση της ενεργότητας. Για αυτό τον λόγο αποφασίστηκε να διακοπεί σε αυτό το σημείο η ανάπτυξη του μύκητα και να γίνει παραλαβή των ενζύμων. Η συνολική πρωτεΐνη που μετρήθηκε με βάση την μέθοδο Bradford ήταν 3,27 mg/mL, δίνοντας έτσι μια ειδική ενεργότητα 0,11 FPU/mg πρωτεΐνης.



Διάγραμμα 1: κινητική αύξησης ενεργότητας FPA

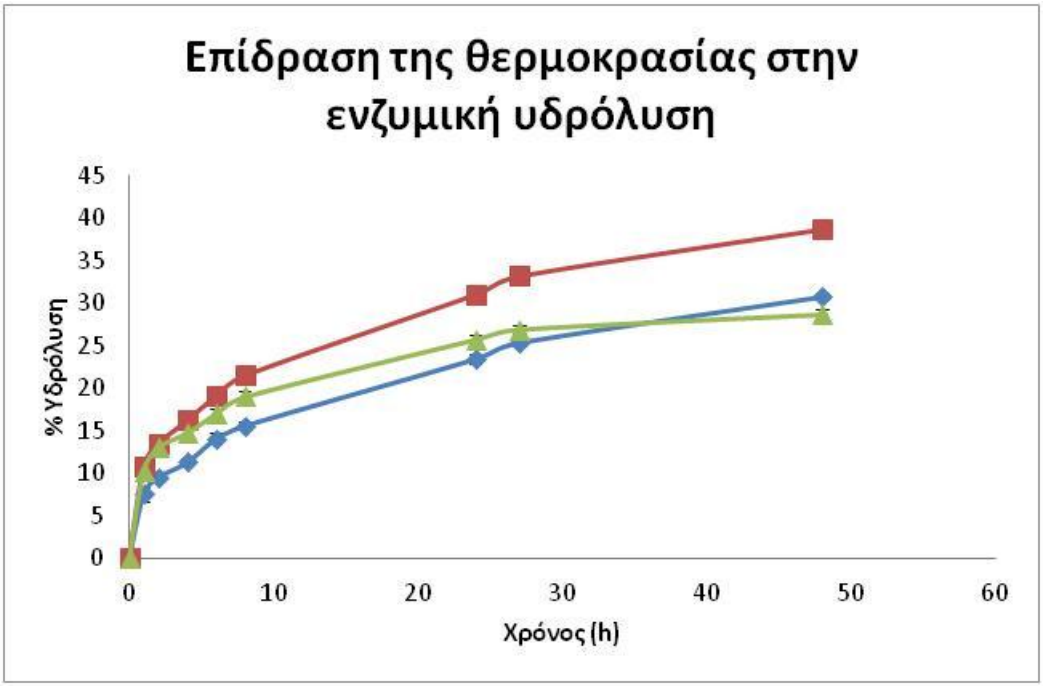
3.2 Πειραματικές Μελέτες

3.2.1 Πείραμα 1ο

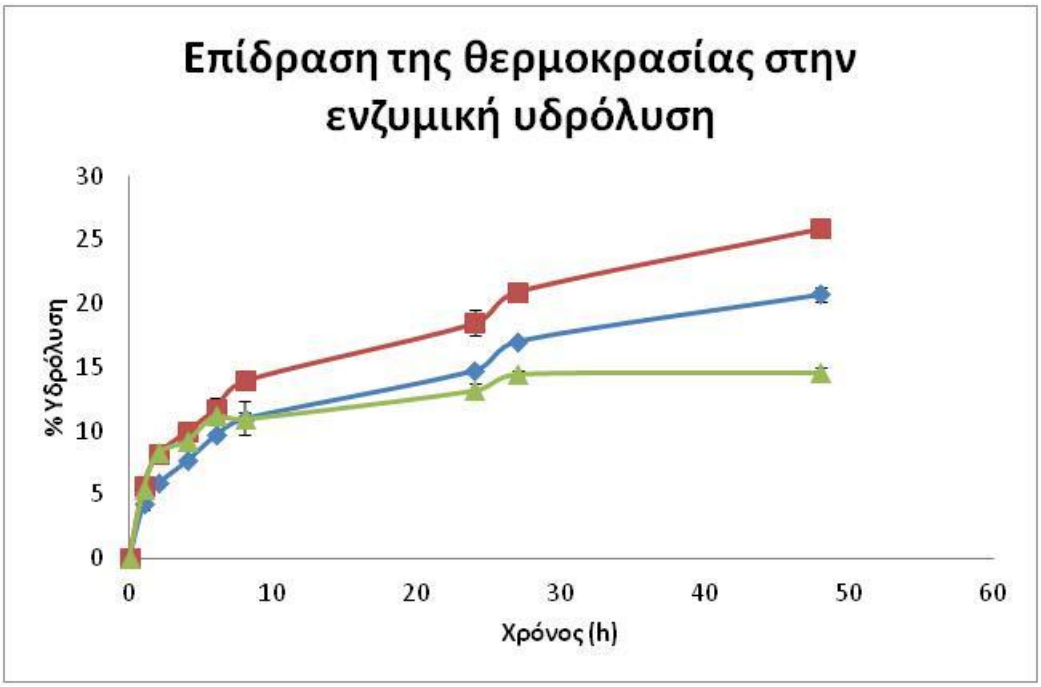
Μελέτη επίδρασης της θερμοκρασίας στην ενζυμική υδρόλυση της βαγάσσης.

Για την μελέτη της υδρόλυσης χρειάστηκαν: υπόστρωμα 3% w/v βαγάσσης και ενεργότητα 10 units/g dry matter (DM) σε buffer 100 mM citrate-phosphate, με pH 5,5. Το εύρος αυτό του θερμοκρασιών χρησιμοποιήθηκε με γνώμονα προηγούμενη δουλειά που είχε πραγματοποιηθεί στο εργαστήριο και αφορούσε την υδρόλυση καθαρής κυτταρίνης σε διάφορες θερμοκρασίες. Ως κατώτερο όριο ορίστηκαν οι 50 °C, μια τυπική θερμοκρασία όπου πραγματοποιούνται οι υδρολύσεις με την χρήση εμπορικών ενζυμικών σκευασμάτων (πχ Celluclast 1.5L) και ως ανώτερο όριο η θερμοκρασία των 65 °C, καθώς από προηγούμενα πειράματα είχε βρεθεί ότι σε θερμοκρασίες μεγαλύτερες των 70 °C, το ενζυμικό σύστημα του μύκητα παρουσιάζει σημαντικές απώλειες σε ενεργότητα. Πραγματοποιήθηκαν δύο τύπου κινητικές. Η πρώτη αφορούσε τον υπολογισμό της υδρόλυσης της κυτταρίνης με βάση τα συνολικά αναγωγικά σάκχαρα (διάγραμμα 2) και η δεύτερη με βάση την γλυκόζη (διάγραμμα 3). Καθότι το

συγκεκριμένο υλικό, έπειτα από ανάλυση σύστασης που έγινε, βρέθηκε να μην περιέχει καθόλου ημι-κυτταρίνη, θεωρείται δόκιμο να χρησιμοποιηθεί και η μέτρηση των ολικών αναγωγικών σακχάρων για τον προσδιορισμό της υδρόλυσης καθώς τα μόνα σάκχαρα που απελευθερώνονται προέρχονται από την κυτταρίνη.



Διάγραμμα 2: επίδραση της θερμοκρασίας στην υδρόλυση με βάση τα ολικά αναγωγικά σάκχαρα για 60oC (κόκκινο), για 50oC (μπλε) και για 65oC (πράσινο)



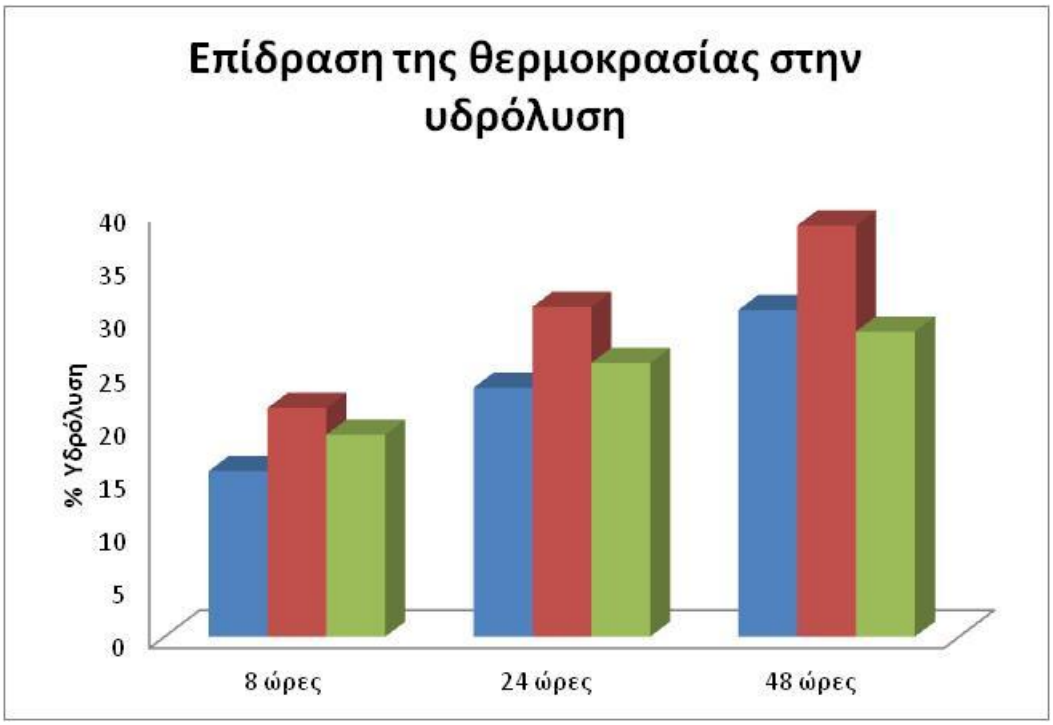
Διάγραμμα 3: επίδραση της θερμοκρασίας στην υδρόλυση με βάση τη γλυκόζη για 60oC (κόκκινο), για 50oC (μπλε) και για 65oC (πράσινο)

Η θερμοκρασία φαίνεται πως έχει σημαντική επίδραση στον ρυθμό υδρόλυσης της κυτταρίνης, όπως παρατηρείται στο παραπάνω διάγραμμα, το οποίο απεικονίζει το ποσοστό της κυτταρίνης που υδρολύθηκε στις τρεις διαφορετικές θερμοκρασίες σε διάρκεια χρόνου 48ωρών. Ωστόσο, η θερμοκρασία εκείνη στην οποία αποδίδεται το μεγαλύτερο ποσοστό υδρόλυσης είναι οι 60 ^oC. Από τις πρώτες ώρες της πειραματικής διαδικασίας, ο ρυθμός του ποσοστού υδρόλυσης των 60 ^oC είναι ήδη μεγαλύτερος. Πιο συγκεκριμένα ο λαμβάνοντας υπόψη τον αρχικό ρυθμό απελευθέρωσης σακχάρων στην μια ώρα , στους 60 ^oC είναι 2,46 g/L˙h, στου 65 ^oC ακολουθεί με 2,33 g/L˙h και τέλος στους 50 ^oC είναι 1,71 g/L˙h.

Ωστόσο, η πορεία γίνεται περισσότερο αντιληπτή στις επόμενες μετρήσεις, δηλαδή μετά τις 24 ώρες, όπου φαίνεται και μία σημαντική αύξηση του ποσοστού της υδρόλυσης για την θερμοκρασία των 60 ^oC. Για τις άλλες θερμοκρασίες, παρατηρείται μία αύξηση για εκείνη των 50 ^oC ενώ για την περίπτωση των 65 ^oC παρατηρείται ότι όσο περνάει ο χρόνος ο ρυθμός υδρόλυσης φθίνει, μέχρι που

πρακτικά μετά τις 24 ώρες να μην πραγματοποιείται κάποια ουσιαστική υδρόλυση. Το γεγονός αυτό πιθανότατα να οφείλεται στην απενεργοποίηση των ενζύμων υπό την επίδραση αυτής της θερμοκρασίας. Σαν αποτέλεσμα έχουμε, ότι ενώ στην αρχή η υδρόλυση πραγματοποιούνταν με ταχύτερους ρυθμούς στην περίπτωση των 65 ^oC σε σχέση με τους 50 ^oC, μετά τις 27 ώρες, η απόδοση της υδρόλυσης στους 50 ^oC να είναι υψηλότερη. Παρόμοιας φύσης αποτελέσματα ελήφθησαν και κατά του καθορισμό της υδρόλυσης με βάση την μέτρηση της γλυκόζης, με την μόνη διαφορά ότι από τις 8 κιόλας ώρες, η απόδοση της υδρόλυσης στους 50 ^oC να είναι μεγαλύτερη σε σχέση με τους 65 ^oC. Αυτό το γεγονός πιθανών να οφείλεται στο ότι η β-γλυκοσιδάση που περιέχονταν στο ενζυμικό διάλυμα απενεργοποιήθηκε ενωρίτερα σε σχέση με άλλες ενζυμικές ενεργότητες.

Από τα διαγράμματα των δύο μεθόδων προκύπτει το συμπέρασμα ότι η θερμοκρασία, η οποία είναι η βέλτιστη για την υδρόλυση της βαγάσσης από το ενζυμικού μίγματος από τον S. thermophile είναι οι 60 ^oC, τόσο σε αρχικούς χρόνους υδρόλυσης όσο και μετά το πέρας αρκετών ωρών, όπως μπορεί να φανεί και στο διάγραμμα 4. Σαν αποτέλεσμα, στα μετέπειτα πειράματα αποφασίστηκε να χρησιμοποιείται αποκλειστικά η θερμοκρασία των 60 ^oC. Τέλος, συμπερασματικά μπορούμε να πούμε ότι το ενζυμικό σύστημα του μύκητα S. thermophile μπορεί να χρησιμοποιηθεί σε μια διεργασία SHF που θα πραγματοποιείται σε υψηλότερη θερμοκρασία (60 ^oC) σε σχέση με την συνήθως χρησιμοποιούμενη θερμοκρασία των 50 ^oC. Επίσης ένα σημαντικό συμπέρασμα που βγήκε από το συγκεκριμένο πείραμα, είναι η ικανότητα του ενζυμικού συστήματος του μύκητα να υδρολύει σε ικανοποιητικό βαθμό για αυξημένο χρονικό διάστημα.



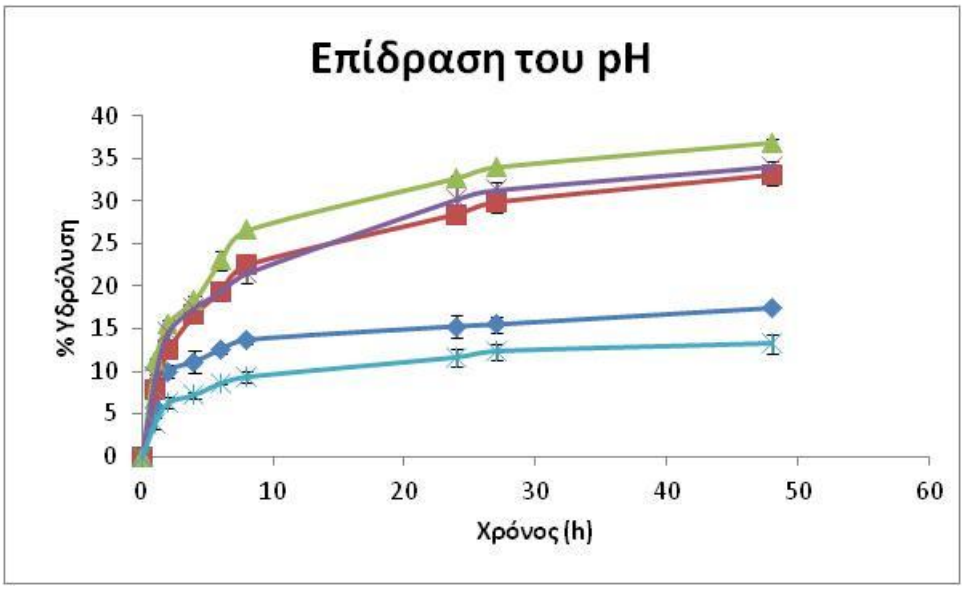
Διάγραμμα 4: επίδραση της θερμοκρασίας στην υδρόλυση σε σχέση με το χρόνο, για τους 60ºC (κόκκινο), για τους 50ºC (μπλε) και για τους 65ºC (πράσινο)

3.2.2 Πείραμα 2º

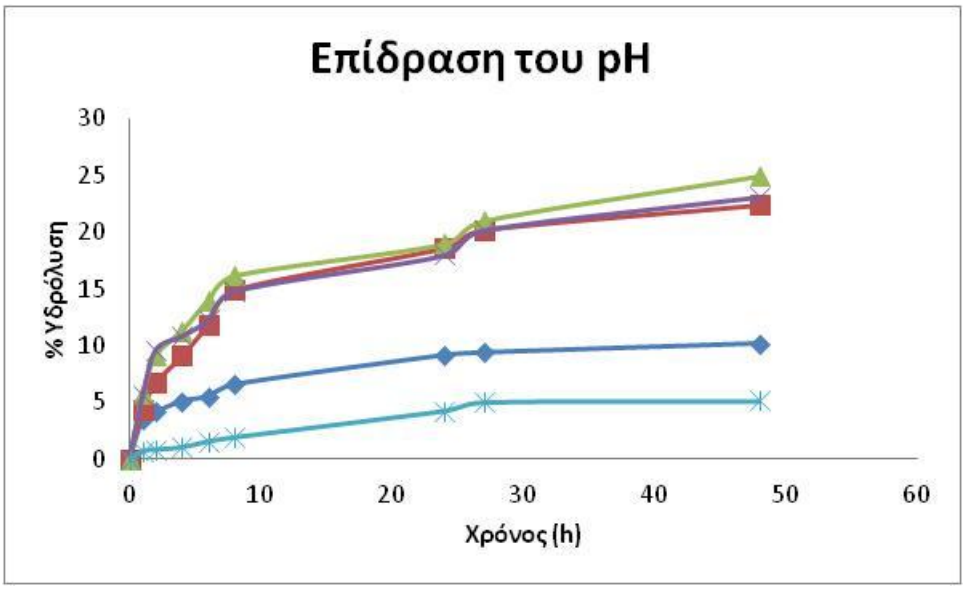
<u>Μελέτη της επίδρασης του pH στην ενζυμική υδρόλυση της βαγάσσης.</u>

Σε eppendorf των 1,5ml πραγματοποιήθηκε υδρόλυση της κυτταρίνης που περιέχεται στην βαγάσση σε συγκέντρωση 3% w/v. Το pH ρυθμίστηκε με την χρήση buffer 100 mM citrate-phosphate στις επιθυμητές τιμές. Οι τιμές pH που χρησιμοποιήθηκαν στην παρούσα μελέτη ήταν: 4-5-5,5-6-7. Η υδρόλυση πραγματοποιήθηκε στους 60 ºC με αρχική συγκέντρωση ενζύμου τέτοια ώστε να επιτυγχάνεται ενεργότητα ίση με 10FPU/g DM.

Όπως και στο προηγούμενο πείραμα, χρησιμοποιήθηκαν δύο στρατηγικές όσον αφορά του προσδιορισμό της % υδρόλυσης της περιέχουσας στην βαγάσση κυτταρίνη. Τα αποτελέσματα αυτά φαίνονται στα διαγράμματα 5 και 6 .



Διάγραμμα 5: επίδραση pH στην υδρόλυση με βάση τα ολικά αναγωγικά σάκχαρα (DNS), για pH 4 (μπλε), 5 (κόκκινο), 5.5 (πράσινο), 6 (μωβ) και 7 (γαλάζιο)



Διάγραμμα 6: επίδραση pH στην υδρόλυση με βάση τη γλυκόζη για pH 4 (μπλε), 5 (κόκκινο), 5.5 (πράσινο), 6 (μωβ) και 7 (γαλάζιο)

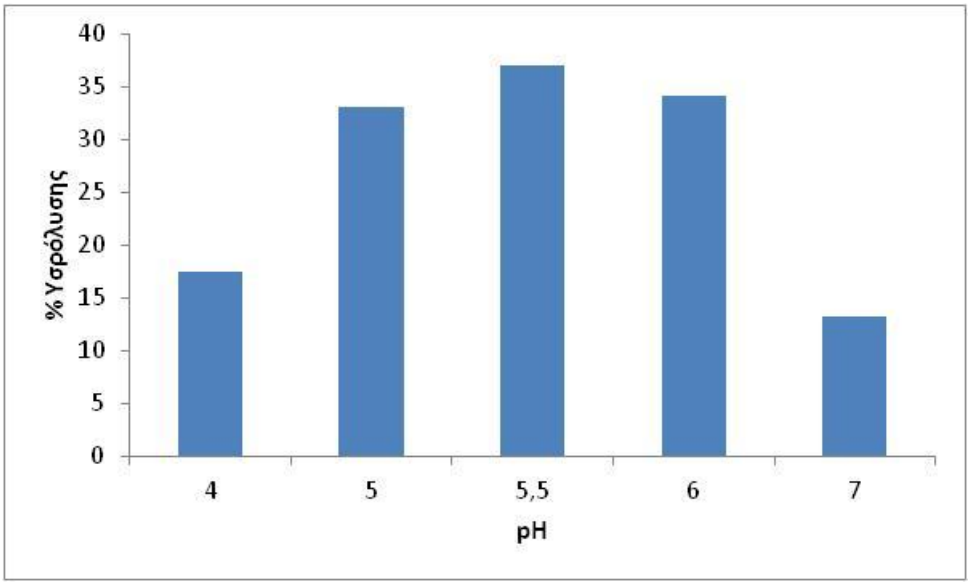
Από το διάγραμμα, γίνεται αντιληπτό ότι η επίδραση του pH είναι ιδιαίτερα σημαντική, καθώς για διαφορά μιας μονάδας, το ποσοστό υδρόλυσης αλλάζει σε αρκετά σημαντικό βαθμό. Συγκεκριμένα, για την μετατροπή του pH από 4 σε 5, το ποσοστό υδρόλυσης μεταβάλλεται από 17,4% σε 33,1%, δηλαδή αύξηση της υδρόλυσης κατά 47%.

Πιο συγκεκριμένα, ο αρχικός ρυθμός απελευθέρωσης σακχάρων καθώς και η τελική υδρόλυση της κυτταρίνης φαίνονται στον πίνακα 3 .

Πίνακας 4: ποσοστό υδρόλυσης σε σύγκριση με pH

pH	Αρχικός ρυθμός παραγωγής σακχάρων (g/L·h)	% Υδρόλυση
4	1,30	17,4
5	1,79	33,1
5,5	2,56	36,9
6	2,14	34,1
7	0,90	13,2

Όπως είναι φανερό, η τιμή pH, στην οποία παρατηρείται ο μέγιστος αρχικός ρυθμός παραγωγής σακχάρων (2,56g/Lh) ταυτόχρονα και το μέγιστο ποσοστό υδρόλυσης της κυτταρίνης της βαγάσσης (36,9%), είναι για pH 5,5. Η πιο πάνω σχέση γίνεται πιο εύκολα αντιληπτή από το διάγραμμα 7:



Διάγραμμα 7: σύγκριση τιμών pH ως προς το ποσοστό υδρόλυσης

Ένα ενδιαφέρον συμπέρασμα που προκύπτει από την μέτρηση της συγκέντρωσης της απελευθερωμένης γλυκόζης είναι το γεγονός ότι όταν το pH ρυθμίστηκε στο 7, η απελευθέρωση ήταν ιδιαίτερα χαμηλή (σε σχέση με τις άλλες τιμές pH). Πιο συγκεκριμένα, το κλάσμα της γλυκόζης έναντι των συνολικών αναγωγικών σακχάρων έφτασε το 58,4% σε pH 4, το 67,7% σε pH 5, το 67,5% σε pH 5,5, το 67,8% σε pH 6, ενώ σε pH 7 μόλις το 38,6%. Μπορεί λοιπόν να εξαχθεί το συμπέρασμα ότι η περιέχουσα β-γλυκοσιδάση επηρεάζεται πιο έντονα από την αύξηση του pH, με αποτέλεσμα να δίνει μειωμένη απόδοση σε απελευθέρωση γλυκόζης, γεγονός που πιθανώς να εξηγεί και εν μέρει την μειωμένη δραστικότητα του ενζυμικού συστήματος σε αυτήν την τιμή pH.

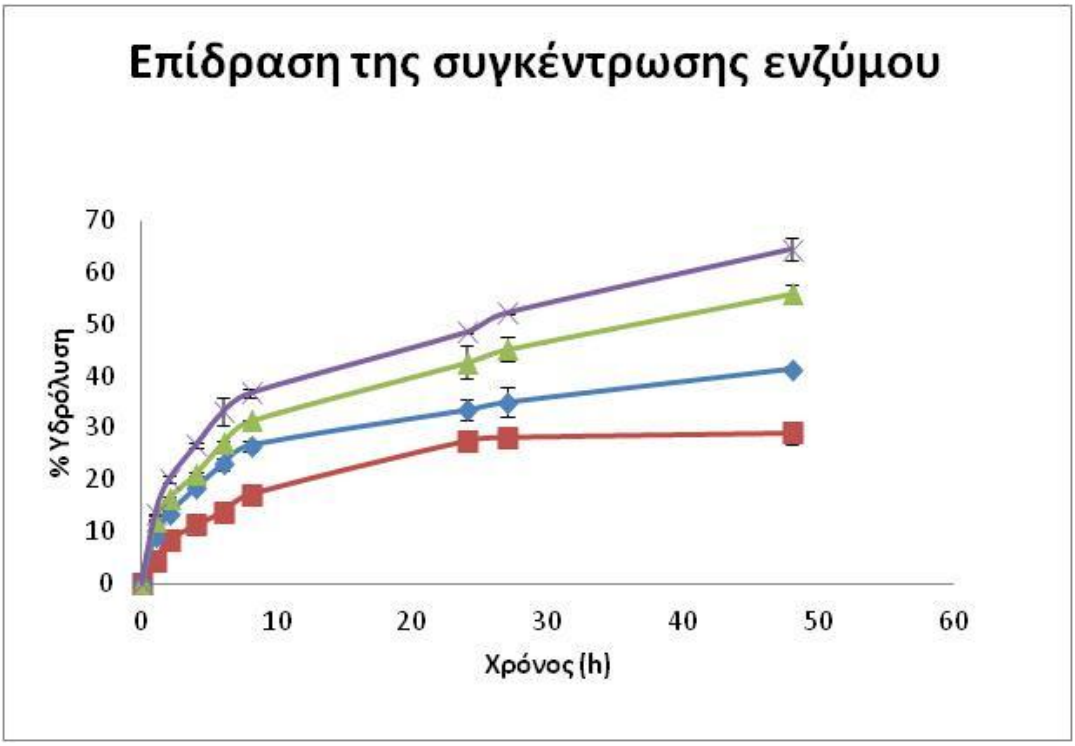
Από όλα τα παραπάνω γίνεται αντιληπτό ότι για την βέλτιστη δράση του ενζυμικού συστήματος, πρέπει να καθορίζεται και η τιμή pH, στην οποία παρατηρείται ο μέγιστος ρυθμός υδρόλυσης. Για το συγκεκριμένο ενζυμικό σύστημα του S. thermophile, η τιμή αυτή ορίστηκε στο 5,5 και από δω και πέρα αυτή η τιμή χρησιμοποιήθηκε για τα ακόλουθα πειράματα.

3.2.3 Πείραμα 3ο

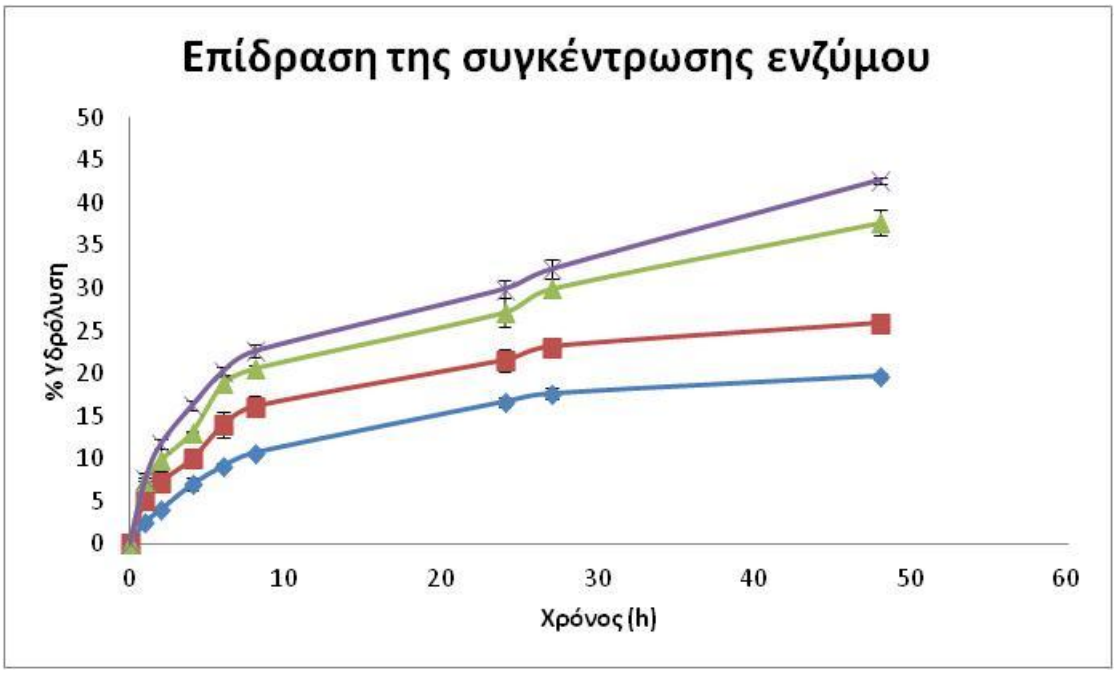
<u>Μελέτη της επίδρασης της ενεργότητας των ενζύμων ανά μονάδα υποστρώματος στην υδρόλυση της βαγάσσης:</u>

Για κάθε τιμή FPU, η θερμοκρασία της διαδικασίας της υδρόλυσης ήταν στους 60 ^{o}C και το pH στην τιμή 5,5. Σε κάθε περίπτωση οι αντιδράσεις πραγματοποιήθηκαν σε buffer 100 mM citrate-phophate και γινόταν κατάλληλη προσθήκη ενζύμου ούτως ώστε να επιτευχθεί η επιθυμητή ενεργότητα ανά μονάδα υποστρώματος (FPU/g DM). Συγκεκριμένα χρησιμοποιήθηκαν οι ακόλουθες ενεργότητες: 5, 10, 20 και 40 FPU/g DM.

Όπως και στο προηγούμενο πείραμα, χρησιμοποιήθηκαν δύο στρατηγικές όσον αφορά τον προσδιορισμό της % υδρόλυσης της περιέχουσας στην βαγάσση κυτταρίνης. Τα αποτελέσματα αυτά φαίνονται στα διαγράμματα 8 και 9.



Διάγραμμα 8: επίδραση της συγκέντρωσης του ενζύμου με βάση τα ολικά σάκχαρα (DNS), για ενεργότητες 5FPU (κόκκινο), 10FPU (μπλε), 20FPU (πράσινο) και 40FPU(μωβ)

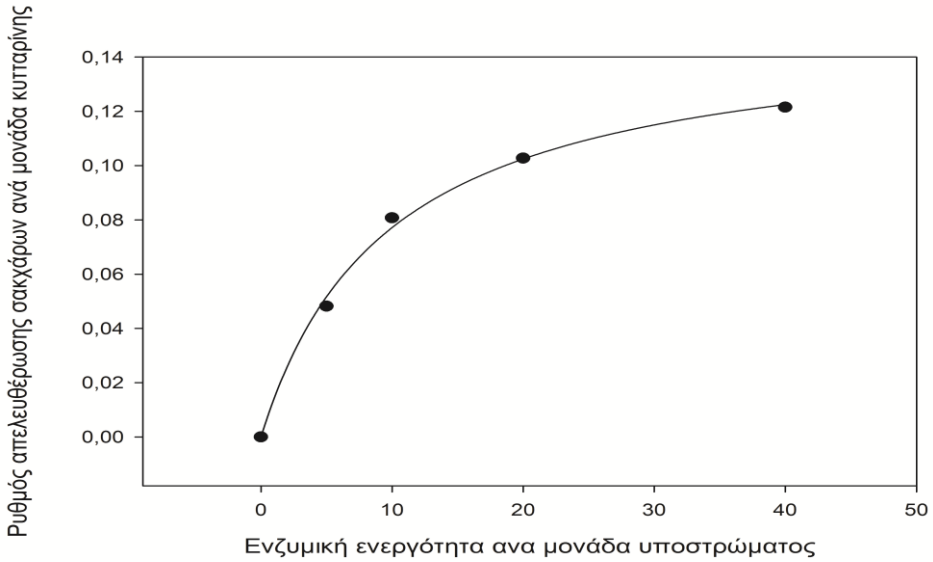


Διάγραμμα 9: επίδραση της συγκέντρωσης του ενζύμου με βάση τη γλυκόζη (glucotest), για ενεργότητες 5FPU (κόκκινο), 10FPU (μπλε), 20FPU (πράσινο) και 40FPU(μωβ)

Από τα παραπάνω διαγράμματα, παρατηρείται ότι όσο αυξάνεται η ενεργότητα του ενζύμου, τόσο περισσότερο αυξάνεται και ο ρυθμός της υδρόλυσης, γεγονός που δείχνει ότι η ποσότητα των ενζύμων φαίνεται πως επιδρά θετικά στην τελική υδρόλυση. Πιο συγκεκριμένα, για ενεργότητα 40 FPU/g είχαμε ποσοστό μετατροπής 64%, για 20 FPU/g είχαμε 56%, για 10 FPU/g 41% και για 5 FPU/g 29%.

Μπορεί επίσης να γίνει αντιληπτό ότι με την προσθήκη υψηλότερων ποσοτήτων ενζύμου, η ενζυμική υδρόλυση διατηρείται σε υψηλά επίπεδα ακόμα και μετά το πέρας αρκετών ωρών. Επίσης από την σύγκριση των δύο διαγραμμάτων (τόσο των ολικών αναγωγικών σακχάρων όσο και της γλυκόζης), προκύπτει ότι δεν υπάρχει ουσιαστική διαφορά μεταξύ τους, συμπεραίνοντας έτσι ότι οι διάφορες ενζυμικές ενεργότητες που εμπεριέχονται στο σκεύασμα δεν επηρεάζονται με διαφορετικό τρόπο κατά την αύξηση της συγκέντρωσης του ενζύμου.

Το διάγραμμα 10 δείχνει την σχέση μεταξύ του αρχικού ρυθμού απελευθέρωσης ανά μονάδα όγκου κυτταρίνης σε σχέση με την ενεργότητα ανά μονάδα υποστρώματος. Για να υπολογιστούν οι αρχικοί ρυθμοί απελευθέρωσης των σακχάρων χρησιμοποιήθηκαν μόνο τα γραμμικά τμήματα των ενζυμικών υδρολύσεων (με R^2>0.92).



Διάγραμμα 10: σχέση αρχικού ρυθμού απελευθέρωσης κυτταρίνης με την ενεργότητα ενζύμου

Εφαρμόζοντας την εξίσωση μορφής Langmuir (Drissen et al., 2007):

$$r = \frac{K_{\max} \cdot C_E}{K_L + C_E} \cdot C_C \qquad \text{Εξ. 1}$$

όπου, r είναι ο αρχικός ρυθμός απελευθέρωσης σακχάρων (g/L·h), K_{max} είναι η σταθερά που ορίζει τον μέγιστο ρυθμό (h^{-1}) σε συνθήκες πλήρους κορεσμού του υποστρώματος από το ένζυμο, C_E είναι η ενεργότητα του ενζύμου ανά μονάδα υποστρώματος (FPU/g), C_C είναι η συγκέντρωση της κυτταρίνης ανά μονάδα βαγάσσης (g/g) και K_L είναι ο συντελεστής προσρόφησης κατά Langmuir (FPU/g). Εφαρμόζοντας την παραπάνω εξίσωση στα πειραματικά δεδομένα, προκύπτει μια εξίσωση της μορφής:

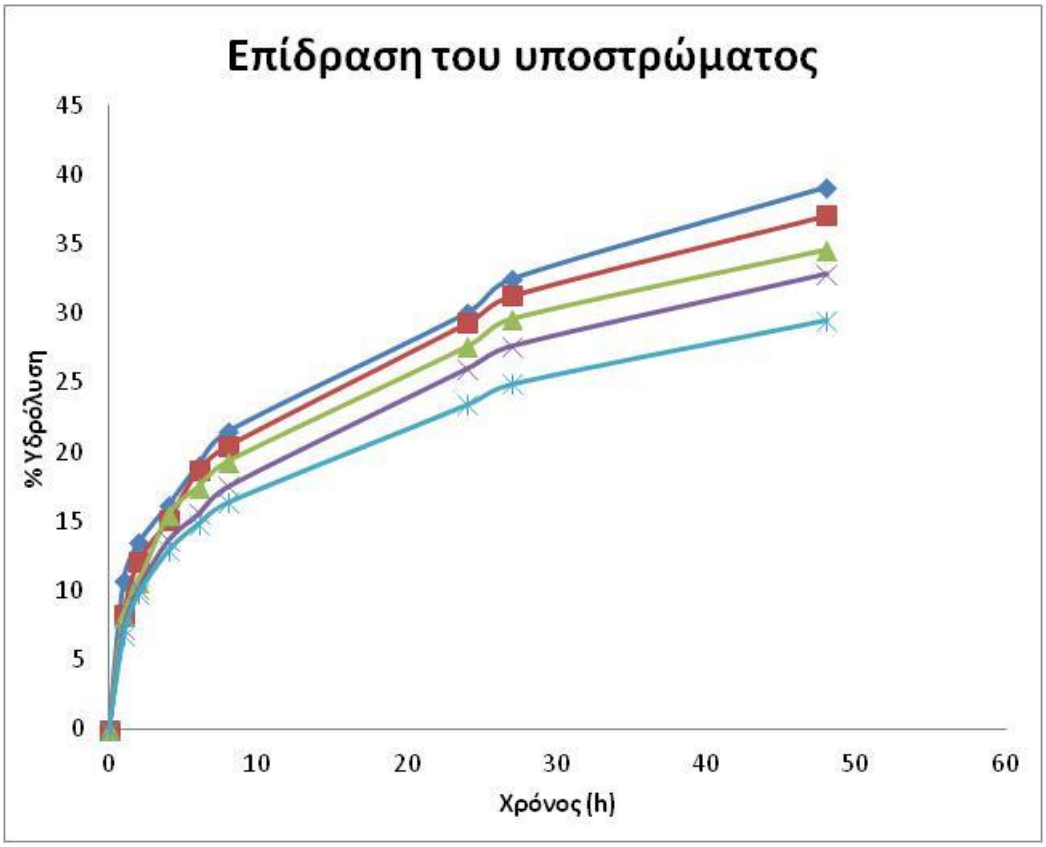
$$r = \frac{0.1523 \cdot C_E}{9.7243 + C_E} \cdot C_C \qquad \text{Εξ. 2}$$

Με την βοήθεια του προγράμματος SigmaPlot 12, υπολογίστηκε το R^2=0.9972 και p<0.0001. Επίσης προκύπτουν K_{max}=0,15h^{-1} (p=0.0001) και K_L=9,72FPU L^{-1} (p=0.0028). Από πειράματα, που πραγματοποιήθηκαν για την μελέτη της επίδρασης της ενεργότητας του ενζύμου στην υδρόλυση σε άχυρο σίτου, οι αντίστοιχες τιμές των συντελεστών προέκυψαν k_{max}=0.140 h^{-1} και K_L=18.2 FPU L^{-1}. Για τα δύο υποστρώματα, οι τιμές του συντελεστή K_{max} είναι παραπλήσιες, ενώ για το άχυρο σίτου η σταθερά προσρόφησης K_L είναι διπλάσια από εκείνη της βαγάσσης (Drissen et al., 2007). Αυτές οι σταθερές μπορούν να περιγράψουν τον αρχικό ρυθμό αντίδρασης των ενδο- και εξω-γλουκανασών στην ενζυμική υδρόλυση, δηλαδή την ενεργότητα των κυτταρινασών.

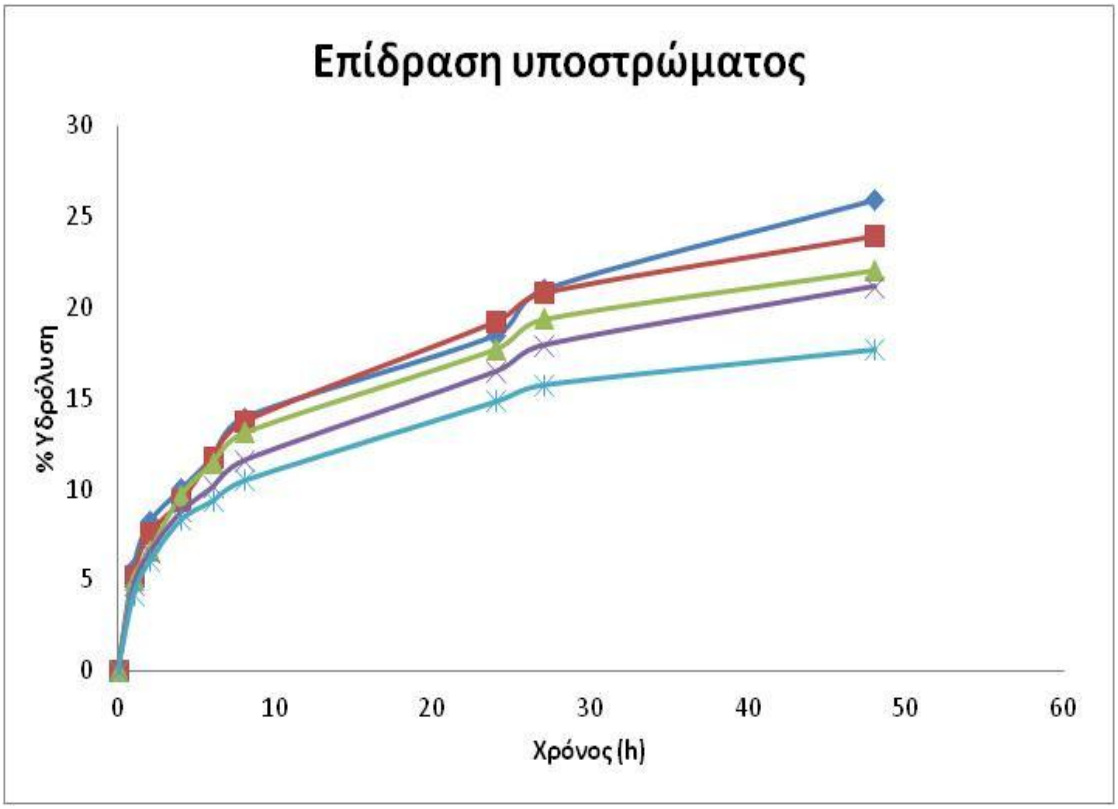
3.2.4 Πείραμα 4ο

Μελέτη της επίδρασης της αρχικής συγκέντρωσης του υποστρώματος στην ενζυμική υδρόλυσης της βαγάσσης.

Σε κάθε ποσότητα υποστρώματος βαγάσσης σε 1,5ml μίγματος, η θερμοκρασία παρέμενε σταθερή στους 60 °C, το pH=5,5 και η ενεργότητα ενζύμου 10FPU/g DM. Τα αποτελέσματα της υδρόλυσης της περιέχουσας στην βαγάσση κυτταρίνης, φαίνονται στα διαγράμματα 11 και 12. Οι αρχικές συγκεντρώσεις του υποστρώματος που χρησιμοποιήθηκαν ήταν 3, 6, 9, 12 και 15% w/v.



Διάγραμμα 11: επίδραση του υποστρώματος στην υδρόλυση με βάση τα ολικά αναγωγικά σάκχαρα (DNS) για ποσότητα βαγάσσης 3%w/v (μπλε), 6% (κόκκινο), 9% (πράσινο), 12% (μωβ) και 15% (γαλάζιο)



Διάγραμμα 12: επίδραση του υποστρώματος στην υδρόλυση με βάση τη γλυκόζη (glucotest) για ποσότητα βαγάσσης 3%w/v (μπλε), 6% (κόκκινο), 9% (πράσινο), 12% (μωβ) και 15% (γαλάζιο)

Όπως γίνεται εύκολα αντιληπτό, η αύξηση της αρχικής συγκέντρωσης του υποστρώματος, οδηγεί σε σταδιακή μείωση της υδρόλυσής του. Μπορούμε επίσης να παρατηρήσουμε ότι η σχέση που διέπει την μείωση αυτή είναι γραμμική (όπως φαίνεται και στο διάγραμμα 13) και ακολουθεί την σχέση:

$$Eh = -0.7793 \cdot C_S + 41.64 \qquad \text{Εξ.3}$$

όπου με Eh συμβολίζεται η % υδρόλυση της κυτταρίνης που περιέχεται στην βαγάσση και με C_S συμβολίζεται η συγκέντρωση του υποστρώματος (w/v). Πιο συγκεκριμένα η υδρόλυση στο 3% w/v ήταν 39,11%, στο 6% w/v ήταν 37,09%, στο 9% w/v ήταν 34,56%, στο 12% w/v ήταν 32,89 % και τέλος στο 15% w/v ανήλθε στο 29,52%. Εδώ πρέπει επίσης να παρατηρηθεί ότι δεν υπήρχαν ουσιαστικές διαφορές μεταξύ του ρυθμού απελευθέρωσης των ολικών αναγωγικών σακχάρων και της γλυκόζης. Μπορεί έτσι να βγει το συμπέρασμα ότι όλες οι ενζυμικές δράσεις επηρεάζονται με τον ίδιο τρόπο από την αυξανόμενη συγκέντρωση υποστρώματος.

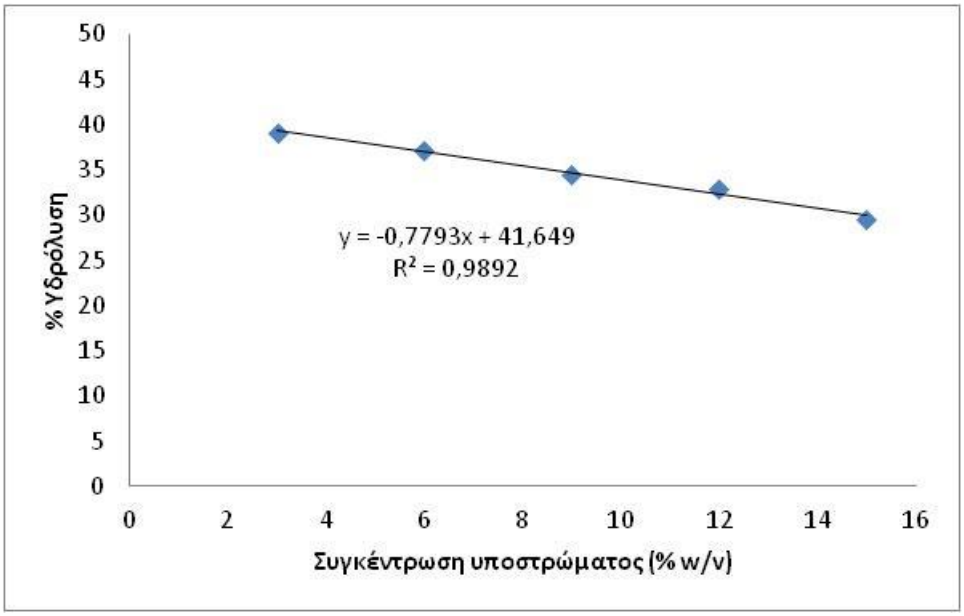
Ο πιο πιθανός λόγο που παρατηρείται αυτή η διαρκώς μειούμενη υδρόλυση είναι η παρεμπόδιση που ασκείται από την απελευθερούμενη γλυκόζη. Όπως φαίνεται εξάλλου από το διάγραμμα 14 υπάρχει μια γραμμική σχέση μεταξύ τόσο του ρυθμού απελευθέρωσης σακχάρων όσο και του ρυθμού απελευθέρωσης γλυκόζης κατά την πρώτη ώρα σε σχέση με την συγκέντρωση του υποστρώματος, όπως περιγράφεται από τις σχέσεις:

$$C_{TRS} = 0.5567 \cdot C_S \qquad \text{Εξ. 4}$$

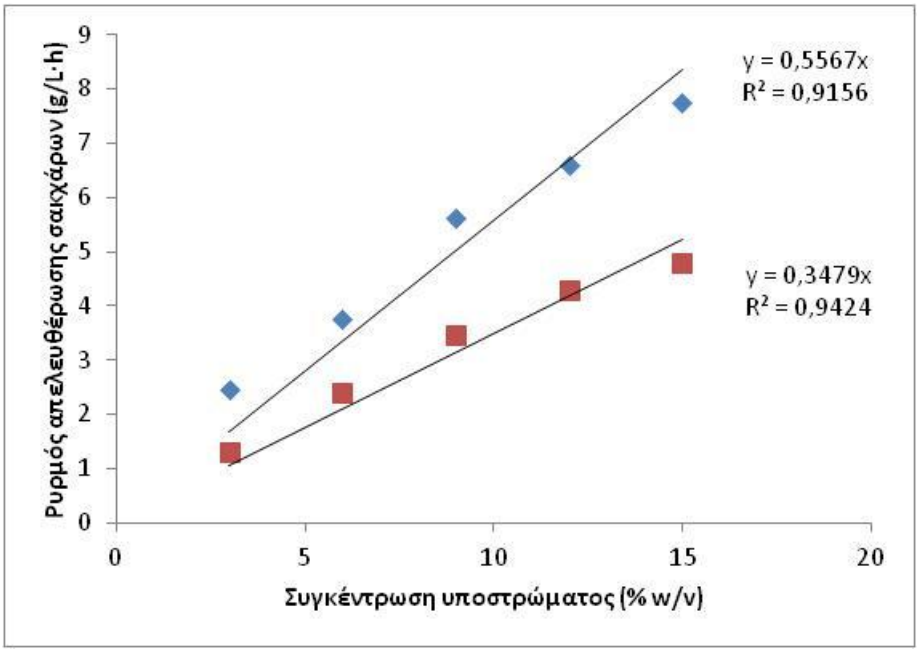
$$C_G = 0.3479 \cdot C_S \qquad \text{Εξ. 5}$$

όπου, C_{TRS} είναι η συγκέντρωση των απελευθερούμενων ολικών αναγωγικών σακχάρων (g/L), C_G είναι η συγκέντρωση της απελευθερούμενης γλυκόζης (g/L) και C_S η συγκέντρωση της βαγάσσης (% w/v). Σε αυτό το σημείο πρέπει να σημειωθεί ότι παρόμοιας φύσεως μείωση της υδρόλυσης υποστρώματος με αυξανόμενη συγκέντρωση της πρώτης ύλης, έχει αναφερθεί και από τους Jorgensen et al (2007).

Αξίζει εδώ να σημειωθεί, ότι λόγω της φύσεως του υποστρώματος, όσο αυξάνεται η αρχική συγκέντρωση του, μειώνεται σημαντικά η ποσότητα του διαθέσιμου υγρού και η διαδικασία της υδρόλυσης καθίσταται ιδιαιτέρως δύσκολη σε epperdorf, καθώς η ανάδευση του δείγματος είναι ανεπαρκής. Σε αυτές τις συνθήκες η δυνατότητα των ενζύμων να έρχονται σε επαφή διαρκώς με την κυτταρίνη, είναι μικρή, καθώς λόγω περιορισμένου διαθέσιμου υγρού, η 'κίνηση' των ενζύμων είναι μειωμένη. Στην εικόνα 18 φαίνεται δείγμα αρχικής συγκεντρώσεως 18 % w/v, όπου τελικά δεν χρησιμοποιήθηκε για την πραγματοποίηση πειραμάτων υδρόλυσης σε epperdorf καθώς δεν υπήρχε δυνατότητα σωστής αναδεύσεως.



Διάγραμμα 13: γραμμική σχέση ρυθμού υδρόλυσης με συγκέντρωση υποστρώματος βαγάσσης



Διάγραμμα 14: γραμμική σχέση του ρυθμού απελευθέρωσης ολικών σακχάρων (μπλε) και της γλυκόζης (κόκκινο) κατά την πρώτη ώρα, με τη συγκέντρωση του υποστρώματος

Εικόνα 18: δείγμα βαγάσσης σε συγκέντρωση 18% w/v

Από όλα τα παραπάνω φαίνεται η δυνατότητα του ενζυμικού συστήματος του μύκητα να υδρολύει επαρκώς υψηλές αρχικές συγκεντρώσεις βαγάσσης. Για να επιτευχθεί όμως σωστή υδρόλυση, αυτή θα πρέπει να πραγματοποιηθεί σε συστήματα όπου θα γίνεται επαρκής ανάδευση, ούτως ώστε τα ένζυμα να έρχονται πιο άμεσα σε επαφή με την κυτταρίνη.

3.2.5 Πείραμα 5ο

<u>Προσδιορισμός του συντελεστή παρεμπόδισης εκ του προϊόντος (K_{IG})</u>

Κατά την υδρόλυση της κυτταρίνης, το τελικό προϊόν της μετατροπής της κυτταρίνης είναι η κελλοβιόζη και κατ΄επέκταση η γλυκόζη. Η κελλοβιόζη και η γλυκόζη, είναι γνωστό ότι αποτελούν παρεμποδιστές στη δράση των κυτταρινολυτικών ενζύμων, συμπεριλαμβανομένων εκείνων που προέρχονται από τους μύκητες , αλλά και της β-γλυκοζιδάσης. Συγκεκριμένα, η γλυκόζη

αναστέλλει άμεσα τη β-γλυκοζιδάση, αλλά επίσης και τις κελοβιοϋδρολάσες και ενδογλουκανάσες, ενώ η κελλοβιόζη αναστέλλει άμεσα τις κελοβιοϋδρολάσες και ενδογλουκανάσες. Μέσω της αναστολής της β-γλυκοσιδάσης, η οποία οδηγεί στη συσσώρευση κελλοβιόζης, η γλυκόζη με τη σειρά της, αναστέλλει έμμεσα τις κελοβιοϋδρολάσες και τις ενδογλουκανάσες. Η αναστολή από τα προϊόντα της ενζυμικής αποικοδόμησης της λιγνοκυτταρίνης είναι ένας από τους πιο σημαντικούς παράγοντες που μειώνουν το ποσοστό της υδρόλυσης και των αποδόσεων των προϊόντων. Η ποσοτική γνώση σχετικά με την αναστολή από το προϊόν, τη γλυκόζη, είναι επομένως υψίστης σημασίας για τη σωστή επιλογή, τον σχεδιασμό, την προσομοίωση και τη βελτιστοποίηση των αντιδραστήρων της ενζυμικής υδρόλυσης για τη μετατροπή της λιγνοκυτταρίνης. Αυτό είναι ιδιαίτερα σημαντικό σε ξεχωριστές υδρολύσεις και συστήματα ζύμωσης, κατά τα οποία, η γλυκόζη συσσωρεύεται καθώς η αντίδραση προχωρά και λιγότερο σημαντικό στην ταυτόχρονη υδρόλυση και ρύθμιση της ζυμώσεως, στην οποία το επίπεδο της γλυκόζης είναι πολύ χαμηλό, λόγω της σχεδόν στιγμιαίας κατανάλωσής του από την ζύμωση του μικροοργανισμού. Επομένως, η προσθήκη γλυκόζης στην αντίδραση της υδρόλυσης έχει ως αποτέλεσμα την μεγαλύτερη παρεμπόδιση της δράσης των ενζύμων που λαμβάνουν μέρος σε αυτή. Η παρούσα πειραματική μελέτη εκπονήθηκε προκειμένου να διερευνηθεί η σημασία της αναστολής της γλυκόζης κατά τη διάρκεια της υδρόλυσης της υδροθερμικά προκατεργασμένης βαγάσσης, όπως αυτή καταλύθηκε από το ενζυμικό σύστημα του μύκητα S. thermophile. Επιπλέον, μελετήθηκε η κινητική της εξίσωσης του σχηματισμού της γλυκόζης στην υδρόλυση της αδιάλυτης κυτταρίνης, με τον προσδιορισμό της σταθεράς παρεμπόδισης K_i. Οι κινητικές αυτές αντιπροσωπεύουν μία αλληλεπίδραση μεταξύ του αναστολέα (στην περίπτωση αυτή, της γλυκόζης) και της σταθεράς παρεμπόδισης αναστολέα-ενζύμου.

Για να μπορέσει να γίνει ο προσδιορισμός του συντελεστή K_i, πραγματοποιήθηκε υδρόλυση βαγάσσης 3% w/v, παρουσία διαφόρων συγκεντρώσεων γλυκόζης.

Συγκεκριμένα χρησιμοποιήθηκαν 0, 10, 20, 40 και 60 g/L. Οι αντιδράσεις πραγματοποιήθηκαν στους 60°C σε buffer 100 mM citrate-phosphate pH 5,5. Για να μπορέσει να γίνει ο προσδιορισμός του συντελεστή Ki, μετρήθηκε μόνο η απελευθέρωση της γλυκόζης και όχι των συνολικών αναγωγικών σακχάρων, καθώς η γλυκόζη αποτελεί το τελικό προϊόν της συνολικής ενζυμικής δραστηριότητας των κυτταρινασών. Χρησιμοποιήθηκε ο αρχικός ρυθμός υδρόλυσης, ο οποίος προέκυψε από το αρχικό γραμμικό κομμάτι της υδρόλυσης (R^2>0.92). Με αυτόν τον τρόπο προέκυψε το διάγραμμα 15, όπου περιγράφει την σχέση μεταξύ του ρυθμού παραγωγής γλυκόζης και της αρχικής συγκέντρωσης γλυκόζης στο διάλυμα. Για τον προσδιορισμό του συντελεστή Ki, χρησιμοποιήθηκε η ακόλουθη εξίσωση (Xiros et al., 2009):

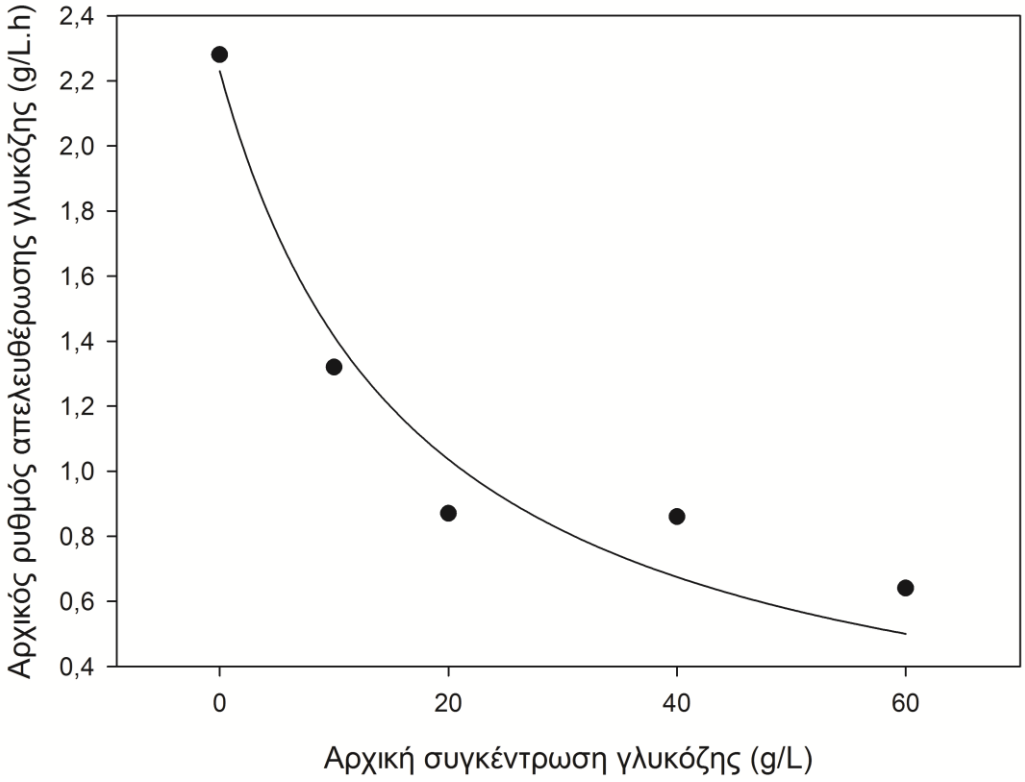
$$r = r_{(0)} \frac{K_{IG}}{K_{IG} + C_G} \qquad \text{Εξ. 6}$$

Όπου r είναι ο ρυθμός απελευθέρωσης γλυκόζης (g/L·h), C_G είναι η συγκέντρωσης της γλυκόζης που προστέθηκε στην αρχή της αντίδρασης και K_{IG} είναι ο συντελεστής παρεμπόδισης από τη γλυκόζη. Εφαρμόζοντας την εξίσωση στα πειραματικά δεδομένα που προέκυψαν με την βοήθεια του προγράμματος SigmaPlot 12, προέκυψε η εξίσωση:

$$r = 2.23 \frac{17.36}{17.36 + C_G} \qquad \text{Εξ. 7}$$

Το R^2 υπολογίστηκε σε 0,9460 και το p-value ίσο με 0,0054. Επίσης προέκυψε ότι ο συντελεστή K_{IG} είναι ίσος με 17,36 g/L. Οι πρότυπες τιμές για την σταθερά αναστολής για τη γλυκόζη (k_{IG}) σε άχυρο σίτου κυμαινόταν από 0,18 έως 1,2 g γλυκόζης ανά λίτρο. Αυτό το εύρος ήταν σημαντικά χαμηλότερο από τις τιμές k_{IG} που είχαν, προηγουμένως, αναφερθεί για τον μύκητα T. reesei, οι οποίες κυμαίνονταν από 12 έως 319 g / L. Ωστόσο, οι τιμές του συντελεστή k_{IG} ήταν σε

καλή συμφωνία με τις διαθέσιμες τιμές για την αναστολή της γλυκόζης της β-γλυκοζιδάσης από A. niger, που έχει εύρος 0,3 έως 0,5 g / L. Αυτό δείχνει ότι το μοντέλο της κινητικής εξίσωσης μπορεί, στην πραγματικότητα, να έχει ποσοτικοποιήσει κυρίως την παρεμπόδιση της β-γλυκοζιδάσης στο ενζυμικό σύστημα, που μελετήθηκε [Pavle Andrie et al.,2009].



Διάγραμμα 15: σχέση ρυθμού παραγωγής με την αρχική συγκέντρωση της γλυκόζης

3.2.6 Πείραμα 6ο

<u>Μελέτη της ανθεκτικότητας του υποστρώματος με τον προσδιορισμό της σταθεράς K_{rec}.</u>

Με τον προσδιορισμό του συντελεστή K_{rec}, μελετάται η ικανότητα που παρουσιάζει το υπόστρωμα, δηλαδή στην συγκεκριμένη περίπτωση της βαγάσσης να ανθίσταται στην υδρόλυση. Με αυτόν του τρόπο μπορεί να γίνει προσδιορισμός της σχέσης που υπάρχει μεταξύ του ρυθμού υδρόλυσης και της εναπομένουσας κυτταρίνης. Έχει αναφερθεί βιβλιογραφικώς ότι το 'εύκολα'

υδρολύσιμο κλάσμα της κυτταρίνης υδρολύεται άμεσα, ενώ μετά παραμένει το πιο δύσκολα υδρολύσιμο κλάσμα. Αυτό έχει σαν συνέπεια του συνεχώς μειούμενο ρυθμό υδρόλυσης κατά την διάρκεια της διαδικασίας ενζυμικής υδρόλυσης. Από την άλλη μεριά όμως, ο συνεχώς μειούμενος ρυθμός οφείλεται και στην παρεμπόδιση που ασκείται στα ένζυμα από την απελευθερούμενη γλυκόζη καθώς και στην μερική απενεργοποίηση του σε σχέση με τον χρόνο. Για να μπορέσει να υπολογιστεί σωστά ο συντελεστής K_{rec} θα πρέπει η παρεμπόδιση από την γλυκόζη, καθώς και η απενεργοποίηση από την θερμοκρασία να μηδενιστούν, ούτως ώστε η μείωση του ρυθμού υδρόλυσης να οφείλεται αποκλειστικά στην ικανότητα του υποστρώματος να ανθίσταται στην υδρόλυση (Drissen et al., 2007). Αυτό (όπως θα αναφερθεί και αργότερα) επιτυγχάνεται με την άμεση απομάκρυνση της γλυκόζης που απελευθερώνεται, καθώς και με την αντικατάσταση του ενζύμου με φρέσκο.

Πειραματικά (Desai & Converse 1997), με την εκ νέου επώαση της μερικώς υδρολυμένης κυτταρίνης με νέα ποσότητα ρυθμιστικού διαλύματος και φρέσκου ενζύμου, εξακολουθούν να παρουσιάζουν μείωση του ρυθμού παραγωγής της γλυκόζης ως συνάρτηση της κλασματικής μετατροπής. Αυτό το φαινόμενο αναφέρεται ως ανθεκτικότητα υποστρώματος (substrate recalcitrance), δηλαδή μείωση στην ευπάθεια του υποστρώματος έναντι του ενζύμου λόγω του φαινομένου ότι η υδρολυθείσα κυτταρίνη πιο εύκολα αποσύρεται, ενώ όλο και πιο δύσκολα, περισσότερη ανθεκτική κυτταρίνη παραμένει. Δύο εξηγήσεις μπορούν να δοθούν για την συγκεκριμένη ανθεκτικότητα. Κάποιοι ερευνητές αναφέρουν ότι αυτό προκαλείται από ένα χαμηλότερο ειδικό ρυθμό ανακύκλωσης από την ποσότητα του ενζύμου που προσροφάται επί της κυτταρίνης (Nidetzky & Steiner 1993). Άλλοι διαπίστωσαν ότι προκαλείται από μία μείωση της ποσότητας του ενζύμου που απορροφάται (Ooshima et al. 1991).

Οι Desai και Converse (1997) διαπίστωσαν ότι η μείωση στην επανεκκίνηση του ρυθμού της παραγωγής της γλυκόζης (ρυθμός παραγωγής γλυκόζης μετά την εκ νέου επώαση με νωπό ρυθμιστικό διάλυμα και ένζυμο) στον αυξανόμενο ρυθμό

μετατροπής (σταθερή αναλογία ενζύμου -υποστρώματος), θα μπορούσε να αποδοθεί σε συνδυασμό και των δύο μηχανισμών.

Για τον υπολογισμό του, χρησιμοποιήθηκαν και πάλι οι βέλτιστες συνθήκες δράσης του ενζυμικού συστήματος του μύκητα S. thermophile δηλαδή θερμοκρασία 60 ^oC και pH 5,5 (όπως αυτά προσδιορίστηκαν κατά την διεξαγωγή προηγούμενων πειραμάτων). Οι αντιδράσεις πραγματοποιήθηκαν σε epperdorf του 1,5 mL, όπου προστέθηκε 0,5 mL buffer 100 mM citrate-phoshpate με κατάλληλη ποσότητα ενζύμου και 2% w/v βαγάσση. Η ποσότητα του ενζύμου που προστέθηκε ήταν τέτοια, ώστε να επιτευχθεί ενεργότητα ίση με 38 FPU/g κυτταρίνης (θυμίζουμε εδώ ότι η περιεκτικότητα της βαγάσσης σε κυτταρίνη ήταν 0,68 g/g).

Η διαδικασία δειγματοληψίας που ακολούθησε έγινε ως εξής:

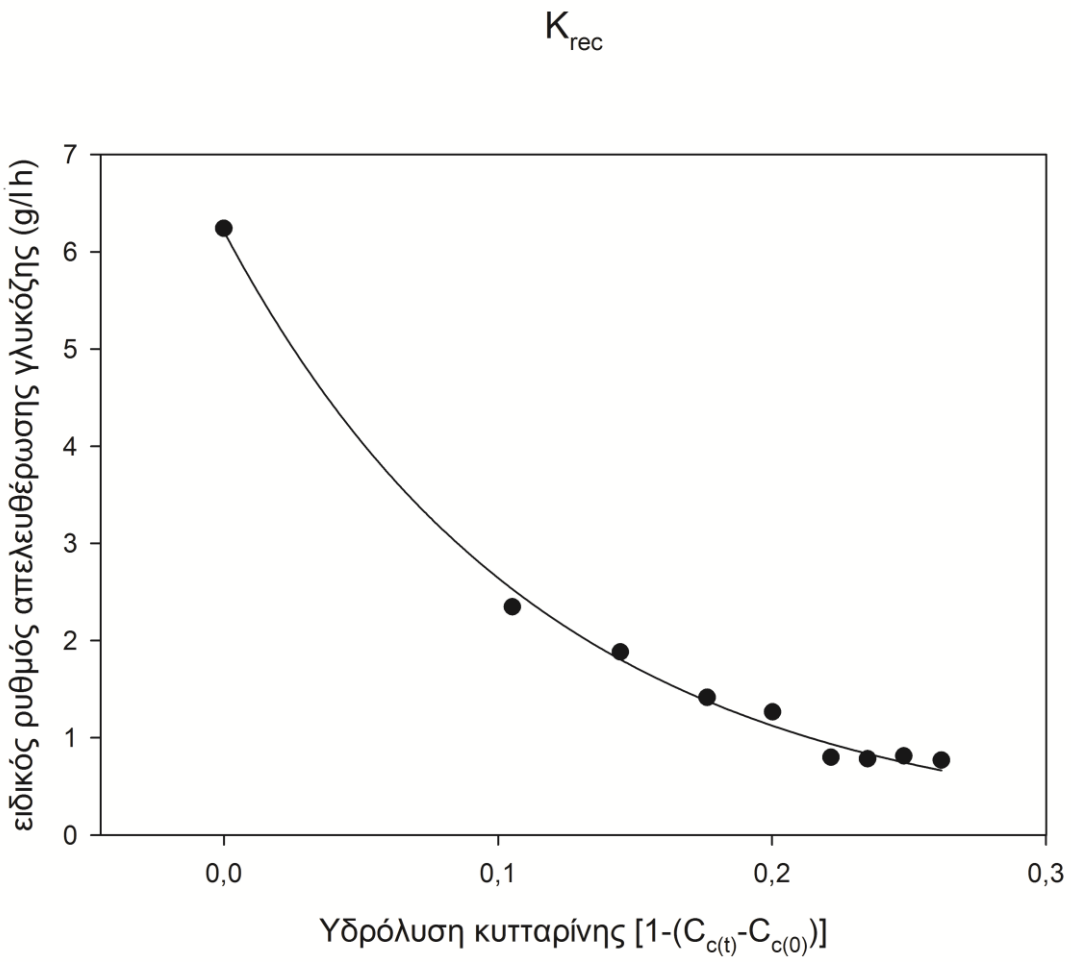
Σε χρόνο 0, προσθέτονταν το buffer με την κατάλληλη ποσότητα ενζύμου κάθε φορά. Το μίγμα αναμιγνυόταν στο vortex προς ομογενοποίησή του και φυγοκεντρούταν για 5 λεπτά περίπου έως ότου κατακαθίσει το υπόστρωμα. Στη συνέχεια, γινόταν η δειγματοληψία με τη χρήση πιπέττας από το υπερκείμενο και το μίγμα επέστρεφε στο thermomixer στους 60^oC για επώαση.

Μετά το πέρας 30 λεπτών, το μίγμα φυγοκεντρούταν για 5 λεπτά και γινόταν δειγματοληψία από το υπερκείμενο. Στη συνέχεια, απορριπτόταν προσεκτικά το υπερκείμενο υγρό και γινόταν ξέπλυμα του υποστρώματος που απέμενε με την ίδια ποσότητα buffer, που χρησιμοποιήθηκε και την πρώτη φορά. Η διαδικασία επαναλαμβανόταν 2-3 φορές, μέχρι το υπερκείμενο να είναι διάφανο και τέλος, τοποθετούταν και πάλι ένζυμο ίδιας αναλογίας με την αρχική προσθήκη και ακολουθούσε νέα δειγματοληψία με την διαδικασία που αναφέρθηκε και παραπάνω.

Τα δείγματα που λαμβάνονταν, καταψύχονταν, προκειμένου να σταματήσει η αντίδραση, αραιώνονταν ως προς 1:10 και μετρούνταν με την μέθοδο DNS για

τον υπολογισμό των απελευθερούμενων σακχάρων. Κάθε φορά γινόταν προσδιορισμός της καθαρής απελευθέρωσης σακχάρων στο διάστημα της μισής ώρας (δηλαδή αφαιρούταν από την τελική συγκέντρωση σακχάρων στα 30 λεπτά, η αρχική συγκέντρωση σακχάρων σε χρόνο 0).

Από την επεξεργασία των πειραματικών αποτελεσμάτων μέσω του προγράμματος του Sigmaplot 12, προέκυψε το παρακάτω διάγραμμα που περιγράφει την σχέση του ρυθμού απελευθέρωσης σακχάρων σε σχέση με την υδρόλυση της κυτταρίνης. Συγκεκριμένα:



Διάγραμμα 16: διάγραμμα ρυθμού απελευθέρωσης γλυκόζης – υδρόλυσης κυτταρίνης

Για να υπολογισθεί αυτή η ανθεκτικότητα του υποστρώματος, χρησιμοποιήθηκε η ακόλουθη εξίσωση:

$$v = v_{(0)} \cdot e^{-K_{rec} \cdot (1 - \frac{C_{C(t)}}{C_{C(0)}})} \qquad \text{Εξ. 8}$$

Στην εξίσωση αυτή, v είναι ο ρυθμός απελευθέρωσης σακχάρων (g/L h) , v(0) είναι ο αρχικός ρυθμός απελευθέρωσης σακχάρων (g/L h). Το Krec είναι η σταθερά της ανθεκτικότητας του υποστρώματος, ένα μέτρο για την μείωση του ποσοστού ανακύκλωσης στην αύξηση του κλάσματος μετατροπής. Κάποιος μπορεί επίσης να εξετάσει αυτή τη σταθερά ως ένα μέτρο για την ετερογένεια του υποστρώματος, δεδομένου ότι μία σχετικά μεγάλη Krec για ένα δεδομένο υπόστρωμα σημαίνει ότι αποτελείται από τμήματα τα οποία μπορούν πολύ εύκολα να υδρολυθούν, και τμήματα τα οποία είναι πολύ ανθεκτικά στην υδρόλυση από τις κυτταρινάσες. Με τη σειρά του ένα Krec ίσο με μηδέν θα σήμαινε ότι κάθε κλάσμα του υποστρώματος μετατρέπεται σε γλυκόζη στο ίδιο ποσοστό, οπότε θα ήταν ουσιαστικά ένα πολύ ομοιογενές υπόστρωμα. Η ποσότητα 1-(C(t)/C(0)) είναι το κλάσμα της κυτταρίνης που έχει ήδη υδρολυθεί.

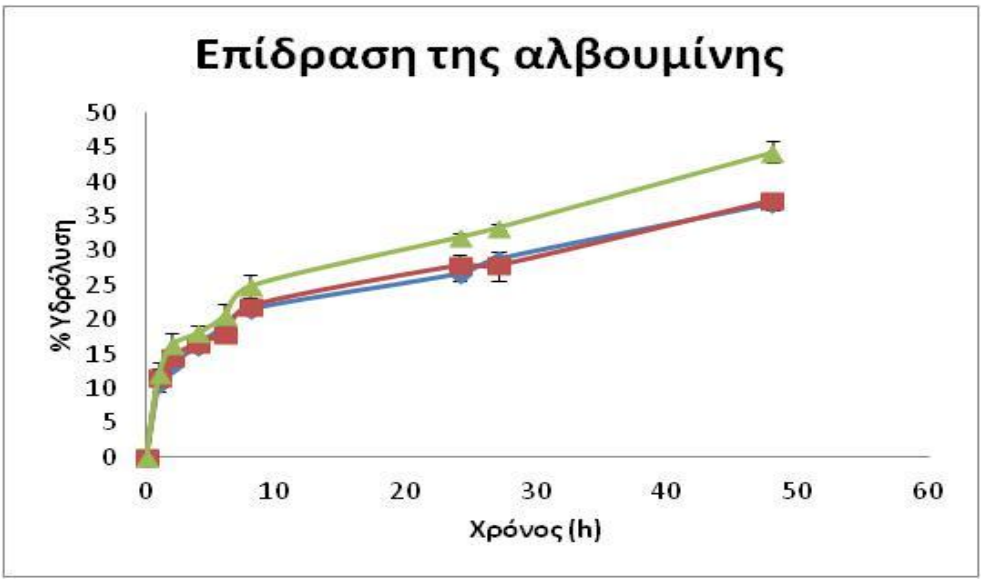
Στο συγκεκριμένο διάγραμμα, παρατηρείται η μείωση του ρυθμού απελευθέρωσης σακχάρων, καθώς εξελίσσεται η αντίδραση της υδρόλυσης της κυτταρίνης. Από την επεξεργασία της συνάρτησης αυτής με την εφαρμογή της εξίσωσης που αναφέρθηκε παραπάνω, υπολογίζεται ότι η σταθερά ανθεκτικότητας του υποστρώματος, K_{rec} είναι ίση με 8,53g/L h ($p<0,0001$), ενώ ο αρχικός ρυθμός παραγωγής της γλυκόζης είναι 6,21g/L h για αποτελέσματα με ακρίβεια $R^2= 0,996$ και $p<0,0001$. Αντίστοιχα, από πειραματικές μελέτες, η ίδια σταθερά ανθεκτικότητας σε άχυρο σίτου βρέθηκε να έχει τιμή 5,2g/L h. Ο ρυθμός αντίδρασης του υποστρώματος μειώνεται ως συνάρτηση του αυξημένου συντελεστή μετατροπής K_{rec}, δηλαδή το υπόστρωμα γίνεται πιο ανθεκτικό.

Επομένως, όσο μεγαλύτερη είναι η τιμή του συντελεστή τόσο περισσότερο μειώνεται ο ρυθμός της υδρόλυσης και το υπόστρωμα γίνεται πιο ανθεκτικό σ΄αυτή [Drissen et al.,2007].

3.2.7 Πείραμα 7ο

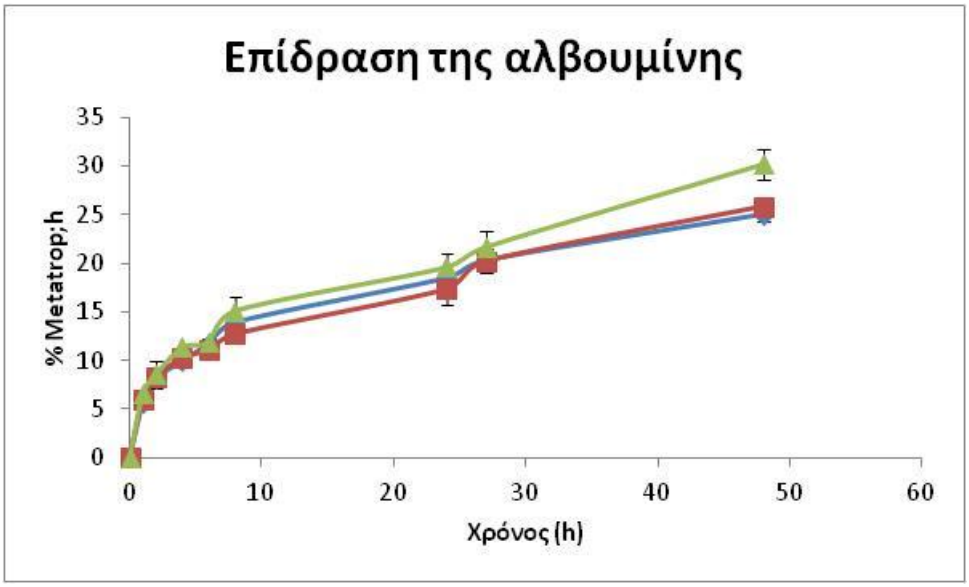
Μελέτη επίδρασης πρωτεΐνης αλβουμίνης (BSA) και επιφανειοδραστικής ουσίας Tween 80:

Σκοπός της παρούσας μελέτης ήταν να βρεθεί η επίδραση που ασκεί η προσθήκη αλβουμίνης καθώς και Tween 80 στην διαδικασία της ενζυμικής υδρόλυσης, και αν αυτές θα βελτιώσουν την συνολική μετατροπή της κυτταρίνης. Η παρουσία πρωτεϊνών και επιφανειοδραστικών ουσιών βελτιώνει την δράση των λιγνινοκυτταρινούχων ενζύμων, καθώς εμποδίζει την μη λειτουργική και μη αντιστρεπτή προσρόφησή τους στη λιγνίνη, με αποτέλεσμα να αυξάνει την ενεργότητά τους. Αυτό σημαίνει ότι η προσθήκη πρωτεϊνών ή επιφανειοδραστικών ουσιών στην ενζυμική υδρόλυση έχει ως αποτέλεσμα την αύξηση του ποσοστού υδρόλυσης. Η υδρόλυση που πραγματοποιήθηκε για την μελέτη αυτή, έγινε σε συνθήκες θερμοκρασίας 60ºC και pH 5,5 για το ενζυμικό σύστημα του s. Thermophile. Η επίδραση της προσθήκης αυτών των ουσιών, παρατηρείται και από τα παρακάτω διαγράμματα τόσο για τα ολικά αναγωγικά σάκχαρα όσο και από τη γλυκόζη, αναλυτικά:



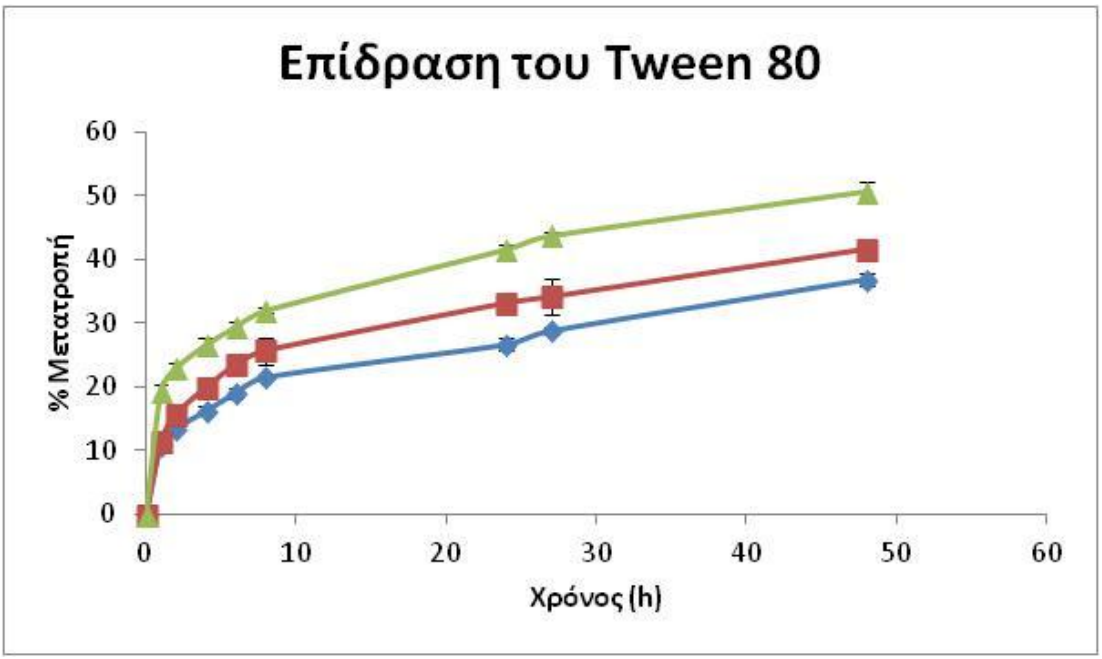
Διάγραμμα 17: επίδραση της αλβουμίνης με βάση τα ολικά αναγωγικά σάκχαρα για control (μπλε), albumin 0,05g/g (κόκκινο) και albumin 0,5g/g (πράσινο)

Το φαινόμενο, που συμβαίνει εξαιτίας της παρουσίας πρωτεΐνης που περιγράφηκε παραπάνω, παρατηρείται και από το διάγραμμα, καθώς με την προσθήκη έστω και μικρής ποσότητας αλβουμίνης, δηλαδή 0,05g/g στερεού, υπάρχει αύξηση της υδρόλυσης κατά 1,2%, καθώς από το 36,83% του control αυξήθηκε σε 37,26%. Βέβαια, με την προσθήκη 0,5g αλβουμίνης/ g στερεού (44,3%), παρατηρείται πολύ πιο σημαντική αύξηση κατά 20,3%.



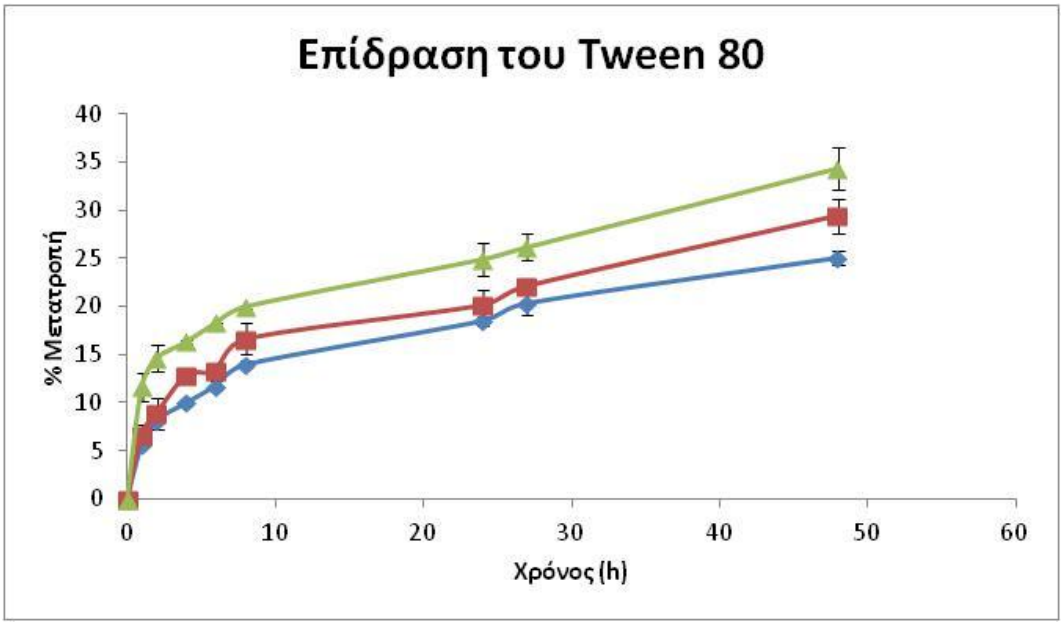
Διάγραμμα 18: επίδραση της αλβουμίνης με βάση τη γλυκόζη για control (μπλε), albumin 0,05g/L (κόκκινο) και albumin 0,5g/L (πράσινο)

Όσον αφορά την επίδραση της επιφανειοδραστικής ουσίας Tween 80, αυτή απεικονίζεται στο παρακάτω διάγραμμα, όπου συγκρίνονται τα ποσοστά υδρόλυσης ανάμεσα στο control και στις τιμές 1 και 3% της ουσίας. Αναλυτικότερα:



Διάγραμμα 19: επίδραση της επιφανειοδραστικής ουσίας Tween 80 με βάση τα ολικά αναγωγικά σάκχαρα, για control (μπλε), tween 1%(κόκκινο) και tween 3% (πράσινο)

Ομοίως, τα αντίστοιχα αποτελέσματα που προκύπτουν από την προσθήκη της ουσίας Tween 80, είναι: για 1% της ουσίας, το ποσοστό της υδρόλυσης της βαγάσσης είναι 41,59%, δηλαδή παρατηρήθηκε αύξηση 12,9% ενώ για 3% tween 80, ανέρχεται σε 50,59%, με αύξηση 37,4% σε σχέση με του control, που ήταν 36,83%.



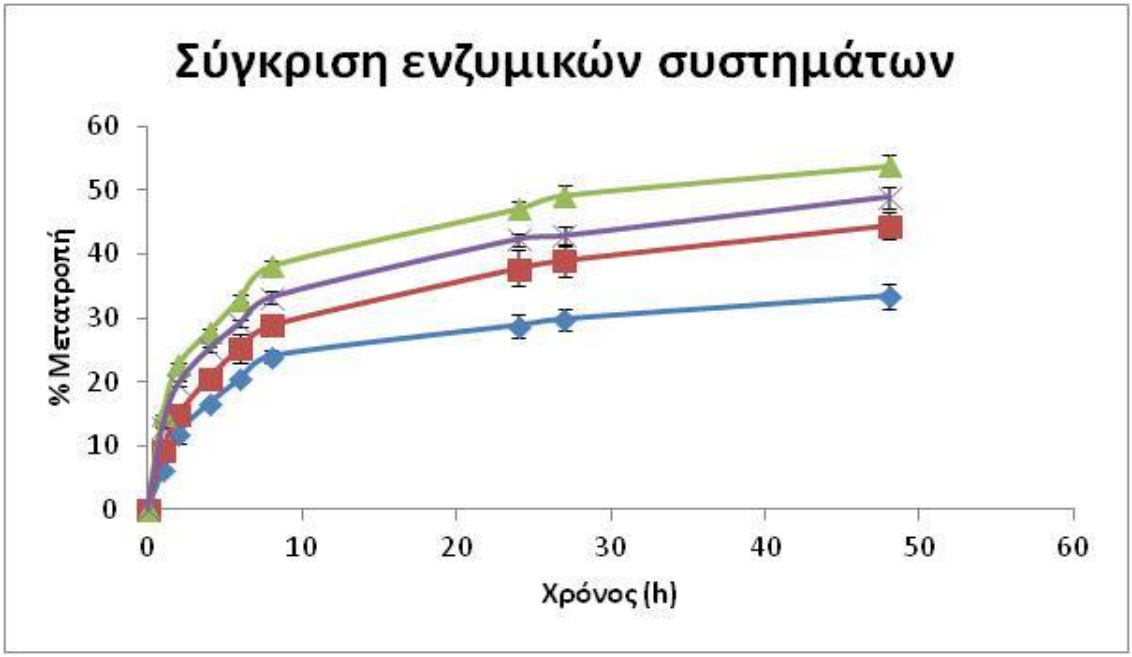
Διάγραμμα 20: επίδραση της επιφανειοδραστικής ουσίας Tween 80 με βάση τη γλυκόζη, για control (μπλε), tween 1%(κόκκινο) και tween 3%(πράσινο)

3.2.8 Πείραμα 8ο

<u>Σύγκριση των ενζυμικών συστημάτων των μυκήτων Fusarium oxysporum, S. thermophile και του εμπορικού ενζυμικού σκευάσματος Celluclast 1,5L</u>

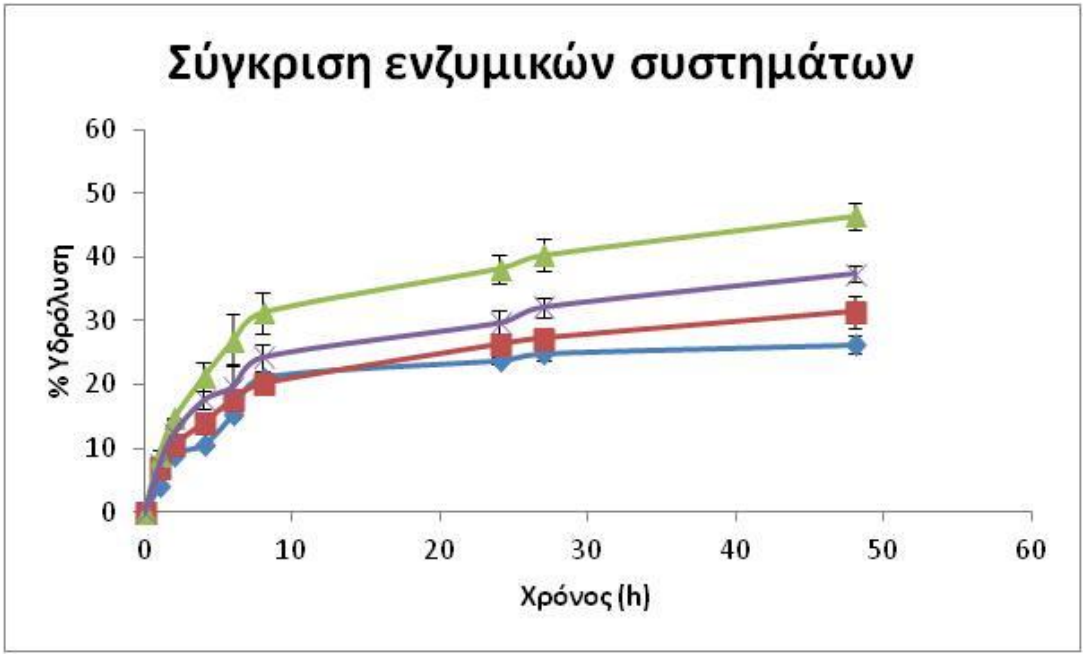
Κατά την διάρκεια αυτού του πειράματος έγινε σύγκριση των ενζυμικών συστημάτων δύο μυκήτων που υπάρχουν στο εργαστήριο και ενός εμπορικού ενζυμικού σκευάσματος. Πιο συγκεκριμένα, έγινε σύγκριση μεταξύ του ενζυμικού συστήματος του θερμόφιλου μύκητα S. thermophile, που μελετάται στην παρούσα διπλωματική εργασία, καθώς και του ενζυμικού συστήματος του μεσόφιλου μύκητα Fusarium oxysporum F3. Επίσης έγινε σύγκριση με το εμπορικό σκεύασμα Celluclast 1.5L, το οποίο προέρχεται από τον μεσόφιλο μύκητα Trichoderma reesei. Τέλος, το Celluclast 1.5L εμπλουτίστηκε με το εμπορικό σκεύασμα από τον μύκητα Aspergillus niger, Novozym 188, το οποίο χρησιμοποιείται για τον εμπλουτισμό του Celluclast 1.5L με β-γλυκοσιδάση σε αναλογία 5:1 v/v. Οι συνθήκες, στις οποίες πραγματοποιήθηκαν οι υδρολύσεις για το κάθε ενζυμικό σύστημα ήταν εκείνες, στις οποίες παρουσιάζουν τη βέλτιστη δράση.

Συγκεκριμένα, για τον S. thermophile, οι βέλτιστες συνθήκες θερμοκρασίας και pH, ήταν εκείνες που μελετήθηκαν από τις προηγούμενες πειραματικές διαδικασίες, δηλαδή στους 60ºC και 5,5, αντίστοιχα. Για τον Fusarium, οι αντίστοιχες συνθήκες θερμοκρασίας ήταν 50ºC και pH 6, ενώ για το εμπορικό ενζυμικό σύστημα Celluclast, ήταν 50ºC και pH 5.



Διάγραμμα 21: σύγκριση των ενζυμικών συστημάτων για τους τρεις μύκητες με βάση τα ολικά αναγωγικά σάκχαρα (μέθοδος DNS), S. thermophile (κόκκινο), f. Oxysrorum (μπλε), celluclast (μωβ), celluclast-novozym (πράσινο)

Από το διάγραμμα παρατηρείται ότι συγκρίνοντας τα τρία διαφορετικά ενζυμικά σύστήματα, εκείνο το οποίο έχει καλύτερη απόδοση στην υδρόλυση της βαγάσσης είναι το εμπορικό ενζυμικό μίγμα celluclast 1,5L-novozym 188, με τιμή ποσοστού υδρόλυσης 53,91% έναντι των άλλων, του celluclast 1,5L με ποσοστό 48,94%, του S. Thermophile με 44,28% και του Fusarium oxysporum με 33,4%. Αυτό είναι λογικό, καθώς το ενζυμικό σύστημα του celluclast-novozym, προέρχεται από εμπορικό ένζυμο και συνεπώς είναι λογικό να αποδίδει μεγάλα ποσοστά υδρόλυσης της βαγάσσης. Το ίδιο παρατηρείται και από το διάγραμμα με βάση τη γλυκόζη, όπως απεικονίζεται παρακάτω.



Διάγραμμα 22: σύγκριση των ενζυμικών συστημάτων για τους τρεις μύκητες με βάση τη γλυκόζη (μέθοδος glucotest), S. thermophile (κόκκινο), f. Oxysrorum (μπλε), celluclast (μωβ), celluclast-novozym (πράσινο)

Από τα παραπάνω διαγράμματα, μπορεί να παρατηρήσει κανείς ότι η διαφορά του ποσοστού υδρόλυσης ανάμεσα στα εργαστηριακά ενζυμικά συστήματα του S. thermophile και του F. oxysporum είναι πιο μικρή. Αυτό πιθανώς να οφείλεται στο γεγονός ότι έχει χαμηλότερη δράση γλυκοσιδάσης που παρουσιάζει το ενζυμικό σύστημα του S. Thermophile σε σχέση με το ενζυμικό σύστημα του F. Oxysporum. Η δράση του ενζυμικού συστήματος του μύκητα S. thermophile θα μπορούσε να βελτιωθεί με την αύξηση της αναλογίας της γλυκοσιδάσης σε σχέση με τη συνολική ενεργότητα των ενζύμων του. Αυτό θα μπορούσε να επιτευχθεί είτε με την εύρεση καταλληλότερων συνθηκών ανάπτυξης που θα επάγουν περισσότερο την παραγωγή β-γλυκοζιδάσης, είτε με την βοήθεια εργαλείων της γενετικής μηχανικής που θα υπερεκφράσουν γονίδια που κωδικοποιούν β-γλυκοζιδάσες. Αυτό θα είχε ως συνέπεια την βελτίωση του ενζυμικού προφίλ του μύκητα ως προς την περιεχόμενη β-γλυκοσιδάση. Γενικά, ο μύκητας F. oxysporum έχει

μεγάλη ποσότητα γλυκοσιδάσης, συνεπώς το μεγαλύτερο μέρος των απελευθερούμενων σακχάρων του είναι με την μορφή γλυκόζης.

4. ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ

Από την επεξεργασία των παραπάνω πειραματικών δεδομένων, κατά την οποία μελετήθηκε η υδρόλυση της κυτταρίνης σε διαφορετικές συνθήκες, μπορούν να εξαχθούν κάποια συμπεράσματα. Συγκεκριμένα:

1. *Η βέλτιστη θερμοκρασία, στην οποία μπορεί να πραγματοποιηθεί η διαδικασία της υδρόλυσης της βαγάσσης από το ενζυμικό σύστημα του μύκητα S. thermophile είναι εκείνη των 60°C.*

2. *Αντίστοιχα, το βέλτιστο pH, στο οποίο μπορεί να πραγματοποιηθεί η υδρόλυση σε μεγαλύτερο βαθμό είναι η τιμή 5,5.*

3. *Όσο μεγαλύτερη είναι η ενεργότητα των χρησιμοποιούμενων ενζύμων, τόσο μεγαλύτερο είναι και το ποσοστό της παραγωγής της γλυκόζης. Επιπλέον, δεν χρειάζεται να προστεθεί μεγάλη ποσότητα ενζύμου αν η διάρκεια της ενζυμικής υδρόλυσης είναι μικρή (πχ μέχρι 8 ώρες), καθώς στα πρώτα στάδια της υδρόλυσης δεν υπάρχουν σημαντικές διαφορές στην υδρόλυση.*

4. *Με την αύξηση της ποσότητας του υποστρώματος, παρατηρείται μία μείωση του ποσοστού της υδρόλυσης της κυτταρίνης. Αυτό συμβαίνει διότι αυξάνεται η ποσότητα της γλυκόζης που απελευθερώνεται με την ενζυμική υδρόλυση και επιδρά σαν παρεμποδιστής στην δράση των ενζύμων, καθώς επίσης και σε δυσκολίες κατά την ανάδευση του δείγματος.*

5. *Ο συντελεστής παρεμπόδισης από την γλυκόζη (K_{IG}) του ενζυμικού συστήματος του μύκητα S. thermophile είναι αρκετά υψηλός, πράγμα που*

επιτρέπει την εφαρμογή του συγκεκριμένου ενζυμικού συστήματος σε διεργασίες τύπου SHF, καθώς δεν παρεμποδίζεται έντονα από την απελευθερούμενη γλυκόζη.

6. *Η ανθεκτικότητα και η αντοχή της βαγάσσης στην ενζυμική υδρόλυση δεν είναι ιδιαίτερα σημαντική, συγκρινόμενη με την αντοχή άλλων υποστρωμάτων, γι΄ αυτό και η χρήση του είναι αρκετά διαδεδομένη.*

7. *Η προσθήκη πρωτεϊνών, όπως η αλβουμίνη, αλλά και επιφανειοδραστικών ουσιών, όπως το Tween 80, επιδρά θετικά και αυξάνει το ποσοστό της υδρόλυσης, καθώς εμποδίζεται η μη λειτουργική και μη αντιστρεπτή προσρόφησή τους στη λιγνίνη. Μάλιστα, ακόμα και μικρή ποσότητα των συγκεκριμένων ουσιών μπορεί να επιφέρει σημαντική βελτίωση της απόδοσης της υδρόλυσης. Βέβαια, με μεγαλύτερη ποσότητα, παρατηρείται και μεγαλύτερη τιμή του ποσοστού της.*

8. *Τέλος, συγκρίνοντας τα αποτελέσματα της υδρόλυσης από διαφορετικά ενζυμικά συστήματα τριών μυκήτων, του S. thermophile, F. oxysporum και του εμπορικού ενζυμικού σκευάσματος Celluclast 1.5L με Novozym 188, προκύπτει ότι το ενζυμικό σύστημα που έχει την καλύτερη απόδοση είναι το εμπορικό ενζυμικό σύστημα Celluclast εμπλουτισμένο με το σκεύασμα Novozym 188. Δεύτερο έρχεται το ενζυμικό σύστημα του S. thermophile, το οποίο μελετήθηκε σε εργαστηριακή κλίμακα.*

9. *Λόγω της χαμηλής ενεργότητας σε β-γλυκοσιδάση που παρουσιάζει το ενζυμικό προφίλ προερχόμενο από τον μύκητα S. thermophile, προτείνεται η βελτίωσή του με αύξηση της ενεργότητας σε β-γλυκοσιδάση.*

Γενικά, παρατηρείται ότι για να επιτευχθεί μία αρκετά καλή απόδοση της υδρόλυσης της κυτταρίνης από τη δράση των ενζύμων, θα πρέπει να επικρατούν οι βέλτιστες συνθήκες θερμοκρασίας και pH, ενώ παράλληλα η ποσότητα του υποστρώματος που προστίθεται στο μίγμα να είναι μικρή.

Επίσης, όπως είναι λογικό η ενεργότητα των ενζύμων να είναι όσο το δυνατόν υψηλότερη και αν είναι δυνατόν να γίνεται προσθήκη κάποιας βοηθητικής ουσίας, δηλαδή πρωτεΐνης ή επιφανειοδραστικού χαρακτήρα. Γενικότερα, θα πρέπει να αποφεύγεται η μεγαλύτερη παραγωγή γλυκόζης, η οποία έχει παρεμποδιστική δράση και εμποδίζει την δράση των ενζύμων για την υδρόλυση της κυτταρίνης. Τέλος, η χρήση του ενζυμικού συστήματος του μύκητα S. Thermophile θεωρείται πολλά υποσχόμενη για την εφαρμογή της σε βιομηχανίες, καθώς μπορεί να δράσει σε υψηλές θερμοκρασίες, παρουσιάζει μεγάλη θερμο-ανθεκτικότητα, ενώ η παρεμπόδιση από την γλυκόζη είναι σχετικά μικρή.

ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

- *Alvira P., Tomás-Pejo E., M. Ballesteros, M.J. Negro (2009). Pretreatment Technologies for an Efficient Bioethanol Production Process based on Enzymatic Hdrolysis: A Review, Biosource Tecnology, 101(13), 4851-4861*
- *Atalla, R.H., VanderHart D.L. (1984). Native Cellulose: A Composite of Two Distinct Crystalline Forms, Science, 223:283–285.Balat M. Global bio-fuel processing and production trends. Energy Explor Exploit 25, pp. 195–218, 2007*
- *Balat, M. (2011) Production of bioethanol from lignocellulosic materials via the biochemical pathway: A review, Energy Conversion and Management, 52:858-875*
- *Canevascini, G., Borer, P., Dreyer, J.L. (1991) Cellobiose dehydrogenases of Sporotrichum (Chrysosporium) thermophile, European Journal of Biochemistry, 198:43-52*
- *Canevascini, G., Meyer, H.P. (1979) â-Glucosidase in the cellulolytic fungus Sporotrichum thermophile Apinis, Experimental Mycology, 3:203-214.*
- *Chen H., Jin S. Effect of ethanol and yeast on cellulase activity and hydrolysis of crystalline cellulose. Enzyme Microb Technol 39, pp. 1430–2, 2006.*
- *Demirbas A. Ethanol from cellulosic biomass resources. Int J Green Ener 1, pp. 79–87, 2004.*
- *Demirbas A. Bioethanol from Cellulosic Materials: A Renewable Motor Fuel from Biomass. Energy Sources 27, pp. 327–337, 2005.*
- *Demirbas A. Progress and recent trends in biofuels. Prog Energy Combus Sci 33, pp. 1–18, 2007.*
- *Demirbas A. Biofuels sources, biofuel policy, biofuel economy and global biofuel projections. Energy Conversion and Management, pp. 1-11, 2008.*
- *Drissen R. E. T., R. H. W. Maas, M. J. E. C. Van DER MAAREL, M. A. Kabel, H. A. Schols, J. Tramper, & H. H. Beeftink, A generic model for glucose production from various cellulose sources by a commercial cellulase complex, 2007, p.p 419-429*
- *Farrell AE, Plevin RJ, Turner BT, Jones AD, O'Hare M, Kammen DM (2006) Ethanol can contribute to energy and environmental goals. Science 311:506–508*
- *Gaikwad, J. S., Maheshwari, R. (1994) Localization and release of β-glucosidase in the thermophilic and cellulolytic fungus, Sporotrichum thermophile, Experimental Mycology, 18:300-310*

- *Gibson BR, Lawrence SJ, Leclaire JP, Powell CD, Smart KA (2007) Yeast responses to stresses associated with industrial brewery handling. FEMS Microbiol Rev 31:535–569*
- *Hayes D.J (2009). An exanimaton of biorefining processes, catalysts and challenges, Catalysis Today, 145(1-2), 138-151*
- *Henrissat, B. (1994) Cellulases and their interaction with cellulose, Celulose, 1:169-196.*
- *Howard R.L., Abotsi E., Jansen van Rensburg E.L.,Howard S. (2003) Lignocellulose biotechnology: issues of bioconversion and enzyme production. African Journal of Biotechnology Vol. 2 (12), pp. 602-619Ingram, L.O., Buttke, T.M., 1984. Effects of alcohols on microorganisms. Adv. Microb. Physiol. 25, 253–300.*
- *Jacobson M.Z., Colella W.G., Golden D.M. Cleaning the air and improving health with hydrogen fuel-cell vehicles. Science 308, pp. 1901–1905, 2005*
- *Jones RP (1989) Biological principles for the effects of ethanol. Enzyme Microb Technol 11:130–153*
- *Jørgensen H., Vibe-Pedersen J., Larsen J., Felby C. Liquefaction of Lignocellulose at High-Solids Concentrations. Biotechnology and Bioengineering, Vol. 96, No. 5, pp. 862-870, 2007*
- *Kalogeris E., Christakopoulos P., Kekos D., Macris B.J. Studies on the solid-state production of the thermostable endoxylanases from Thermoascus aurauntiacus: characterization of two isozymes. J. Biotechnol. 60, pp. 155-163, 1998.*
- *Katapodis Petros, Vassiliki Christakopoulou, Dimitris Kekos, Paul Christakopoulos. Optimization of xylanase production by Chaetomium thermophilum in wheat straw using response surface methodology. Biochemical Engineering Journal, Volume 35, Issue 2, 15 July 2007, Pages 136-141*
- *Katapodis Petros, Wim Nerinckx, Marc Claeyssens, Paul Christakopoulos Purification and characterization of a thermostable intracellular β-xylosidase from the thermophilic fungus Sporotrichum thermophile. Process Biochemistry, Volume 41, Issue 12, December 2006, Pages 2402-2409*
- *Katapodis, P., Vršanská, M., Kekos, D., Nerinckx, W., Biely, P., Claeyssens, M., Macris, B.J., Christakopoulos, P. (2003) Biochemical and catalytic properties of an endoxylanase purified from the culture filtrate of Sporotrichum thermophile, Carbohydrate Research, 338:1881-1890.*
- *Kaur, G., Kumar, S., Satyanarayana, T.(2004) Production, characterization and application of a thermostable polygalacturonase of a thermophilic mould Sporotrichum thermophile Apinis, Bioresourse Technology, 94: 239–243*

- *Kumar L.N.V., Dhavala P., Goswami A., Maithel S. Liquid biofuels in South Asia: resources and technologies. Asian Biotechnol Develop Rev 8, pp. 31–49, 2006.*
- *Lee J. Biological conversion of lignocellulosic biomass to ethanol. J of Biotechnology 56, pp. 1-24, 1997*
- *Lin Y, Tanaka S (2006) Ethanol fermentation from biomass resources: current state and prospects. Appl Microbiol Biotechnol 69:627– 642*
- *Liu, Z.L., 2006. Genomic adaptation of ethanologenic yeast to biomass conversion inhibitors. Appl. Microbiol. Biotechnol. 73, 27–36.*
- *Lynd L.R., Weimer P.J., van Zyl W.H., Pretorius I.S. Microbial Cellulose Utilization: Fundamentals and Biotechnology. Microbiology and Molecular Biology Reviews 66(3), pp. 506-577, 2002*
- *Lynd L.R., van Zyl W.H., McBride J.E., Laser M. Consolidated bioprocessing of cellulosic biomass: an update. Current Opinion in biotechnology 16, pp. 577-583, 2005*
- *Maheshwari, R., Bharadwaj, G., Bhat, M.K. (2000) Thermophilic Fungi: Their Physiology and Enzymes Microbiology and Molecular Biology Reviews, 64(3):461-488.*
- *Mussato S.I., Roberto I.C. (2005β). Chemical characterization and liberation of pentose sugars from brewers' spent grain. J. of Chem Technol Biotechnol*
- *Pavle Andrie, Anne S. Meter, Peter A. Jensen Kim Dam-Johansen, Effect and Modelling of Glucose Inhibition and In Situ Glucose Removal Dyring Enzymatic Hydrolysis of Pretreated Wheat Straw, p.p. 280-297, 2009*
- *Pérez S., Samain D. (2010) Structure and engineering of celluloses, Advances in Carbohydrate Chemistry and Biochemistry, 64: 25-116.*
- *Puls J., Poutanen K. Mechanisms of enzymic hydrolysis of hemicelluloses (xylans) and procedures for determination of the enzyme activities involved. In: Coughlan, M.P. (Ed.), Enzymes Systems for Lignocellulose Degradation, vol. 42. Elsevier Applied Biochemistry and Biotechnology, pp. 37-52, 1989*
- *Reese, E.T., Ralph, Siu, R.G.H., Levinson, H.S. (1950) The biological degradation of soluble cellulose derivatives and its relationship to the mechanism of cellulose hydrolysis, Journal of bacteriology, 59(4):485-97.*
- *Roeher M. (2001). The Biotechnology of Ethanol: classical and future applications. Wiley-V.C.H*
- *Salar, R.K., Aneja, K.R., (2007) Thermophilic Fungi: Taxonomy and Biogeography, Journal of Agricultural Technology, 3(1): 77-107.Topakas E., Stamatis H., Biely P., Christakopoulos P. (2004) Purification and characterization of a type B feruloyl esterase (StFae-A) from the thermophilic fungus Sporotrichum thermophile, Applied Microbiology and Biotechnology, 63:686–690.*

- *Sanchez OJ, Cardona CA (2008) Trends in biotechnological production of fuel ethanol from different feedstocks. Bioresour Technol 99:5270–5295*
- *Shuler M.L., Kargi F. (2005). Μηχανική Βιοδιεργασιών (Βασικές έννοιες). ΑΘΗΝΑ, ΕΜΠ: 365-366, 695-700*
- *Singh, A., Goel, R., Johri, B.N. (1990) Production of cellulolytic enzymes by immobilized Sporotrichum thermophile, Enzyme and Microbial Technology, 12:464-468.*
- *Subramaniam, S.S., Nagalla, S.R., Renganathan, V. (1999) Cloning and Characterization of a Thermostable Cellobiose Dehydrogenase from Sporotrichum thermophile, Archives of Biochemistry and Biophysics, 365(2):223-230.*
- *Sun Y., Cheng J. (2002). Hydrolysis of lignocellulosic materials for ethanol production: a review. Bioresource Technology 83:1-11*
- *Szczodrak J., Fiedurek J. (1995). Technology for conversion of lignocellulosic biomass to ethanol. Biomass and Bioenergy 10:367-375*
- *Topakas E., Katapodis P., Kekos D., Macris B.J., Christakopoulos P. Production and partial characterization of xylanase by Sporotrichum thermophile under solid-state fermentation. World J. Microbiol.Biotechnol 19, pp. 195-198, 2003.*
- *Topakas E., Vafiadi C., Stamatis H., Christakopoulos P. (2005) Sporotrichum thermophile type C feruloyl esterase (StFaeC): Purification characterization, and its use for phenolic acid (sugar) ester synthesis, Enzyme and microbial technology, 36: 729–736.*
- *Vázquez, M., Oliva, M., Téllez-Luis, S.J., Ramírez, J.A., 2007. Hydrolysis of sorghum straw using phosphoric acid: Evaluation of furfural production. Bioresource Technology. 98, 3053-3060.*
- *Xiros, C. & Christakopoulos, P. (2009). Enhanced ethanol production from brewer's spent grain by a Fusarium oxysporum consolidated system. Biotechnology for Biofuels 2, 4*
- *Yang B., Willies D., Wyman C., Changes in the Enzymatic Hydrolysis Rate of Avicel Cellulose With Conversion, 2006,p.p 1123-1128*
- *Zaldivar J., Nielsen J., Olsson L. Fuel ethanol production from lignocellulose: a challenge for metabolic engineering and process integration. Appl Microbiol Biotechnol 56, pp. 17-34, 2001.*
- *Κέκος Δ., Παπαγιαννάκος Ν. (1999). Σημειώσεις Βιοχημικής Μηχανικής. ΑΘΗΝΑ, ΕΜΠ: 70-71, 100-113*
- *Κολίσης Φ.Ν., Κέκος Δ., Μακρής Β.Ι. (2002). Εφηρμοσμένη Βιοτεχνολογία (Σημειώσεις). ΑΘΗΝΑ, ΕΜΠ: 32-38*
- *Χριστακόπουλος Π., Τόπακας Ε., (2011), Βιοτεχνολογία Παραγωγής Βιοκαυσίμων, ΑΘΗΝΑ, ΕΜΠ: 18-22,30-42.*
- *http://www.chemeng.ntua.gr/courses/bpy/files/limperopoulou.pdf]*