ΕΘΝΙΚΟ ΜΕΤΣΟΒΙΟ ΠΟΛΥΤΕΧΝΕΙΟ

ΣΧΟΛΗ ΧΗΜΙΚΩΝ ΜΗΧΑΝΙΚΩΝ

ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΟ ΒΙΟΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑΣ

ΔΙΠΛΩΜΑΤΙΚΗ ΕΡΓΑΣΙΑ

Μελέτη της επίδρασης θρεπτικών συστατικών και συνθηκών καλλιέργειας στη ζύμωση πεντοζών από το γενετικά τροποποιημένο στέλεχος FF11 του μύκητα *Fusarium oxysporum*

ΧΑΡΑΛΑΜΠΙΔΗΣ ΑΓΓΕΛΟΣ

ΕΠΙΒΛΕΠΩΝ ΚΑΘΗΓΗΤΗΣ:

ΕΥΑΓΓΕΛΟΣ ΤΟΠΑΚΑΣ, ΛΕΚΤΟΡΑΣ Ε.Μ.Π.

ΑΘΗΝΑ 2013

Πρόλογος

Η παρούσα διπλωματική εργασία εκπονήθηκε στο εργαστήριο βιοτεχνολογίας της Σχολής Χημικών Μηχανικών του Εθνικού Μετσόβιου Πολυτεχνείου από το Σεπτέμβριο του 2012 έως και τον Μάιο του 2013 στο πλαίσιο του μαθήματος Βιοτεχνολογία και Περιβάλλον.

Ολοκληρώνοντας την πτυχιακή μου εργασία θα ήθελα να ευχαριστήσω θερμά τους καθηγητές Παύλο Χριστακόπουλο και Ευάγγελο Τόπακα για την εμπιστοσύνη που μου έδειξαν κατά την ανάθεση ενός θέματος του ενδιαφέροντος μου.

Ευγνωμοσύνη θα ήθελα να εκφράσω προς τον Υποψήφιο Διδάκτορα, Θωμά Πάσχο, για τον πολύτιμο χρόνο που διέθεσε σε μένα ώστε να κατανοήσω βαθύτερα το θέμα που μου ανατέθηκε και να εξοικειωθώ με τα τεχνικά ζητήματα των πειραμάτων.

Επιπλέον, θα ήθελα να ευχαριστήσω το προσωπικό του Εργαστηρίου Βιοτεχνολογίας για το φιλόξενο και φιλικό περιβάλλον που μου παρείχαν κατά τη διάρκεια εκπόνησης των πειραμάτων της παρούσας διπλωματικής.

Περίληψη

Σκοπός της διπλωματικής εργασίας ήταν η μελέτη της μεταβολικής ενεργότητας του μύκητα *Fusarium oxysporum* ως προς την παραγωγή και απόδοση του σε αιθανόλη παρουσία διαφορετικής συγκέντρωσης υποστρώματος και θρεπτικών ουσιών καθώς και η μελέτη της επίδρασης διαφορετικής παροχής αέρα στον μεταβολισμό του μύκητα.

Η μελέτη της ανάπτυξης και ζύμωσης του μύκητα πραγματοποιήθηκε σε υπόστρωμα ξυλόζης με συγκεντρώσεις 1, 2, 3 και 4% w/v και σε υπόστρωμα προεπεξεργασμένου άχυρου 2% w/v. Από τα πειράματα της ξυλόζης προέκυψε το πρωταρχικό συμπέρασμα της βέλτιστης παραγωγής αιθανόλης για συγκέντρωση 2% w/v καθώς μεγαλύτερες συγκεντρώσεις υποστρώματος παρεμπόδισαν την ζύμωση του υποστρώματος. Με βάση το αποτέλεσμα αυτό χρησιμοποιήθηκε στη συνέχεια η συγκέντρωση αυτή και στα επόμενα πειράματα. Επίσης φάνηκε ότι η χρήση άχυρου ως υπόστρωμα ίδιας συγκέντρωσης οδηγεί σε μειωμένη παραγωγή αιθανόλης γεγονός που επιβεβαιώνει την επιλογή της ξυλόζης για τη πραγματοποίηση των επόμενων πειραμάτων.

Για τη μελέτη της επίδρασης των θρεπτικών πραγματοποιήθηκαν αρχικά 3 σειρές όπου προστέθηκαν οι παρακάτω ενώσεις και συγκεντρώσεις: 5, 10 και 20 g/L $(NH_4)_2HPO_4$, 1,3,5 g/L εκχυλίσματος ζύμης, 1,3,5 g/L malt extract και 3,5,7 g/L πεπτόνης. Παρατηρήθηκε ότι η προσθήκη 5g/L εκχυλίσματος ζύμης και πεπτόνης οδηγούν σε βέλτιστη παραγωγή αιθανόλης.

Επιπλέον μελετήθηκε η επίδραση της προσθήκης μεταλλικών ιόντων. Για το σκοπό αυτό πραγματοποιήθηκαν 2 σειρές πειραμάτων όπου εξετάστηκε η επίδραση προσθήκης μαγνησίου σε συγκεντρώσεις 0 mM, 1.1mM, 2 mM, 3 mM και 4 mM και η επίδραση των παρακάτω ιχνοστοιχείων στις αντίστοιχες συγκεντρώσεις: : 2,5, 5, 10 mg/L $FeSO_4$, 0.7, 1.4, 2.8 mg/L $ZnSO_4$, 0.8, 1.6, 3.2 mg/L $MnSO_4$ και 1, 2, 4 mg/L $CoCl_2$. Παρατηρήθηκε ότι η προσθήκη των ιχνοστοιχείων αυξάνει κατά πολύ τη τελική παραγωγή αιθανόλης καθώς βρέθηκε ότι και οι τρεις διαφορετικές συγκεντρώσεις που χρησιμοποιήθηκαν με τα παραπάνω ιχνοστοιχεία βελτιώνουν την παραγωγή αιθανόλης περίπου κατά 40%. Αντιθέτως η προσθήκη ιόντων μαγνησίου οδήγησε σε χαμηλότερες αποδόσεις και εκτιμήθηκε ως βέλτιστη η προσθήκη συγκέντρωσης 1.1 mM.

Τέλος εξετάστηκε η επίδραση της παροχής αέρα σε συνθήκες 0, 0.07, 0.15 και 0.3 λίτρα αέρα ανά λίτρα όγκου αντιδραστήρα ανά λεπτά. Από αυτή τη σειρά πειραμάτων παρατηρήθηκε ότι η ύπαρξη μικροαερόβιων συνθηκών (0.07 L/L/min) ευνοεί την ανάπτυξη του μύκητα και παράλληλα βελτιώνει την παραγωγή αιθανόλης ενώ η αύξηση της παροχής αέρα οδηγεί σε μειωμένες αποδόσεις.

ABSTRACT

This thesis provides a study of the metabolic activity of the fungus *Fusarium oxysporum* to best explore its ethanol production and efficiency under the impact of substrate concentration, the addition of various nutritional supplements and oxygen supply.

The study of growth and fermentation of the fungus was conducted with xylose substrate under various concentrations to find the optimal concentration to apply in all of the following experiments and pretreated substrate wheat straw of 2% w/v concentration. It was also derived that the use of wheat as a substrate does not facilitate ethanol production; hence all following experiments were delivered with xylose substrate.

In order to study the impact of the nutritional supplements the following and concentrations were added: 5,10 and 20 g/L $(NH_4)_2HPO_4$, 1,3,5 g/L yeast extract, 1,3,5 g/L malt extract and 3,5,7 g/L peptone respectively to conclude that the addition of 5g/L yeast extract and peptone optimise ethanol production.

Under the same logic, the impact of metal ions was studied replicating 2 series of experiments testing different Mg ions' concentrations: 0 mM, 1,1mM, 2 mM, 3 mM και 4 mM and different trace metals concentrations: : 2.5, 5, 10 mg/L $FeSO_4$, 0.7, 1.4, 2.8 mg/L $ZnSO_4$, 0.8, 1.6, 3.2 mg/L $MnSO_4$ και 1, 2, 4 mg/L $CoCl_2$. Mineral traces were found to improve ethanol production (40% increase). Nevertheless, Mg ions had a negative impact on ethanol production.

Lastly, oxygen supply was tested under the following conditions: 0, 0.07, 0.15, 0.3 oxygen liters per liter of reactor per minute. It was derived that microaerobic conditions (0.07 L/L/min) in fact do boost fungus' growth and enhance ethanol's production, whereas increase in oxygen supply leads to reduced efficiency.

ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ

Ι. ΘΕΩΡΗΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ 8

1. ΒΙΟΑΙΘΑΝΟΛΗ 8

1.1 Εισαγωγή 8

1.2 Βιοκαύσιμα 9

1.3 Βιοαιθανόλη 10

1.4 Μειώσεις εκπομπών αερίων 12

1.5 Βιοαιθανόλη και περιβάλλον 13

1.6 Λιγνινοκυτταρινούχα προϊόντα

1.6.1 Πρώτες ύλες παραγωγής βιοαιθανόλης 14

1.6.2 Λιγνινοκυτταρινούχος βιομάζα 14

1.6.3 Μετατροπή λιγνινοκυτταρινούχων υλικών σε βιοαιθανόλη 18

2. ΠΑΡΑΓΩΓΗ ΒΙΟΑΙΘΑΝΟΛΗΣ

2.1 Γενικά 20

2.2 Παραγωγή υδρολυμάτων 21

2.3 Μικροβιακά μεταβολικά μονοπάτια

2.3.1 Γλυκόλυση 22

2.3.2 Μονοπάτι φωσφορυλιωμένων πεντοζών 26

2.3.3 Μονοπάτι Entner-Doudoroff 28

3. ΕΠΙΛΟΓΗ ΜΙΚΡΟΟΡΓΑΝΙΣΜΟΥ

3.1 Είδη μικροοργανισμού για την παραγωγή βιοαιθανόλης 30

3.2 Ζύμωση πεντοζών 35

3.3 Ο μύκητας *Fusarium oxysporum* 38

3.4 Το στέλεχος FF11 40

II. ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ

1. ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ

1.1 Χημικά και διαλύματα 46
1.2 Μικροοργανισμός 46
1.3 Προκαλλιέργεια 46
1.4 Αερόβια ανάπτυξη 47
1.5 Αναερόβια ανάπτυξη 47
1.6 Δειγματοληψία 47
1.7 Μετρήσεις αιθανόλης 47
1.8 Μετρήσεις σακχάρων 48
1.9 Επίδραση προσθήκης διαφορετικής συγκέντρωσης υποστρώματος 48
1.10 Επίδραση προσθήκης μεταβλητής συγκέντρωσης $(NH_4)_2HPO_4$ 49
1.11 Επίδραση προσθήκης μεταβλητής συγκέντρωσης malt extract 50
1.12 Επίδραση προσθήκης μεταβλητής συγκέντρωσης εκχυλίσματος ζύμης 51
1.13 Επίδραση προσθήκης μεταβλητής συγκέντρωσης πεπτόνης 52
1.14 Επίδραση προσθήκης μεταβλητής συγκέντρωσης μαγνησίου 53
1.15 Επίδραση προσθήκης μεταβλητής συγκέντρωσης ιχνοστοιχείων 54
1.16 Επίδραση μεταβλητής παροχής αέρα 55
1.17 Επίδραση ζύμωσης προεπεξεργασμένου άχυρου 56

2. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ-ΣΧΟΛΙΑΣΜΟΣ

2.1 Μελέτη ζύμωσης του μικροοργανισμού *F. oxysporum* σε αυξανόμενες συγκεντρώσεις υποστρώματος. 58

2.2 Μελέτη ζύμωσης του μύκητα *F. oxysporum* υπό την επίδραση αζωτούχων ενώσεων

2.2.1 Επίδραση $(NH_4)_2HPO_4$ κατά τη ζύμωση 61
2.2.2 Επίδραση malt extract κατά τη ζύμωση 63

2.2.3 Επίδραση εκχυλίσματος ζύμης κατά τη ζύμωση 65

2.2.4 Επίδραση πεπτόνης κατά τη ζύμωση 67

2.3 Μελέτη ζύμωσης του μύκητα *F. oxysporum* υπό την επίδραση μεταλλικών ενώσεων

2.3.1 Επίδραση ιχνοστοιχείων κατά τη ζύμωση 69

2.3.2 Επίδραση ιόντων μαγνησίου κατά τη ζύμωση 71

2.4 Μελέτη ζύμωσης του μύκητα *F. oxysporum* υπό διαφορετικές συνθήκες παροχής αέρα 73

2.5 Μελέτη ζύμωσης του μύκητα *F. oxysporum* σε προεπεξεργασμένο άχυρο 75

3. ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ-ΠΡΟΤΑΣΕΙΣ 77

4. ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ 79

Ι. ΘΕΩΡΗΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 1: Βιοαιθανόλη

1.1 Εισαγωγή

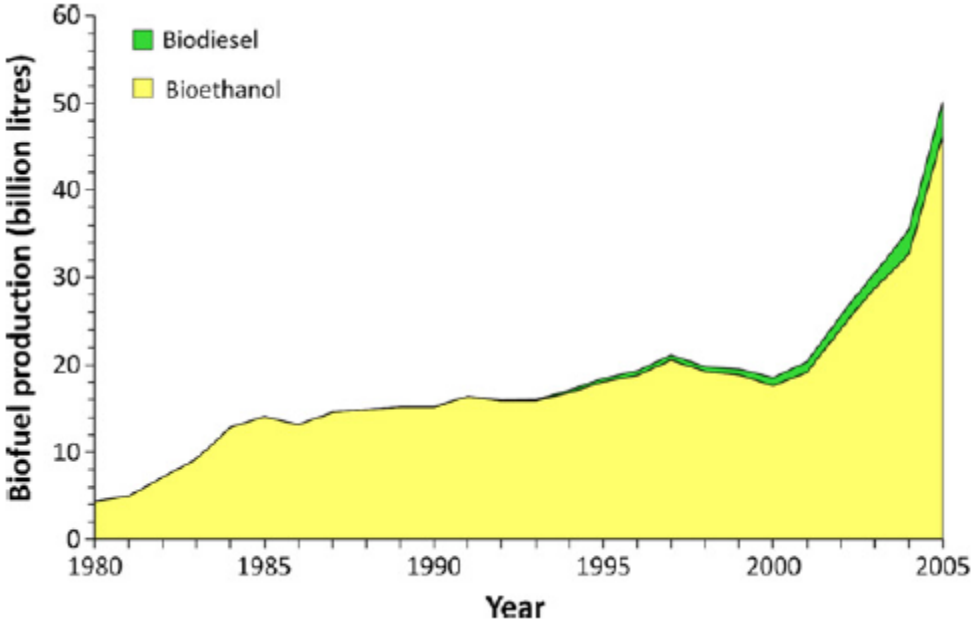
Σήμερα η ανθρωπότητα είναι αντιμέτωπη με τρία προβλήματα: τη πείνα, την έλλειψη ενέργειας και την υποβάθμιση του περιβάλλοντος. Όσον αφορά την ενέργεια είναι εμφανές ότι η υπέρογκη κατανάλωση των συμβατικών καυσίμων έχει οδηγήσει τόσο στην εξαφάνιση αυτών όσο και στην αυξημένη ρύπανση του περιβάλλοντος. Τα ορυκτά καύσιμα (πετρέλαιο, φυσικό αέριο και κάρβουνο) αποτελούν το 80% της συνολικής παροχής ενέργειας. Ανάλογα με τους ρυθμούς παραγωγής και κατανάλωσης, η διάρκεια των σημερινών αποθεμάτων σε ορυκτά καύσιμα εκτιμάται από 41 έως 700 χρόνια [Goldemberg and Johansson, 2004; Goldemberg, 2007].
Κατά αυτό τον τρόπο, είναι δυνατό να συναχθεί το συμπέρασμα ότι τα ορυκτά καύσιμα είναι υπεύθυνα για την εκπομπή μιας σημαντικής ποσότητας ρύπων στην ατμόσφαιρα, συμπεριλαμβανομένων των αερίων του θερμοκηπίου (GHG).

Τα ορυκτά καύσιμα (πετρέλαιο, φυσικό αέριο και κάρβουνο) αποτελούν το 80% της συνολικής παροχής ενέργειας. Ανάλογα με τους ρυθμούς παραγωγής και κατανάλωσης, η διάρκεια των σημερινών αποθεμάτων σε ορυκτά καύσιμα εκτιμάται από 41 έως 700 χρόνια [Goldemberg and Johansson, 2004; Goldemberg, 2007]. Η κατάσταση αυτή προκαλεί αύξηση των τιμών, πολεμικές συγκρούσεις, κάνοντας πολλές κυβερνήσεις να ενδιαφέρονται για τη διασφάλιση της ενεργειακής ασφάλειας τους.

Επιπλέον οι κλιματικές αλλαγές, ως αποτέλεσμα της υπερθέρμανσης του πλανήτη που προκαλείται από τα αέρια του θερμοκηπίου, κυρίως διοξείδιο του άνθρακα (CO_2) που παράγεται κατά τη διάρκεια της καύσης των ορυκτών καυσίμων έχουν προκαλέσει σημαντικές αλλαγές στα οικοσυστήματα. Η σταθερή αύξηση της μέσης θερμοκρασίας της Γης, απειλεί εκατομμύρια ανθρώπους με τον αυξανόμενο κίνδυνο της πείνας, πλημμύρας, έλλειψης νερού και ασθενειών όπως η ελονοσία.

Ως επακόλουθο οδήγησε η ανάγκη για ενεργειακή απεξάρτηση από τις συμβατικές μορφές ενέργειας και η ανάγκη να λάβουμε υπόψη τις κλιματικές αλλαγές που έχει επιφέρει η χρήση αυτών των καυσίμων στο αυξημένο ενδιαφέρον για τα βιοκαύσιμα. Ήδη πολλές αναπτυγμένες χώρες όπως οι ΗΠΑ και άλλες που αναπτύσσονται ταχέως όπως η Κίνα θεωρούν τα βιοκαύσιμα ως το κλειδί που θα οδηγήσει στην ενεργειακή απεξάρτηση και στη μείωση των εκπομπών επιβλαβών αερίων για το φαινόμενο του θερμοκηπίου όπως είναι το CO_2 και το CH_4 [Fulton et al., 2004; Armbruster and Coyle, 2006; Pickett et al., 2008].

Ανάμεσα στο 1980 και 2005, η παγκόσμια παραγωγή βιοκαυσίμων αυξήθηκε από 4.4 σε 50.1 δισεκατομμύρια λίτρα [Murray, 2005; Armbruster and Coyle, 2006].



Εικόνα 1. Η αύξηση στην παγκόσμια παραγωγή βιοαιθανόλης και βιοντίζελ από το 1980 έως το 2005. Πηγή: Murray (2005) και Armbruster and Coyle (2006).

1.2 Βιοκαύσιμα

Τα βιοκαύσιμα είναι καύσιμα των οποίων η πρώτη ύλη είναι η βιομάζα και προέρχεται από ζωντανούς οργανισμούς. Ειδικότερα, η βιομάζα για ενεργειακούς σκοπούς, περιλαμβάνει κάθε τύπο που μπορεί να χρησιμοποιηθεί για την παραγωγή στερεών, υγρών και/ή αέριων καυσίμων [Χριστακόπουλος, Τόπακας, 2011].

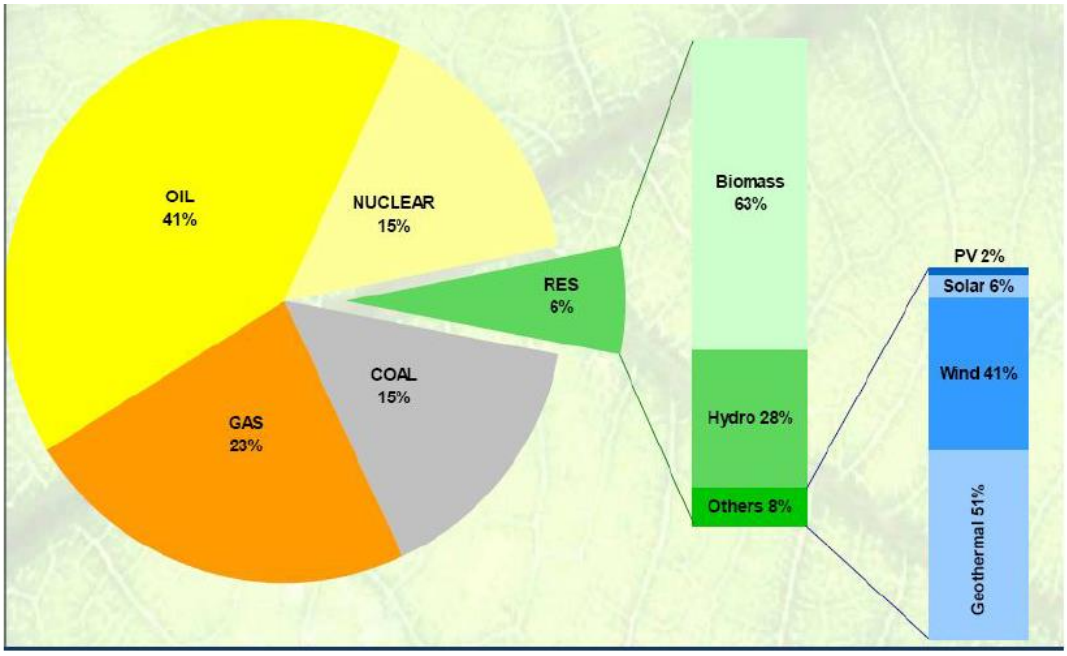
Γενικά τα βιοκαύσιμα είναι προϊόντα που μπορούν να χρησιμοποιηθούν για την τροφοδοσία των κινητήρων εσωτερικής καύσης. Επειδή αποκτώνται από φυσικές πηγές, είναι ανανεώσιμα και μπορούν να ανακυκλώνουν τις εκπομπές CO_2 από τη καύση τους με φωτοσυνθετικούς τρόπους. Συνεπώς μπορούν να αντικαταστήσουν άμεσα τα υγρά καύσιμα που χρησιμοποιούνται στις μεταφορές [Singh N., Singh A., 2009].

Η αντικατάσταση ενός ποσοστού της βενζίνης και ντήζελ για παράδειγμα με βιοκαύσιμα (βιοντήζελ ή βιοαιθανόλη) είναι η ευκολότερη λύση για να αυξηθεί η διαθεσιμότητα των καυσίμων στον τομέα των μεταφορών [Larson E. D., 2008].

Παρόλα αυτά η παραγωγή βιοκαυσίμων έχει υπονομευτεί για λόγους σχετικούς με την παραγωγή και κατανάλωση τροφίμων καθώς η συνεχή χρήση γεωργικών προϊόντων για

βιομάζα θα οδηγούσε στην ανεξέλεγκτη αύξηση της τιμής των τροφίμων (James et al., 2008; Josser and, 2008; Rahman et al., 2008).

Ένα από τα βιοκαύσιμα που κερδίζει έδαφος ολοένα και περισσότερο σήμερα είναι η βιοαιθανόλη [Fulton et al., 2004].



Εικόνα 2.Συμβολή των ανανεώσιμων πηγών ενέργειας στην ενεργειακή κατανάλωση της Ε.Ε. (2005).

1.3 Βιοαιθανόλη

Η βιοαιθανόλη (CH_3CH_2OH) είναι ένα υγρό βιοκαύσιμο υψηλής ενεργειακής περιεκτικότητας, καθαρότερο περιβαλλοντικά από τη βενζίνη και μπορεί να παραχθεί από διάφορα αποθεματικά υλικά βιομάζας. Περίπου 1,3 lt αιθανόλης ισοδυναμούν ενεργειακά με 1 lt βενζίνης. Ο πρώτος που αναφέρθηκε στη δυνατότητα χρήσης αιθανόλης σαν καύσιμο ήταν ο Φορντ (ο ιδρυτής της γνωστής αυτοκινητοβιομηχανίας) το 1890. [Χριστακόπουλος, Τόπακας, 2011]

Η βιοαιθανόλη έχει πολλές εφαρμογές ως καύσιμο, ως πρώτη ύλη και ως διαλύτης, χρησιμοποιείται δε σε μεγάλες ποσότητες σε χημικές και φαρμακευτικές βιομηχανίες, καθώς και στις βιομηχανίες τροφίμων. Παγκοσμίως, τέσσερα εκατομμύρια τόνοι βιομηχανικής αιθανόλης παράγονται ετησίως, από τα οποία το 80% παράγεται με ζύμωση.

Η παραγωγή αιθανόλης έχει αυξηθεί μέσω της εφαρμογής ερευνητικών και βιομηχανικών προγραμμάτων σε πολλές χώρες τα τελευταία χρόνια. Όλο και σημαντικότερο ποσοστό της αγροτικής παραγωγής στρέφεται στα βιοκαύσιμα στα πλαίσια μιας προσπάθειας μείωσης των εισαγωγών πετρελαίου και μείωσης της ατμοσφαιρικής ρύπανσης. Περίπου το 9% της αιθανόλης παράγεται συνθετικά, και έτσι το υπόλοιπο 91% της παγκόσμιας παραγωγής της αιθανόλης βασίζεται στη ζύμωση [Wheeler et al., 1991]. Τέλος αξίζει να σημειωθεί ότι η βιοαιθανόλη παράγεται με αλκοολική ζύμωση από σακχαρούχα φυτά (σακχαροκάλαμο, σακχαρότευτλα κ.α.) ή αμυλούχα φυτά (πχ. το καλαμπόκι) καθώς και από την αξιοποίηση του μη εδώδιμου λιγνινοκυτταρινούχου κλάσματος της φυτικής βιομάζας (στελέχη, κορμοί).

Γενικά οι πρώτες ύλες μπορούν να αποτελέσουν μέχρι και το 70% του κόστους παραγωγής αιθανόλης. Επομένως, η επιλογή του χαμηλού κόστους υλικών επιδρά σημαντικά στην οικονομία της διεργασίας. Η πρώτη ύλη που θα επιλεγεί πρέπει να είναι εύκολα και οικονομικά διαθέσιμη στις εγκαταστάσεις ζύμωσης. Στη Βραζιλία χρησιμοποιείται εκτενώς η ζάχαρη από το σακχαροκάλαμο, ενώ στις ΗΠΑ οι τιμές της ζάχαρης την καθιστούν οικονομικώς ασύμφορη πρώτη ύλη. Αντί γι' αυτή, χρησιμοποιείται περισσότερο ο αραβόσιτος ως πρώτη ύλη για την παραγωγή αιθανόλης.

Η βιοαιθανόλη μπορεί επίσης να αναμιχθεί αυτούσια με την βενζίνη ή να μετατραπεί πρώτα σε αντικροτικό πρόσθετο (αιθυλο-τριτοταγης-βουτυλαιθέρας – ETBE). Με τις κρίσεις του πετρελαίου μάλιστα της δεκαετίας του ΄70, η αιθανόλη καθιερώθηκε ως εναλλακτικό καύσιμο [Balat, 2005]. Το 1975, μόνο $76*10^3$ λίτρα βιομηχανικής αιθανόλης παρήχθησαν από ζύμωση συγκρινόμενη με $7.95*10^6$ λίτρα αιθανόλης από σύνθεση [Akpan et al., 2005]. Τη δεκαετία του ΄80, η χρήση της βιοαιθανόλης παγκοσμίως αυξήθηκε σημαντικά.

Επιπλέον η χρήση της βιοαιθανόλης ως βιοκαύσιμο παρουσιάζει πολλά πλεονεκτήματα τόσο σε περιβαλλοντικό όσο και σε πολιτικο-οικονομικό επίπεδο. Καταρχάς συμβάλλει στη μείωση της ρύπανσης του περιβάλλοντος ελαττώνοντας κυρίως τις εκπομπές διοξειδίου του άνθρακα. Επίσης, όπως και όλα τα βιοκαύσιμα, μειώνει την εξάρτηση από το πετρέλαιο, συμβάλλοντας έτσι στην ασφάλεια του ενεργειακού εφοδιασμού. Επιπλέον, σε σύγκριση με τη βενζίνη, η βιοαιθανόλη έχει έναν υψηλό αριθμό οκτανίου, ευρύτερα όρια ευφλεκτότητας, υψηλότερη ταχύτητα φλόγας και υψηλότερες θερμότητες εξάτμισης. Αυτές οι ιδιότητες επιτρέπουν μια υψηλότερη αναλογία συμπίεσης και έναν πιο σύντομο χρόνο ανάφλεξης οι οποίες οδηγούν στα θεωρητικά πλεονεκτήματα αποδοτικότητας σε μια εσωτερική μηχανή [Balat, 2007]. Τέλος, η βιοαιθανόλη έχει μια υψηλή περιεκτικότητα σε οξυγόνο που υπονοεί μικρότερη ποσότητα απαραίτητης πρόσθετης ουσίας. Το αυξημένο ποσοστό του οξυγόνου επιτρέπει μια καλύτερη οξείδωση των υδρογονανθράκων της βενζίνης με την επακόλουθη

μείωση των εκπομπών του μονοξειδίου του άνθρακα και των αρωματικών ενώσεων [Thomas and Kwong, 2011].

Για τους παραπάνω λόγους αναμένεται να αναπτυχθεί στο εγγύς μέλλον η αιθανόλη που παράγεται από λιγνοκυτταρινούχο πρώτη ύλη και να αντικαταστήσει εν μέρει τη πρώτης γενεάς παραγωγή αιθανόλης. Ήδη η ζήτηση αυξάνεται με ταχύ ρυθμό στις βιομηχανικές χώρες και ιδιαίτερα στις Ηνωμένες Πολιτείες Αμερικής και σε Ευρωπαϊκές χώρες ως συνέπεια των θεσπισμένων ενεργειακών στόχων. Ακόμη πολλά ερευνητικά έργα βρίσκονται σε εξέλιξη σε διάφορες χώρες με σκοπό τη βελτίωση της αποτελεσματικότητας και την οικονομική αποδοτικότητα.

Ωστόσο μερικά από τα μειονεκτήματα της βιοαιθανόλης είναι η χαμηλότερη ενεργειακή πυκνότητα από αυτή της βενζίνης (η βιοαιθανόλη έχει 66% της ενέργειας από αυτή που έχει η βενζίνη), η δυνατότητα οξείδωσης, η χαμηλή φωτεινότητα φλόγας, η χαμηλότερη πίεση ατμού (που καθιστά τις κρύες ενάρξεις των μηχανών δυσκολότερες), η δυνατότητα ανάμιξης με το νερό, και η τοξικότητα στα οικοσυστήματα [MacLean and Lave, 2003]. Το σημαντικότερο όμως μειονέκτημα της βιοαιθανόλης είναι ότι για την παραγωγή της χρησιμοποιούνται γεωργικά προϊόντα που είτε έχουν υψηλό κόστος, είτε χρησιμοποιούνται ανταγωνιστικά για την παραγωγή τροφίμων.

1.4 Μειώσεις εκπομπών αερίων

Ανάμεσα στο 1970 και 2004 παρατηρήθηκε μια αύξηση των εκπομπών σε επιβλαβή αέρια για το φαινόμενο του θερμοκηπίου (GHG emissions) κατά 70% [Berstein et al., 2007]. Σε απλούστερη ανάλυσή, τα βιοκαύσιμα θεωρούνται ότι έχουν ένα ουδέτερο ισοζύγιο σε άνθρακα, επειδή όλες οι εκπομπές CO_2 που απελευθερώνονται κατά την καύση βιοκαυσίμων αντισταθμίζονται από τη δέσμευση του άνθρακα κατά τη διάρκεια της ανάπτυξης των φυτών. Στη πραγματικότητα, τα αέρια του θερμοκηπίου μπορούν να απελευθερωθούν κατά τη διάρκεια κάθε φάσης παραγωγής του βιοκαυσίμου από τη γεωργία ως πρώτη ύλη και τη διαδικασία παραγωγής έως και τη παράδοση του τελικού βιοκαυσίμου. Μελέτες των τελευταίων 15 χρόνων έδειξαν ότι η αντικατάσταση της βενζίνης από τη βιοαιθανόλη και τη κυτταρινούχα αλκοόλη μπορεί να οδηγήσει σε μείωση εκπομπών έως και 31% και 71% αντίστοιχα. Κατά την παραγωγή βιοαιθανόλης επίσης η χρήση σακχαροκαλάμου ως πρώτη ύλη οδηγεί σε ακόμη μεγαλύτερη μείωση των εκπομπών (92%) από οποιοδήποτε άλλη πρώτη ύλη.

1.5 Βιοαιθανόλη και περιβάλλον

Η αύξηση της διείσδυσης της βιοαιθανόλης στο ενεργειακό ισοζύγιο εις βάρος άλλων ρυπογόνων καύσιμων συμβάλλει στη μείωση των εκπομπών των αερίων που προκαλούν το φαινόμενο του θερμοκηπίου.

Η ατελής καύση των ορυκτών καυσίμων έχει σαν αποτέλεσμα την εκπομπή αερίων που συνεισφέρουν στον σχηματισμό αιθαλομίχλης. Επιπλέον, η εξαγωγή, η επεξεργασία και η καύση των ορυκτών καυσίμων έχει σαν αποτέλεσμα τη μόλυνση του αέρα, του νερού και του εδάφους, γεγονός που τα καθιστά επικίνδυνα για το περιβάλλον και τη δημόσια υγεία [Zaldivar et al., 2001]. Αντιθέτως, η αιθανόλη είναι λιγότερο πτητική και έχει χαμηλή φωτοχημική αντιδραστικότητα με την ατμόσφαιρα, και έτσι ο σχηματισμός αιθαλομίχλης μπορεί να είναι μικρότερος. Η αιθανόλη έχει πολύ μικρή τοξικότητα, συγκριτικά με άλλα καύσιμα, και είναι εύκολα βιοδιασπώμενη στο νερό και στο έδαφος, ελαττώνοντας τις καταστρεπτικές συνέπειες τυχόν διαρροών συγκριτικά με τα ορυκτά καύσιμα [Gnansounou et al., 2005].

Με τη χρήση της βιοαιθανόλης επιτυγχάνεται μείωση των εκπομπών διοξειδίου του άνθρακα κατά 60-90% σε σχέση με τη βενζίνη. Επιπλέον, το CO_2 που απελευθερώνεται κατά τη διάρκεια της ζύμωσης και της καύσης, ανακυκλώνεται από τα φυτά μέσω της φωτοσύνθεσης [Zaldivar et al., 2001]. Η μηδαμινή ύπαρξη του θείου στα βιοκαύσιμα συμβάλλει σημαντικά στον περιορισμό των εκπομπών του διοξειδίου του θείου που είναι υπεύθυνο για την όξινη βροχή [Roeher., 2001].

Τα μειονεκτήματα της αιθανόλης ως καύσιμο είναι η αύξηση της εκπομπής αλδεϋδών, ιδιαίτερα της ακεταλδεΰδης, που είναι 2-4 φορές χαμηλότερη στις εκπομπές της βενζίνης [Zaldivaretal., 2001], καθώς και η αύξηση κατά 10% στην εκπομπή οξειδίων του αζώτου. Ωστόσο η χρήση καταλύτη ή κάποια μικρή τροποποίηση μπορεί να περιορίσει αυτές τις εκπομπές [Roeher., 2001].

Το πρωτόκολλο του Κιότο που συντάχθηκε το 1997, σε συμφωνία με την σύμβαση για το περιβάλλον που επικυρώθηκε το 1992 στο Ρίο ντε Τζανέιρο (United Nations Framework Convention on Climate), θέτει σαν στόχους την προώθηση της χρήσης ανανεώσιμων πηγών ενέργειας παγκοσμίως και τη μείωση της εκπομπής των αερίων που συμβάλλουν στο φαινόμενο του θερμοκηπίου, ειδικά του CO_2, από τις αναπτυγμένες χώρες [Ρήγας 2003]. Μάλιστα, η Ευρωπαϊκή Ένωση, το 2003 όρισε ότι τα κράτη μέλη πρέπει να έχουν εξασφαλίσει ένα ελάχιστο ποσοστό βιοκαυσίμων και άλλων ανανεώσιμων καυσίμων στην αγορά τους : 2% μέχρι 31 Δεκεμβρίου 2005 και 5.75% μέχρι 31 Δεκεμβρίου 2010 [Murphy and McCarthy 2005].

1.6 Λιγνινοκυτταρινούχα προϊόντα

1.6.1 Πρώτες ύλες παραγωγής βιοαιθανόλης

Για την παραγωγή βιοαιθανόλης μπορούν να χρησιμοποιηθούν διαλυτοί (σάκχαρα) και αδιάλυτοι (άμυλο, κυτταρίνη) υδατάνθρακες, από διάφορες ανανεώσιμες φυτικές πρώτες ύλες όπως ζαχαροκάλαμο, ζαχαρότευτλα, μίσχανθο, γλυκό σόργο, αγριαγκινάρα, switchgrass, σιτάρι, κριθάρι, καλαμπόκι, κάνναβη, κενάφ, πατάτες, γλυκοπατάτες, μανιόκα, ηλίανθο, κ.ά. Την καταλληλότητα των υλών αυτών καθορίζουν οι τιμές και οι αποδόσεις τους σε βιοαιθανόλη. [Kaparaju et al., 2008]

Με βάση την πρώτη ύλη, η βιοαιθανόλη χαρακτηρίζεται ως πρώτης και δεύτερης γενεάς. Η πρώτης γενεάς παράγεται από σακχαρούχες και αμυλούχες πρώτες ύλες και η δεύτερης γενεάς από κυτταρινούχες και ημικυτταρινούχες (ξυλώδεις) πρώτες ύλες ορισμένων φυτών, γεωργικών και δασικών υπολειμμάτων και γεωργοβιομηχανικών παραπροϊόντων και αποβλήτων. Οι πρώτες ύλες για την παραγωγή βιοαιαθανόλης κατηγοριοποιούνται ως εξής:

Σακχαρούχες πηγές: όταν η πρώτη ύλη είναι φυτά σακχαρούχου σύστασης όπως σακχαρότευτλα, σακχαροκάλαμα και σόργο υπόκεινται, μετά από κατάλληλη φυσική προκατεργασία σε άμεση ζύμωση για την παραγωγή βιοαιθανόλης.

Αμυλούχες πηγές: όταν η πρώτη ύλη είναι ενεργειακά φυτά αμυλούχου σύστασης όπως οι σπόροι καλαμποκιού, σίτου και κριθής πριν το στάδιο της ζύμωσης προηγείται ένα στάδιο υδρόλυσης με την χρήση αμυλασών.

Λιγνινοκυτταρινούχες πηγές: Όταν η πρώτη ύλη είναι η λιγνινοκυτταρινούχος βιομάζα στην οποία κατατάσσονται τα υπολείμματα της υλοτομίας, της γεωργίας, της βιομηχανίας τροφίμων, τα αστικά στερεά λύματα καθώς και οι ενεργειακές καλλιέργειες πριν το στάδιο της υδρόλυσης προηγείται το στάδιο χημικής ή φυσικής προκατεργασίας.

1.6.2 Λιγνινοκυτταρινούχος βιομάζα

Οι λιγνινοκυτταρινούχες πρώτες ύλες αποτελούν τον πιο άφθονο, ανανεώσιμο και φθηνό φυσικό πόρο στη Γη, αποτελώντας το 50% της παγκόσμιας βιομάζας. Οι πηγές λιγνινοκυτταρινούχου βιομάζας είναι δασικά και αγροτικά κατάλοιπα, υπολείμματα της βιομηχανίας τροφίμων και ενεργειακές καλλιέργειες, πηγές μη εδώδιμες, καθιστώντας το συγκεκριμένο κλάσμα της φυτικής βιομάζας ελκυστικό καθώς δεν ανταγωνίζεται τη

βιομηχανία τροφίμων και επιπροσθέτως είναι αρκετά πιο φθηνό από τις σακχαρούχες-αμυλούχες πρώτες ύλες [Olsson and Hahn-Hagerdal, 1996].

Τα κύρια συστατικά της λιγνινοκυτταρινούχου βιομάζας είναι η κυτταρίνη, η ημικυτταρίνη και η λιγνίνη. Γενικά η σύσταση της λιγνινοκυτταρινούχου βιομάζας αποτελείται από 38-50% κυτταρίνη, 23-32% ημικυτταρίνη και 15-25% λιγνίνη. Στον Πίνακα 1.1 παρουσιάζεται η σύσταση διαφόρων λιγνινοκυτταρινούχων πρώτων υλών.

Πίνακας 1. Σύσταση λιγνινοκυτταρινούχων υλικών (%, ξηρό β/β).

Πρώτη ύλη	**Κυτταρίνη**	**Ημικυτταρίνη**	**Λιγνίνη**
Λευκά	44	22	26
Πεύκο	44	22	28
Switch grass	32	25	18
Φλοιός ρυζιού	36	15	19
Άχυρο σίτου	30	22	17
Άχυρο κριθαριού	40	20	15
Στέλεχος αραβόσιτου	38	30	23
Σπάδικας αραβόσιτου	42	39	14
Βαγάσση σόργου	40	36	4
Στέλεχος γλυκού σόργου	19	15	12

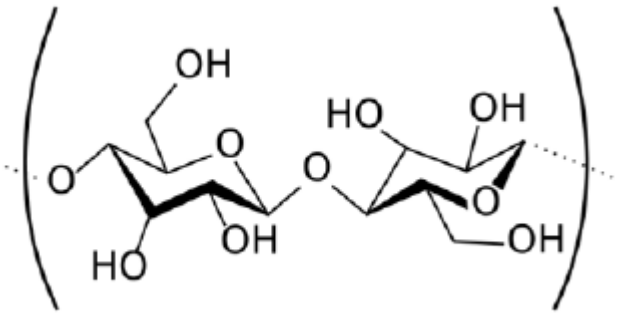
Πηγή : Δόγαρης Διδακτορική διατριβή, 2010

Κυτταρίνη

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. Τα πολυμερή κυτταρίνης παρουσιάζονται ως διατεταγμένες δομές και η κύρια λειτουργία τους είναι να εξασφαλίσουν την ακαμψία του κυτταρικού τοιχώματος των φυτών.

Τέλος, η κυτταρίνη διογκώνεται απεριόριστα και διαλύεται πλήρως από θειικό οξύ, υδροχλωρικό οξύ και φωσφορικό οξύ.



Εικόνα 3. Το συστατικό μονομερές της κυτταρίνης, η κελλοβιόζη.

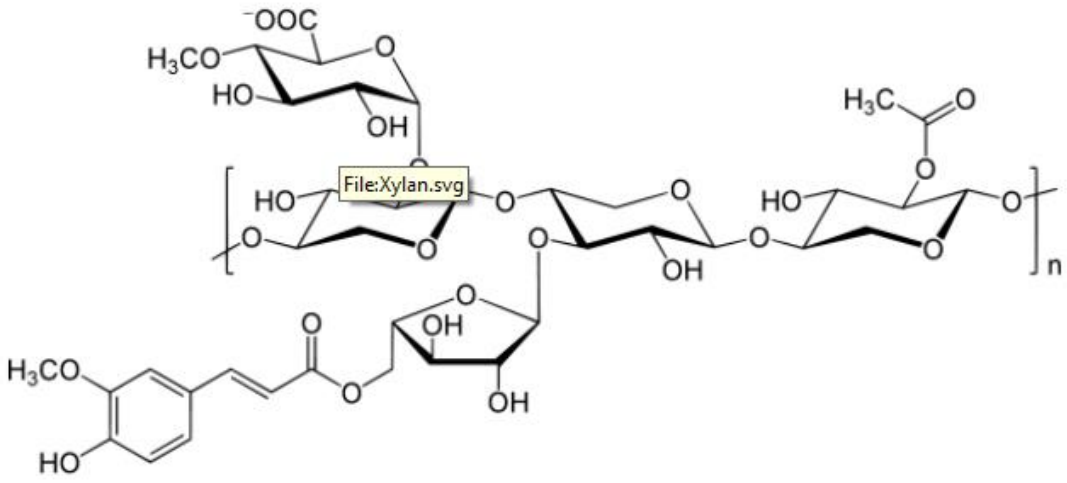
Ημικυτταρίνη

Η ημικυτταρίνη μπορεί να οριστεί ως το μίγμα συμπολυμερών ουσιών που μαζί με την κυτταρίνη και τη λιγνίνη συγκροτούν τα κυτταρικά τοιχώματα των ξύλινων ιστών. Η δομή δεν είναι κρυσταλλική και συνεπώς είναι ευκολότερο να υδρολυθεί.

Το ποσοστό τους στα φυτικά είδη ποικίλλει εξαιρετικά (17-42%) ωστόσο σε ξύλο πλατυφύλλων υπάρχουν κατά κανόνα περίπου 30% περισσότερες ημικυτταρίνες απ' ότι σε ξύλο κωνοφόρων.

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-φουκόζη, από εξόζες όπως D-μαννόζη, D-γλυκόζη, D-γαλακτόζη και ουρονικά οξέα όπως D-γλυκουρονικό οξύ, D-4-O-μεθυλ-γλυκουρονικό οξύ και D-γαλακτουρονικό οξύ. Η κατηγοριοποίηση των ημικυτταρινών γίνεται συνήθως με βάση το κυρίαρχο μονομερές σάκχαρο. Κατά αυτό τον τρόπο, οι ημικυτταρίνες διακρίνονται σε γλυκάνες, μαννάνες, αραβινάνες, γαλακτάνες και ξυλάνες.

Η ξυλάνη αποτελεί το κυριότερο συστατικό της ημικυτταρίνης και αποτελεί 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.

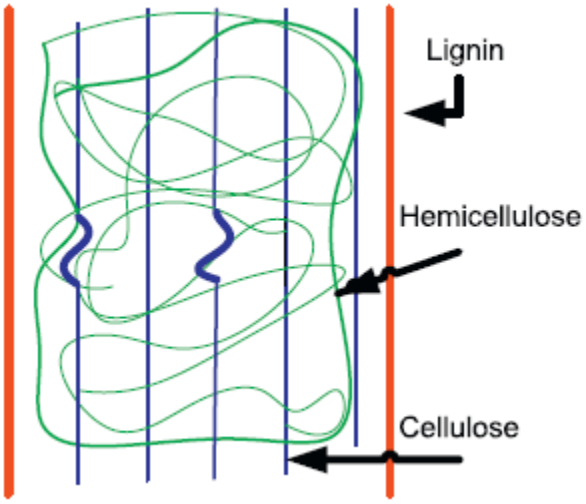


Εικόνα 4. Πιθανή χημική δομή της ξυλάνης

Λιγνίνη

Η λιγνίνη, η οποία είναι άμορφη και αδιάλυτη στο νερό, είναι ένα δίκτυο αρωματικών πολυμερών με βασική δομική μονάδα το φαινυλοπροπάνιο συνδέεται ισχυρά με τα ινίδια κυτταρίνης και την ημικυτταρίνη, κυρίως με δεσμούς υδρογόνου αλλά και ομοιοπολικούς.

Είναι γενικά αποδεκτό ότι η λιγνίνη είναι η «κόλλα» που δένει την κυτταρίνη και την ημικυτταρίνη, προσδίδοντας ακαμψία και ανθεκτικότητα στην υγρασία στην δομή της λιγνινοκυτταρινούχας βιομάζας. Υδρολύεται δύσκολα κυρίως με αλκαλικά διαλύματα σε υψηλές θερμοκρασίες.



Εικόνα5. Σχηματική απεικόνιση της δομής των λιγνινοκυτταρινούχων υλικών [Carolina Conde-Mejía., 2011]

1.6.3 Μετατροπή λιγνινοκυτταρινούχων υλικών σε βιοαιθανόλη

Λιγνοκυτταρινούχες ύλες κατάλληλες για την παραγωγή αιθανόλης θεωρούνται το σκληρό και μαλακό ξύλο, τα δασοκομικά υπολείμματα , τα γεωργικά υπολείμματα, καθώς και τα αστικά στερεά απόβλητα. Η σύνθεση της πρώτης ύλης εξαρτάται από την πηγή (Πίνακας 2).

Τόσο η κυτταρίνη όσο και η ημικυτταρίνη, που τυπικά αποτελούν 36-61% και 13-39% της συνολικής ξηρής μάζας αντιστοίχως (Πίνακας 2), μπορούν να χρησιμοποιηθούν για την παραγωγή αιθανόλης. Το περιεχόμενο σε πεντόζες στην πρώτη ύλη είναι σημαντικό καθώς οι πεντόζες είναι δύσκολο να ζυμωθούν προς αιθανόλη. Αποτελούν συνήθως 6-28% της συνολικής ξηράς ύλης. Για να επιτευχθεί όμως η μέγιστη απόδοση αιθανόλης, πρέπει όλοι οι μονοσακχαρίτες να ζυμωθούν. Στο μαλακό ξύλο η ημικυτταρίνη περιέχει υψηλή αναλογία σε μαννόζη και περισσότερή γαλακτόζη από την ημικυτταρίνη σκληρού ξύλου, ενώ η ημικυτταρίνη σκληρού ξύλου περιέχει μια υψηλή αναλογία σε πεντόζες. Στη τελευταία περίπτωση, η αποτελεσματική ζύμωση του κλάσματος πεντοζών είναι ιδιαίτερης σημασίας.

Πίνακας 2. Μέση σύσταση λιγνινοκυτταρινούχων υλικών σε κυτταρίνη, ημικυτταρίνη και λιγνίνη.

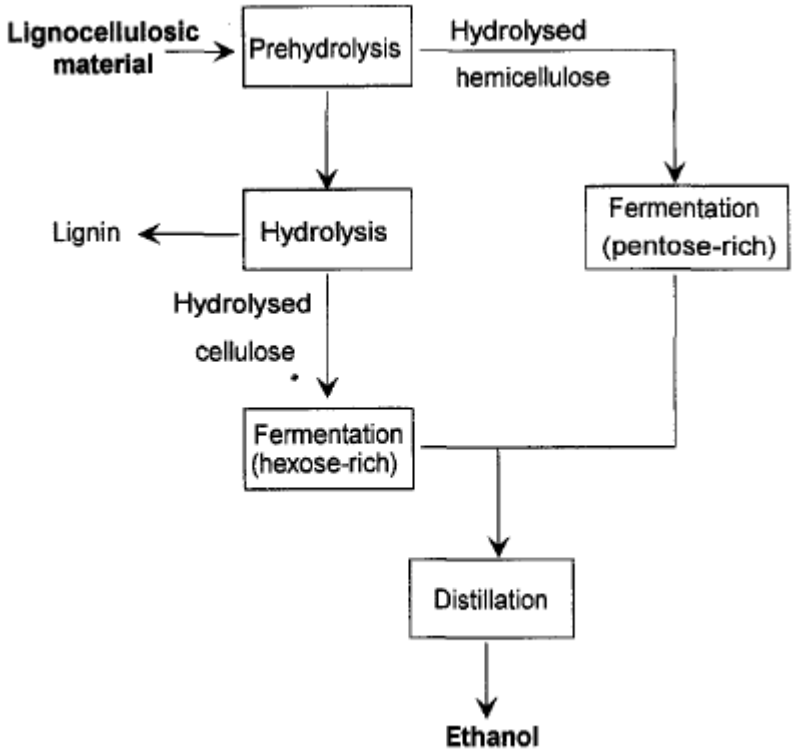
Raw material	Cellulose	Hemicellulose	Lignin
Hardwoods			
White birch	41	36.2	18.9
Poplar aspen	50.8–53.3	26.2–28.7	15.5–16.3
Red maple	44.1	29.2	24
Hybrid poplar	41.7	20.2	29.3
Eucalyptus viminalis	41.7	14.1	31
Softwoods			
Pinus banksiana	41.6	25.6	28.6
Pinus pinaster	42.9	17.6	30.2
fir	43.9	26.5	28.4
Agricultural residues			
Corn cobs	33.7–41.2	31.9–36	6.1–15.9
Sugar cane bagasse	40–41.3	27–37.5	10–20
Wheat straw	32.9–50	24–35.5	8.9–17.3
Rice straw	36.2–47	19–24.5	9.9–24
Corn stalks	35–39.6	16.8–35	7–18.4
Barley straw	33.8–37.5	21.9–24.7	13.8–15.5
Soya stalks	34.5	24.8	19.8
Cotton stalks	38.4–42.6	20.9–34.4	21.45

Πηγή: Garrote et al. (1999)

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 2: Παραγωγή βιοαιθανόλης

2.1 Γενικά

Η παραγωγή αιθανόλης από λιγνοκυτταρινούχα υλικά περιλαμβάνει τα παρακάτω βήματα: αποδόμηση της λιγνοκυτταρινούχας δομής σε ένα ζυμώσιμο υπόστρωμα στο οποίο θα πραγματοποιείται ζύμωση και απόσταξη του ζωμού ζύμωσης για να ληφθεί 95%αιθανόλης (σχήμα 2).



Εικόνα 7. Ένα γένικο διάγραμμα παραγωγής αιθανόλης από λιγνινοκυτταρινούχα υλικά. Πηγή: Conn I., 2007

Τα κύρια προβλήματα που παρατηρούνται κατά τη μετατροπή των λιγνοκυτταρινικών προϊόντων υδρόλυσης προς αιθανόλη είναι δύο. Πρώτον μετά την προεπεξεργασία, το υδρόλυμα δεν περιέχει μόνο ζυμώσιμα σάκχαρα, αλλά επίσης ένα ευρύ φάσμα ενώσεων που έχουν ανασταλτικές επιδράσεις επί των μικροοργανισμών που χρησιμοποιούνται για τη ζύμωση. Η σύνθεση των προϊόντων υδρόλυσης εξαρτάται από τον τύπο του λιγνοκυτταρινούχου υλικού που έχει χρησιμοποιηθεί και από τη διαδικασία προκατεργασίας. Δεύτερον τα προϊόντα υδρόλυσης της ημικυτταρίνης περιέχουν όχι μόνον εξόζες αλλά και

πεντόζες. Οι εξόζες μπορούν εύκολα να ζυμωθούν από τον Saccharomyces cerevisiae με γνωστές διαδικασίες. Οι πεντόζες ωστόσο είναι πιο δύσκολο να ζυμωθούν.

Παρ' όλα αυτά πολλές οικονομικές αξιολογήσεις έδειξαν ότι η αποτελεσματική ζύμωση των πεντοζών είναι σημαντική για τη συνολική οικονομική αποδοτικότητα της παραγωγής αιθανόλης από λιγνοκυτταρινούχα υλικά.

Συνεπώς για την οικονομική αποδοτικότητα της παραγωγής αιθανόλης από λιγνοκυτταρινούχα υλικά απαιτείται: (i) η ορθή επιλογή ενός μικροοργανισμού, και (ii) η ανάπτυξη τεχνικών στα σταδία που λαμβάνουν χώρα, όπως η διαδικασία της ζύμωσης και η στρατηγική σύνδεσης του σταδίου ζυμώσεως με τα υπόλοιπα στάδια της διαδικασίας [Olsson and Hahn-Hagerdal, 1996].

2.2 Παραγωγή υδρολυμάτων

Η υποβάθμιση της λιγνοκυτταρινούχας δομής απαιτεί δύο βήματα : α) τη προϋδρόλυση στην οποία σπάει η δομή της ημικυτταρίνης και β) την υδρόλυση του κλάσματος κυτταρίνης στην οποία η λιγνίνη θα παραμείνειως ένα στερεό παραπροϊόν. Τα προϊόντα υδρόλυσης των ημικυτταρινών και των κυτταρινών ζυμώνονται προς αιθανολή είτε μαζί είτε ξεχωριστά. Κατά την διάρκεια της αποικοδόμησης της λιγνοκυτταρινούχας δομής, απελευθερώνονται όχι μόνο ζυμώσιμα σάκχαρα, αλλά και μία ευρεία ποικιλία ενώσεων, μερικές από τις οποίες μπορούν να αναστείλουν την ζύμωση του μικροοργανισμού [A. Singh and R. Bishnoi, 2012].

Η διαδικασία προϋδρόλυσης μπορεί να διεξαχθεί με φυσικές, χημικές, ή βιολογικές μεθόδους, όπως η προκατεργασία με εκτόνωση ατμού, με όξινο καταλύτη, η υδροθερμική προκατεργασία, η προκατεργασία με έκρηξη αμμωνίας και η υγρή προκατεργασία οξείδωσης [Conde-Mejía et. al., 2011]. Στο στάδιο προϋδρόλυσης, η ημικυτταρίνη υγροποιείται με αποτέλεσμα τη παραγωγή ενός μίγματος μονο-και ολιγοσακχαριτών [A. Singh and R. Bishnoi, 2012].

Η υδρόλυση της κυτταρίνης διεξάγεται συνήθως με ασθενή οξέα pH~ 8 ή από ένζυμα. Γενικώς, οι διαδικασίες όξινης υδρόλυσης παράγουν ένα ευρύ φάσμα ενώσεων μερικές εκ των οποίων μπορούν να επηρεάσουν αρνητικά τα επόμενα στάδια της διαδικασίας.

Τρεις από τις συνηθέστερες διεργασίες υδρόλυσης είναι η διαδικασία υδρόλυση με χρήση πυκνού υδροχλωρικού οξέος, η αραιή όξινη υδρόλυση που γίνεται σε 2 στάδια και η ενζυματική υδρόλυση συγκρίνονται συχνά ως προς την οικονομική αποδοτικότητα. Ωστόσο καμία από τις τρεις διαδικασίες παραγωγής αιθανόλης δε θα μπορούσε να αποκλειστεί ως

λιγότερο οικονομική από τις άλλες. Το κόστος της ενζυματικής διεργασίας είναι περισσότερο ασαφές λόγω της αβεβαιότητας του κόστους του ενζύμου. Η τεχνολογία στην ενζυματική διαδικασία έχει παρόλα αυτά τις καλύτερες δυνατότητες για βελτίωση [Conde-Mejva et. al., 2011].

2.3 Μικροβιακά μεταβολικά μονοπάτια

2.3.1 Γλυκόλυση

Η γλυκόλυση είναι μία αλληλουχία αντιδράσεων η οποία μετατρέπει τη γλυκόζη σε πυροσταφυλικό με τη ταυτόχρονη παραγωγή ATP.

Η ζύμη μετατρέπει τις εξόζες σε αιθανόλη και σε διοξείδιο του άνθρακα μέσα από το μονοπάτι της γλυκόλυσης, όπως παρουσιάζεται στην παρακάτω αντίδραση [Singh and Kumar 1991]:

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

Πιο συγκεκριμένα σε αερόβιους μικροοργανισμούς η γλυκόλυση είναι το προοίμιο του κύκλου του κιτρικού οξέος και της αλυσίδας μεταφοράς ηλεκτρονίων και έχει ως αποτέλεσμα την άντληση ενέργειας από τη γλυκόζη. Στους αναερόβιους μικροοργανισμούς αντιθέτως, όπως είναι οι ζυμομύκητες, το πυροσταφυλικό μετατρέπεται σε αιθανόλη.

Οι ενδιάμεσες ενώσεις της γλυκόλυσης έχουν είτε 6 είτε 3 άτομα άνθρακα. Όλες οι ενδιάμεσες ενώσεις από τη γλυκόζη μέχρι το πυροσταφυλικό είναι φωσφορυλιωμένες. Οι 10 αντιδράσεις της γλυκόλυσης λαμβάνουν χώρα στο κυτταροδιάλυμα. Σε πρώτο στάδιο η γλυκόζη μετατρέπεται σε 1,6-διφωσφορική φρουκτόζη από μία φωσφορυλίωση, μια ισομερείωση και μια δεύτερη αντίδραση φωσφορυλίωσης. Σε αυτές τις αντιδράσεις καταναλώνονται 2 μόρια ATP ανά μόριο γλυκόζης και σχηματίζεται 6-φωσφορική γλυκόζη. Η μεταφορά της φωσφορυλομάδας από το ATP στην υδροξυλική ομάδα του C-6 της γλυκόζης καταλύεται από την εξωκινάση. Η διαδικασία αυτή αποτελεί το προοίμιο της καθαρής σύνθεσης του ATP.

Σε δεύτερο στάδιο η 1,6-διφωσφορική φρουκτόζη διασπάται από την αλδολάση σε φωσφορική διυδροξυακετόνη και 3-φωσφορική γλυκεραλδεΰδη που εύκολα αλληλομετατρέπονται. Η 3-φωσφορική γλυκεραλδεΰδη οξειδώνεται και φωσφορυλιώνεταιγια να σχηματίσει 1,3-BPG, ένα ακυλοφωσφορικό με υψηλό δυναμικό μεταφοράς φωσφορικής ομάδας και καθώς σχηματίζεται το 3-φωσφογλυκερικό, παράγεται ATP.

Στο τελευταίο στάδιο της γλυκόλυσης, το φωσφοενολοπυροσταφυλικό, ένα δεύτερο ενδιάμεσο με υψηλό δυναμικό μεταφοράς φωσφορικής ομάδας, σχηματίζεται με μία μετατόπιση φωσφορικής ομάδας και μία αφυδάτωση. Ένα ακόμη ATP παράγεται καθώς το φωσφοενολοπυροσταφυλικό μετατρέπεται σε πυροσταφυλικό. Κατά αυτό τον τρόπο υπάρχει ένα καθαρό κέρδος δύο μορίων ATP κατά τον σχηματισμό δύο μορίων πυροσταφυλικού από ένα μόριο γλυκόζης.

Η συνολική αντίδραση κατά τη μετατροπή της γλυκόζης σε πυροσταφυλικό είναι:

Γλυκόζη + $2P_i$ + 2 ADP + 2 NAD+ → 2 πυροσταφυλικό + 2 ATP + 2 NADH + H^+ + H_20

Η γλυκολυτική πορεία έχει διπλό ρόλο καθώς αποικοδομεί τη γλυκόζη για την παραγωγή του ATP και προμηθεύει δομικές μονάδες για τις συνθετικές αντιδράσεις, όπως τον σχηματισμό αλυσίδων λιπαρών οξέων. Η ταχύτητα μετατροπής της γλυκόζης σε πυροσταφυλικό ρυθμίζεται για να αντιμετωπιστούν αυτές οι δύο βασικές κυτταρικές ανάγκες. Κατά τη γλυκόλυση, οι αντιδράσεις που καταλύονται από την εξοκινάση, τη φωσφοφρουκτοκινάση και την κινάση του πυροσταφυλικού είναι ουσιαστικά μη αντιστρεπτές. Συνεπώς παίζουν έναν ρυθμιστικό και καταλυτικό ρόλο.

Ο δέκτης ηλεκτρονίων κατά την οξείδωση της 3-φωσφορικής γλυκεραλδεΰδης είναι το NAD^+, το οποίο πρέπει να αναγεννάται για να προχωρεί η γλυκόλυση. Στους αερόβιους οργανισμούς, το NADH που σχηματίζεται κατά τη γλυκόλυση μεταφέρει τα ηλεκτρόνια του στο O_2 μέσω της αλυσίδας μεταφοράς ηλεκτρονίων η οποία αναγεννά το NAD^+.

Υπό αναερόβιες συνθήκες είναι δυνατόν το πυροσταφυλικό να μετατραπεί σε αιθανόλη, γαλακτικό ή σε ακέτυλο-συνένζυμο Α. Σε μερικούς μικροοργανισμούς, το NAD^+αναγεννάται κανονικά από τη σύνθεση του γαλακτικού ή της αιθανόλης από το πυροσταφυλικό ενώ το NAD^+ αναγεννιέται αποκλειστικά από την αναγωγή του πυροσταφυλικού σε γαλακτικό. Αυτές οι δύο διεργασίες καλούνται ζυμώσεις[L. Stryer., 1994].

Επομένως η μετατροπή της γλυκόζης σε αιθανόλη καλείται αλκοολική ζύμωση και το συνολικό αποτέλεσμα αυτής της διεργασίας είναι:

Γλυκόζη + 2 Pi + 2 ADP + 2 H^+ → 2 αιθανόλη + 2 CO_2 + 2 ATP + 2 H_2O

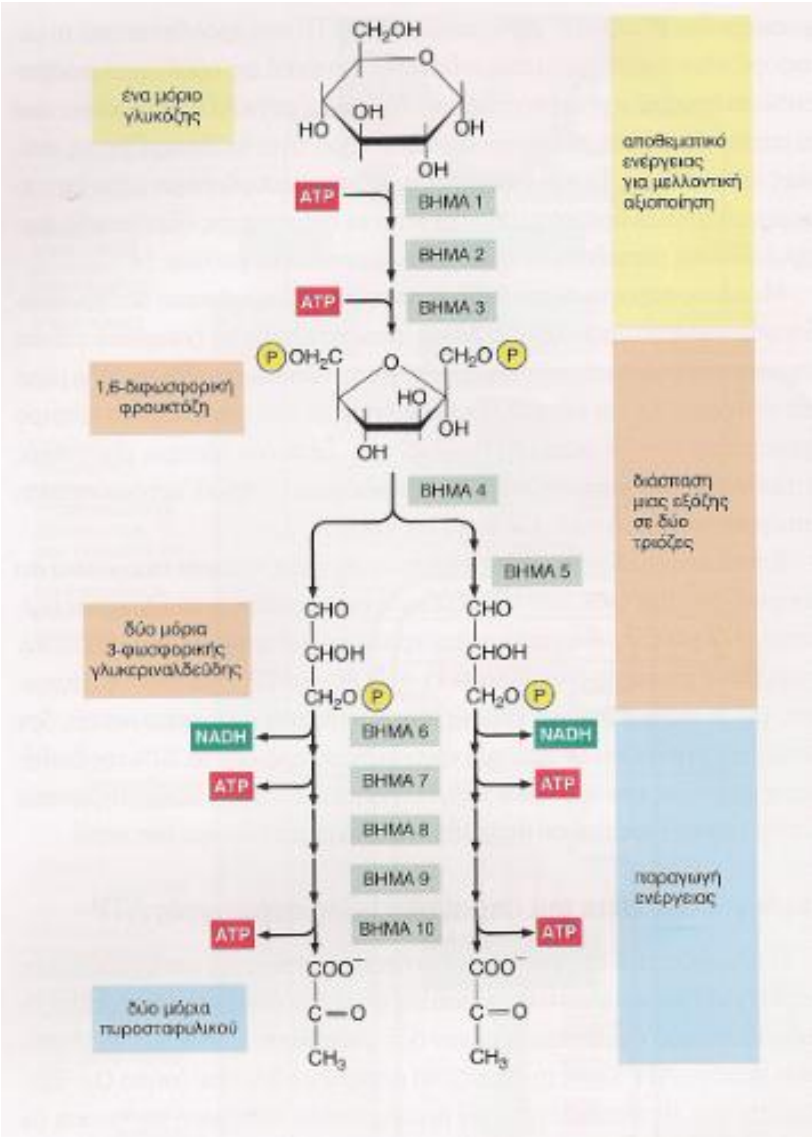
Για τα περισσότερα ζωικά και φυτικά κύτταρα, η γλυκόλυση δεν είναι παρά ένα προοίμιο στο τελικό στάδιο του μεταβολισμού της γλυκόζης. Στην περίπτωση αυτή, το πυροσταφυλικό μεταφέρεται γρήγορα στο μιτοχόνδριο, όπου μετατρέπεται σε CO_2 και ακετυλο-CoA, το οποίο στη συνέχεια οξειδώνεται πλήρως προς CO_2 και H_2O, παράγοντας το μεγαλύτερο ποσό

της ενέργειας. Για πολλούς, ωστόσο αναερόβιους οργανισμούς, όπως είναι και οι αιθανολοπαραγωγοί μικροοργανισμοί, οι οποίοι δεν χρησιμοποιούν μοριακό οξυγόνο και είναι σε θέση να αυξάνονται και να διαιρούνται χωρίς οξυγόνο, η κύρια πηγή ATP είναι η γλυκόλυση. Σε αυτές τις αναερόβιες συνθήκες, το πυροσταφυλικό και τα ηλεκτρόνια του NADH παραμένουν στο κυτταροδιάλυμα. Η παραγωγή της αιθανόλης είναι απαραίτητη υπό αναερόβιες συνθήκες , ώστε το NADH να αποδώσει τα ηλεκτρόνια του και να μετατραπεί ξανά σε NAD^+. Η αναγέννηση του NAD^+ είναι απαραίτητη για την συνεχή εξέλιξη των αντιδράσεων της γλυκόλυσης [Χριστακόπουλος, Τόπακας, 2011].

Όσον αφορά την αποδοτικότητα με υπόστρωμα τη γλυκόζη, η θεωρητική απόδοση αιθανόλης είναι 0.51 g/g και η απόδοση της ανάπτυξης 0.12 g/g. Συνήθως κατά τη ζύμωση παράγονται και υποπροϊόντα, όπως γλυκερίνη, ηλεκτρικό οξύ και οξικό οξύ, με αποτέλεσμα η πραγματική απόδοση να ανέρχεται στο 90%-95% της θεωρητικής. Οι βέλτιστες τιμές θερμοκρασίας και pH για τη ζύμη είναι 30° -35^oC και 4-6, αντίστοιχα [Roeher., 2001, Shuler and Kargi 2005].. Όσον αφορά τους θερμόφιλους μικροοργανισμούς η βέλτιστη θερμοκρασία μπορεί να κυμανθεί από 50° έως 60^oC. Η παραγωγή αιθανόλης γίνεται υπό αναερόβιες συνθήκες. Ίχνη οξυγόνου (0.05-0.1 mmHg) απαιτούνται από τη ζύμη για τη βιοσύνθεση λιπιδίων και τη συντήρηση των κυτταρικών διαδικασιών.

Το θρεπτικό υλικό πρέπει να είναι εξισορροπημένο από την άποψη περιεκτικότητας σε άζωτο, φώσφορο, μεταλλικά άλατα και ιχνοστοιχεία. Το θρεπτικό υλικό με πηγή άνθρακα τη γλυκόζη και τη ξυλόζη συμπληρώνεται συνήθως με NH_4Cl, KH_2PO_4, $MgSO_4$, $CaCl_2$ και εκχύλισμα ζύμης. Στη βιομηχανία μόνο μερικά αμμωνιακά και φωσφορικά άλατα προστίθενται κατά την αραίωση της μελάσας. Η συγκέντρωση γλυκόζης στα διαλύματα που προστίθεται κατά τη διάρκεια της ζύμωσης έχει μεγάλη επίδραση στο ρυθμό και στην απόδοση της παραγωγής αιθανόλης. Συγκεντρώσεις γλυκόζης μεγαλύτερες από 100 g/L αναστέλλουν την ανάπτυξη της ζύμης.

Η αιθανόλη και ορισμένα υποπροϊόντα προκαλούν αναστολή της ανάπτυξης της ζύμης σε συγκέντρωση μεγαλύτερη από 5% (v/v). Γι' αυτό, η συγκέντρωση γλυκόζης στα θρεπτικά διαλύματα συνεχούς ζύμωσης πρέπει να είναι μικρότερη από 100 g/l, με αποτέλεσμα η συγκέντρωση αιθανόλης στο υγρό ζύμωσης να είναι κάτω από 50 g/l. Ανθεκτικά στην αιθανόλη στελέχη ζύμης αναπτύσσονται για να αποφύγουμε την αναστολή αιθανόλης. Η αφαίρεση αιθανόλης από το υγρό ζύμωσης κατά τη διάρκεια της ζύμωσης είναι μια εναλλακτική λύση για την ελάττωση της αναστολής από την αιθανόλη.



Εικόνα 8. Συνοπτική απόδοση της γλυκόζης. Καθένα από τα 10 βήματα της γλυκόλυσης καταλύεται από ένα διαφορετικό ένζυμο. Στο βήμα 4, μια εξόζη διασπάται σε 2 τριόζες. Έτσι ο αριθμός των μορίων σε κάθε επακόλουθο βήμα είναι διπλάσιος. Η φάση παραγωγής ενέργειας, η οποία οδηγεί σε σύνθεση ATP και NADH, αρχίζει στο βήμα 6.

Πηγή: B. Alberts, D. Bray, K. Hopkin, A. Johnson, J. Lewis, M. Raff, K. Roberts, P. Walkers, Essential cell biology, 2003, Ιατρικές Εκδόσεις Π.Χ. Πασχαλίδης, 2006.

2.3.2 Μονοπάτι φωσφορυλιωμένων πεντοζών

Εκτός από την παραγωγή ATP υπάρχει και ένας ακόμη τύπος μεταβολικής ενέργειας, εκείνος της αναγωγικής ισχύος. Το μέσο για την άμεση διάθεση αναγωγικής ισχύος είναι το NADPH. Συνεπώς το μονοπάτι φωσφορυλιωμένων πεντοζών που εμπλέκεται στον μεταβολισμό των υδατανθράκων είναι, σε αντίθεση με την γλυκόλυση, ένα οξειδωτικό μονοπάτι [L. Stryer, 1994].

Για τον μεταβολισμό των πεντοζών, όπως είναι η ξυλόζη και η αραβινόζη, το μονοπάτι των φωσφορυλιωμένων πεντοζών είναι ιδιαίτερης σημασίας καθώς από αυτό γίνεται η εισαγωγή τους στον κεντρικό μεταβολισμό υδατανθράκων, και συγκεκριμένα υπό την μορφή της φωσφορυλιωμένης ξυλουλόζης. Στους ευκαρυωτικούς μικροοργανισμούς που μεταβολίζουν φυσικά την ξυλόζη και μετέπειτα σε ξυλουλόζη με το ένζυμο αφυδρογονάση της ξυλιτόλης. Στη συνέχεια με τη δράση της κινάσης της ξυλουλόζης, μετατρέπεται σε φωσφορυλιωμένη ξυλουλόζη και εισέρχεται στο μονοπάτι των φωσφορυλιωμένων πεντοζών. Στους προκαρυωτικούς μικροοργανισμούς που μεταβολίζουν φυσικά την ξυλόζη, αυτή μετατρέπεται απευθείας σε ξυλουλόζη με το ένζυμο ισομεράση της ξυλόζης. Κατόπιν, μετατρέπεται σε φωσφορυλιωμένη ξυλουλόζη με την δράση της κινάσης της ξυλουλόζης και εισέρχεται στο μονοπάτι των φωσφορυλιωμένων πεντοζών [Χριστακόπουλος και Τόπακας, 2011].

Γενικά στη πορεία των φωσφορικών πεντοζών παράγεται NADPH και σάκχαρα με 5 άτομα άνθρακα όταν η 6-φωσφορική γλυκόζη, η οποία προέρχεται από τη φωσφορυλίωση της γλυκόζης, οξειδώνεται σε 5-φωσφορική ριβόζη.

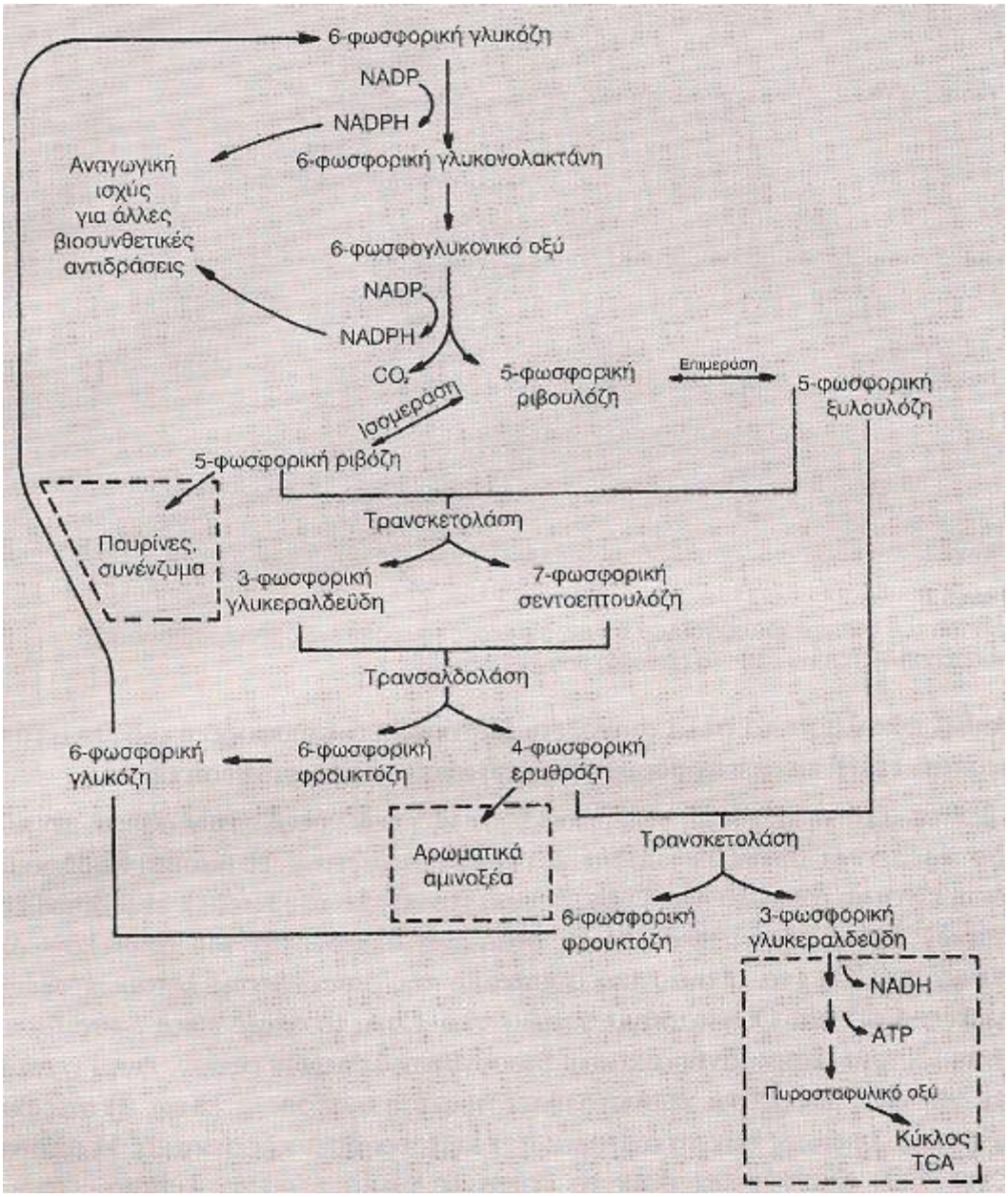
6-Φωσφορική γλυκόζη + 2 $NADP^+$ + H_2O → 5-φωσφορική ριβόζη + 2 NADPH + 2 H^+ + CO_2

Η πορεία των φωσφορικών πεντοζών αρχίζει με την αφυδρογόνωση της 6-φωσφορικής γλυκόζης για το σχηματισμό μιας λακτόνης, η οποία υδρολύεται για να δώσει 6-φωσφογλυκονικό και μετά από οξειδωτική αποκαρβοξυλίωση 5-φωσφορική ριβουλόζη. Το $NADP^+$ είναι ο δέκτης ηλεκτρονίων και στις 2 περιπτώσεις. Το τελευταίο στάδιο είναι η ισομερείωση της 5-φωσφορικής ριβουλόζης (κετόζη) σε 5-φωσφορική ριβόζη (αλδόζη). Παρόλα αυτά πολλά κύτταρα απαιτούν περισσότερο NADPH παρά 5-φωσφορική ριβόζη για τις αναγωγικές βιοσυνθέσεις τους. Στην περίπτωση αυτή πραγματοποιείται ένας διαφορετικός τρόπος πορείας. Υπό τις συνθήκες αυτές η 5-φωσφορική ριβόζη μετατρέπεται σε 3-φωσφορική γλυκεραλδεΰδη και 6-φωσφορική φρουκτόζη από την τρανσκετολάση και την

τρανσαλδολάση. Αυτά τα δύο ένζυμα δημιουργούν έναν αντιστρεπτό σύνδεσμο μεταξύ της πορείας των φωσφορικών πεντοζών και της γλυκόλυσης. Το καθαρό αποτέλεσμα είναι ο σχηματισμός δύο εξοζών και μιας τρίοζης από τρεις πεντόζες. Οι ενδιάμεσες ενώσεις σε αυτές τις αλληλομετατροπές είναι η 5-φωσφορική ξυλουλόζη, η 7-φωσφορική σεδοεπτουλόζη και η 4-φωσφορική ερυθρόζη. Με αυτόν τον τρόπο παράγονται 2 NADPH για κάθε 6-φωσφορική γλυκόζη που οξειδώνονται πλήρως σε CO_2.

Όταν απαιτείται να συντεθεί περισσότερη 5-φωσφορική ριβόζη από NADPH, λειτουργεί μόνον ο μη οξειδωτικός κλάδος της πορείας. Σε αυτήν τη περίπτωση, η 6-φωσφορική φρουκτόζη και η 3-φωσφορική γλυκεραλδεΰδη (σχηματίζονται από τη γλυκολυτική πορεία) μετατρέπονται σε 5-φωσφορική ριβόζη, χωρίς την παραγωγή του NADPH. Εναλλακτικά, η 5-φωσφορική ριβόζη που σχηματίζεται από τον οξειδωτικό κλάδο της πορείας μπορεί να μετατραπεί σε πυροσταφυλικό μέσω της 6-φωσφορικής φρουκτόζης και της 3-φωσφορικής γλυκεραλδεΰδης. Με αυτόν τον τρόπο παράγονται ATP, NADPH και οι πέντε από τους έξι άνθρακες της 6-φωσφορικής γλυκόζης εμφανίζονται στο πυροσταφυλικό. Ο συνδυασμός της γλυκολυτικής πορείας και της πορείας των φωσφορικών πεντοζών επιτρέπει τη συνεχή προσαρμογή των επιπέδων του NADPH, του ATP και δομικών μονάδων όπως της 5-φωσφορικής ριβόζης και του πυροσταφυλικού, ώστε να ανταποκρίνονται στις κυτταρικές ανάγκες.

Τέλος η χρησιμότητα του μονοπατιού αυτού βρίσκεται στη δυνατότητα να οδηγήσει στη παραγωγή αιθανόλης ξεκινώντας από πεντόζες. Αυτό είναι εύκολο να γίνει φτάνοντας αρχικά σε σχηματισμό 3-φωσφορικής γλυκεραλδεΰδης και 6-φωσφορικής φρουκτόζης και στη συνέχεια με τη διαδικασία της γλυκόλυσης που περιγράφηκε παραπάνω φτάνουμε στη παραγωγή αιθανόλης [L. Stryer, 1994].

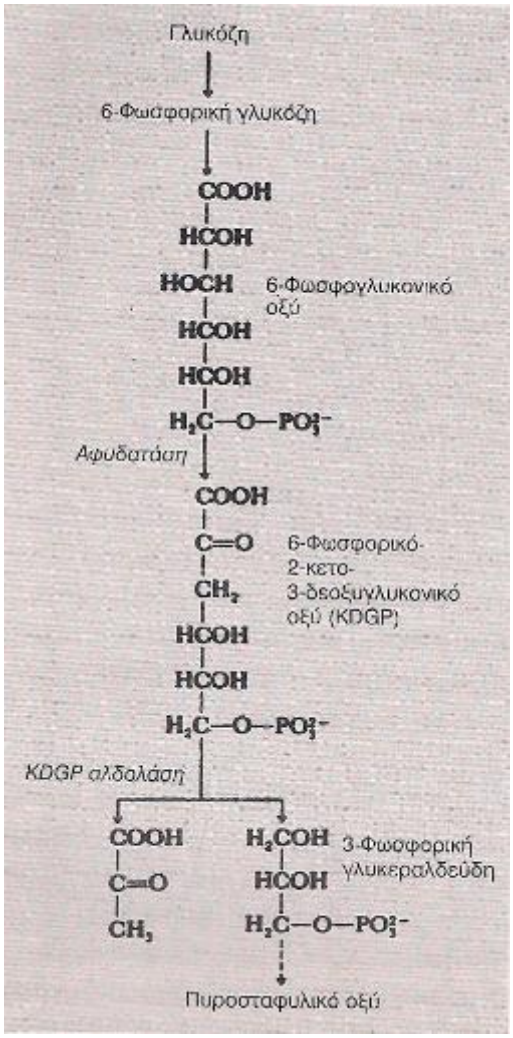


Εικόνα 9. Μονοπάτι της φωσφορικής πεντόζης (μονοφωσφορικής εξόζης) και οι σχέσεις του με άλλες κυτταρικές διεργασίες. Οι ενώσεις και οι αντιδράσεις στα ορθογώνια με διακεκομμένες πλευρές δεν είναι τμήματα του μονοπατιού αλλά αντιπροσωπεύουν συνδέσεις με άλλες μεταβολικές δραστηριότητες. Πηγή: T. D. Brock, D. W. Smith and M.T. Madigan, Biology of Microorganisms 1984, Πανεπιστημιακές Εκδόσεις Ε.Μ.Π. 2005

2.3.3 Μονοπάτι Entner-Doudoroff

Σε πολλά οξειδωτικά βακτήρια, καθώς και βακτήρια που μπορούν να ζυμώσουν σάκχαρα (Zymomonas), ο μεταβολισμός των σακχάρων συμβαίνει κυρίως μέσω του 6-φωσφογλυκονικού (6-PG) και της διάσπασης του σε πυροσταφυλικό και 3-φωσφορική

γλυκεραλδεΰδη που μεταβολίζεται ακολούθως από τα ένζυμα της γλυκόλυσης ώστε να αποδώσει ακόμα ένα μόριο πυροσταφυλικού. Έτσι η γλυκόζη μετατρέπεται διαδοχικά σε 6-φωσφογλυκονικό οξύ, το οποίο με την δράση του ενζύμου αφυδατάση του 6-φωσφογλυκονικού οξέος σε 6-φωσφορο-2-κετο-3-δεοξυγλυκονικό οξύ (2-KDPG). Το τελευταίο με τη δράση του ενζύμου αλδολάση του 2-κετο-3-δεοξυγλυκοζοφωσφορικού οξέος, μετατρέπεται σε πυροσταφυλικό και 3-φωσφορική γλυκεραλδεΰδη. Η ενεργειακή απόδοση αυτού του μονοπατιού είναι ένα μόριο ATP και δύο μόρια NADPH ανά μόριο γλυκόζης. Αυτή η χαμηλή παραγωγή ενέργειας οδηγεί σε περισσότερη γλυκόζη στην παραγωγή αιθανόλης και λιγότερη στην παραγωγή μάζας κυττάρων, απ' ότι στη γλυκόλυση, η οποία αποδίδει 2 μόρια ATP ανά μόριο γλυκόζης [Χριστακόπουλος, Τόπακας, 2011].



Εικόνα10. Μονοπάτι Entner-Doudoroff. Πηγή: T. D. Brock, D. W. Smith and M.T. Madigan, Biology of Microorganisms 198, Πανεπιστημιακές Εκδόσεις ΕΜΠ 2005

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 3 : Επιλογή μικροοργανισμού

3.1 Είδη μικροοργανισμού για την παραγωγή βιοαιθανόλης

Οι ζύμες αποτελούν τους προτιμώμενους μικροοργανισμούς για τη βιομηχανική παραγωγή αιθανόλης. Γενικά διάφορα είδη ζυμών μπορούν να χρησιμοποιηθούν ανάλογα με τη σύνθεση της πρώτης ύλης για την παραγωγή αιθανόλης. Η ζύμη *Saccharomyces cerevisiae* θεωρείται ιδιαίτερα κατάλληλη για τη ζύμωση εξοζών και είναι ο σημαντικότερος μικροοργανισμός. Οι ζύμες *Kluyveromyces fragilis* και *Candida sp.* μπορούν να χρησιμοποιηθούν για να ζυμώσουν λακτόζη και πεντόζες, αντίστοιχα. Άλλοι εναλλακτικοί μικροοργανισμού που μπορούν να παράγουν αιθανόλη, όπως το βακτήριο *Zymomonas mobilis* και ο *Pachysolen sp.*, δεν χρησιμοποιούνται σε βιομηχανική κλίμακα. Εντούτοις, είδη του *Zymomonas* έχουν σημαντικά πλεονεκτήματα σε σχέση με τη ζύμη και μπορούν να χρησιμοποιηθούν στο μέλλον σε βιομηχανική κλίμακα. Άλλοι μικροοργανισμοί που ζυμώνουν πεντόζες και εξόζες, όπως τα βακτήρια *Clodistrum thermosaccharolyticum* και *Thermoanaerobacter ethanolicus*, είναι θερμόφιλα και έχουν σημαντικά πλεονεκτήματα για τη ζύμωση και το διαχωρισμό της αιθανόλης. Η γενετική μηχανική έχει μετασχηματίσει τον E. coli σε έναν πολύ αποδοτικό μικροοργανισμό παραγωγής αιθανόλης σε συγκεντρώσεις μέχρι 43% (v/v) [Olsson and Hahn-Hagerdal, 1996].

Ο μικροοργανισμός που θα χρησιμοποιηθεί στην διεργασία παραγωγής αιθανόλης από λιγνινοκυτταρινούχο βιομάζα πρέπει να έχει όσο το δυνατόν περισσότερα από τα χαρακτηριστικά που αναφέρονται στο παρακάτω πίνακα και που απεικονίζουν τα χαρακτηριστικά του ιδανικού μικροοργανισμού που μπορεί να χρησιμοποιηθεί για αυτή την διεργασία.

Πίνακας 3. Επιθυμητά χαρακτηριστικά ενός μικροοργανισμού που θα χρησιμοποιηθεί για την αποτελεσματική βιομετατροπή των λιγνινοκυτταρινούχων υλικών σε αιθανόλη. Πηγή : Χριστακόπουλος, Τόπακας, 2011.

Βασικά χαρακτηριστικά	**Επιθυμητά χαρακτηριστικά**
Δυνατότητα χρήσης μεγάλου εύρους υποστρωμάτων (πεντόζες-εξόζες)	Ταυτόχρονο μεταβολισμό διαφορετικών σακχάρων
Υψηλή απόδοση αιθανόλης και αυξημένη ογκομετρική παραγωγικότητα	Δυνατότητα υδρόλυσης κυτταρίνης και ημικυτταρίνης
Ελάχιστη παραγωγή παραπροϊόντων	GRAS status
Υψηλή αντοχή σε αιθανόλη και παρεμποδιστές	Ελάχιστη απαίτηση για προσθήκη θρεπτικών ουσιών
Αυξημένη αντοχή σε επίπονες διεργασίες	Αντοχή σε χαμηλές τιμές pH και υψηλές θερμοκρασίες

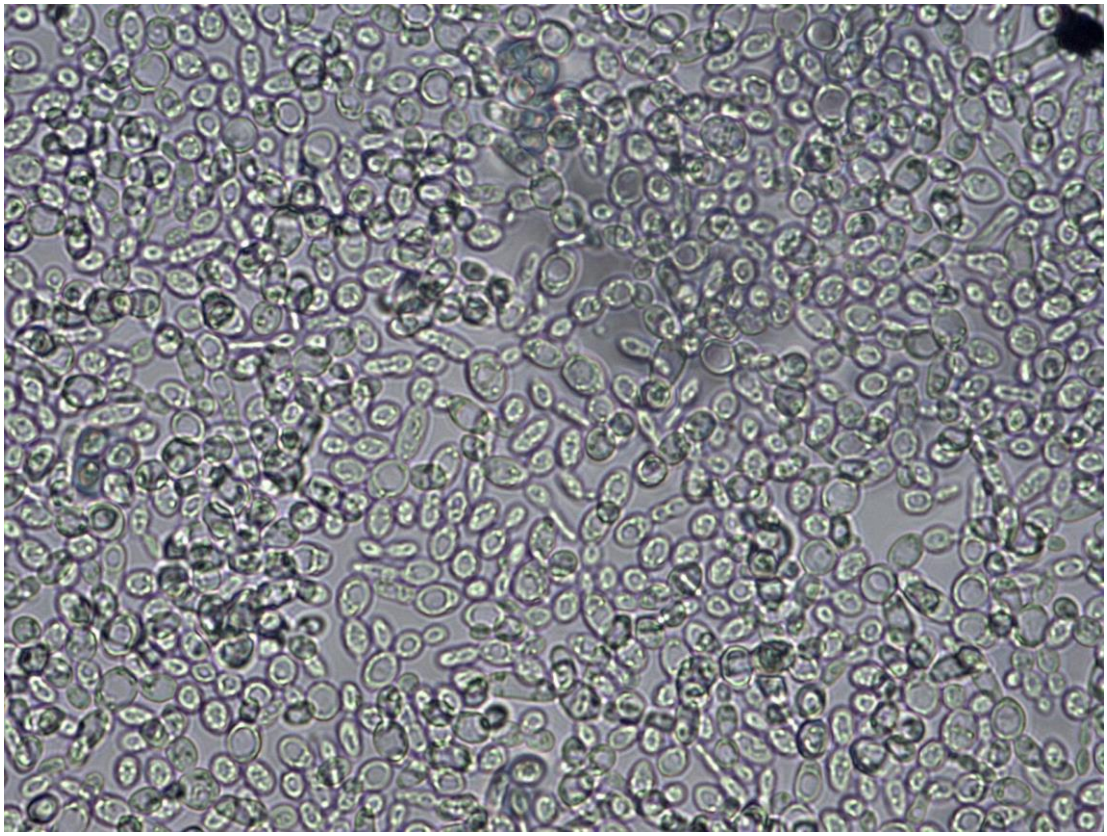
Saccharomyces cerevisiae

Το μεγαλύτερο ποσοστό αιθανόλης που παράγεται σήμερα παγκοσμίως προέρχεται από διεργασίες ζύμωσης σακχάρων από τη ζύμη *S. cerevisiae*. Ο μικροοργανισμός αυτός ζυμώνει όλες τις εξόζες και παράγει αιθανόλη με απόδοση κοντά στη μέγιστη θεωρητική που είναι 0,51g αιθανόλης ανά g γλυκόζης. Εντούτοις, ο μικροοργανισμός αυτός δεν έχει τη δυνατότητα να ζυμώνει τη ξυλόζη όταν αυτή χρησιμοποιείται ως μοναδική πηγή άνθρακα, παρόλο που διαθέτει ένα πλήρες μεταβολικό μονοπάτι για το μεταβολισμό της ξυλόζης [Batt et al., 1986].

Συγκεκριμένα, η ζύμωση της γλυκόζης από τον μικροοργανισμό αυτό αποτελεί μια αναερόβια διεργασία με σχηματισμό ελαχίστων ποσοτήτων γλυκερόλης.

Ο μικροοργανισμός *S. cerevisiae* εμφανίζει αρκετά από τα χαρακτηριστικά του Πίνακα 7.1, όπως μεγάλες αποδόσεις αιθανόλης και υψηλή παραγωγικότητα, υψηλή αντοχή σε αιθανόλη, όπως μεγάλες αποδόσεις αιθανόλης και υψήλη παραγωγικότητα, υψηλή αντοχή σε αιθανόλη, αντοχή σε έντονες συνθήκες διεργασιών, GRAS (Generally Recognised As Safe) status και αντοχή σε χαμηλές τιμές pH. Σε αναερόβιες συνθήκες μετατρέπει 1 mol γλυκόζη σε 2 mol αιθανόλης, το οποίο έχει σαν αποτέλεσμα την παραγωγή 2 mol ATP και CO2, μέσω του γλυκολυτικού μονοπατιού.

Με χρήση των εργαλείων της μεταβολικής μηχανικής έγιναν προσπάθειες δημιουργίας στελεχών της ζύμης *S. cerevisiae* ικανών να μετατρέπουν σε αιθανόλη πέραν των εξοζών και τις πεντόζες. Ως μεταβολική μηχανική έχει οριστεί η βελτίωση της παραγωγής ενός προϊόντος ή των ιδιοτήτων ενός κυττάρου μέσω της τροποποίησης μιας συγκεκριμένης βιοχημικής αντίδρασης ή την εισαγωγή νέας, με τεχνολογία ανασυνδυασμένου DNA. Χρησιμοποιώντας τεχνικές μεταβολικής μηχανικής επιχειρήθηκε η εισαγωγή στο φυσικό γονιδίωμα του *S. cerevisiae* των γονιδίων που είναι υπεύθυνα για τον μεταβολισμό της ξυλόζης από ευκαρυωτικούς ή προκαρυωτικούς μικροοργανισμούς, τα οποία είναι ικανά να βιομετατρέπουν τη γλυκόζη σε ξυλόζη [Χριστακόπουλος και Τόπακας, 2011].



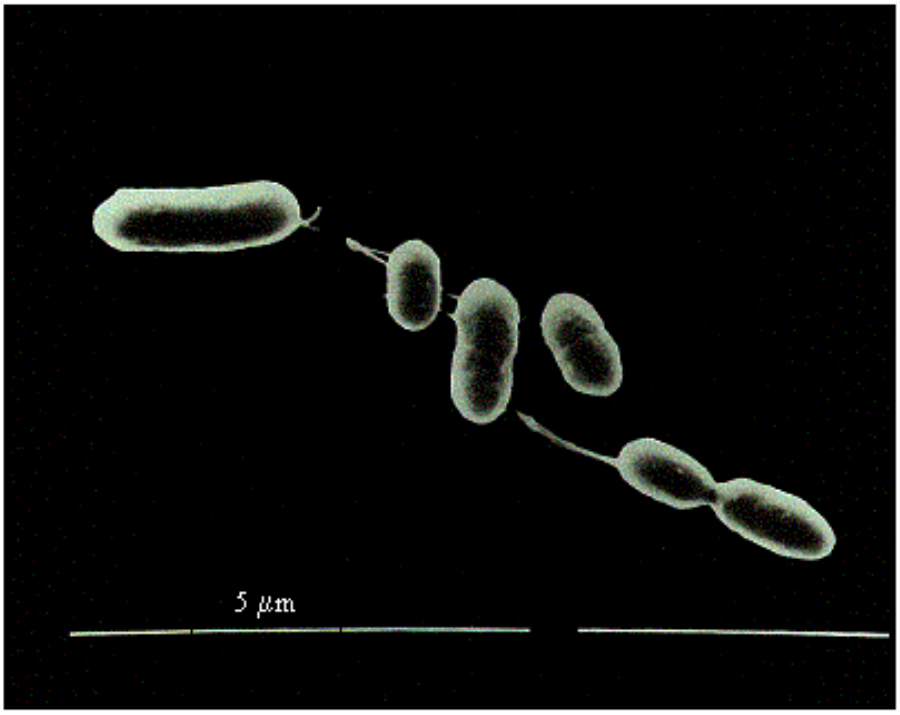
Εικόνα11. Η ζύμη *S. cerevisiae*

<u>*Zymomonas mobilis*</u>

Ο δεύτερος σημαντικότερος αιθανολοπαραγωγός μικροοργανισμός, είναι το βακτήριο *Z. mobilis*, ο οποίος χρησιμοποιείται στη βιομηχανία οινοπνευματωδών και έχει την ικανότητα να πραγματοποιεί ζυμώσεις σε pH 5 και θερμοκρασίες 30 και 40°C. Μεταβολίζει τη γλυκόζη μέσω του μονοπατιού Entner-Doudoroff το οποίο ανά 1 mol γλυκόζης αποδίδει 2 mol

πυροσταφυλικού, παράγοντας 1mol ATP. Για να μπορέσει να επιβιώσει με τόσο μικρή ενεργειακή απόδοση, ο μεταβολισμός του μικροοργανισμού επιταχύνεται τρομερά. Για αυτό το λόγο, ο *Z. mobilis* κατέχει υψηλότατα επίπεδα ενεργότητας γλυκολυτικών και αιθανολοπαραγωγών ενζύμων, με αποτέλεσμα εξαιρετικές αποδόσεις αιθανόλης που προσεγγίζουν την τιμή της θεωρητικής απόδοσης (0.47 g αιθανόλης ανά g γλυκόζης) και υψηλή ογκομετρική παραγωγικότητα (μεγαλύτερη από 3 g $L^{-1}hr^{-1}$).

Ο μικροοργανισμός αυτός δεν έχει την ικανότητα να ζυμώνει τις πεντόζες όπως και ο S. cerevisiae και έχουν εφαρμοστεί στρατηγικές εισαγωγής γονιδίων που ευθύνονται για την αποτελεσματική ζύμωση της ξυλόζης [Χριστακόπουλος και Τόπακας, 2011].

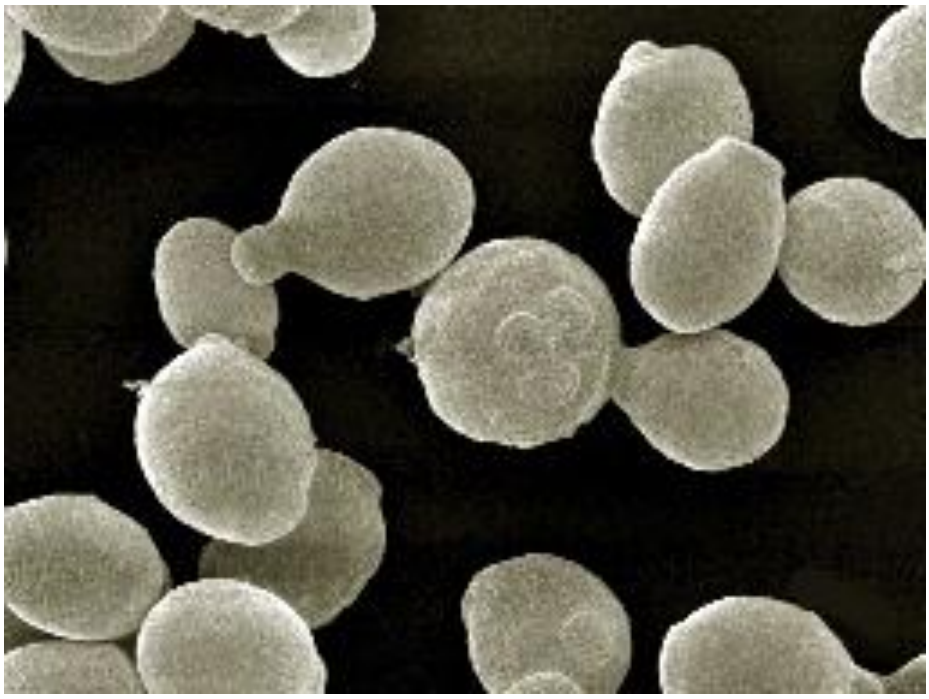


Εικόνα 12. Το βακτήριο *Zymomonas mobilis*

<u>*Pichia stipitis*</u>

Η ζύμη *P. stipitis* έχει την ικανότητα να μεταβολίζει φυσικά εκτός από την γλυκόζη, και την ξυλόζη. Το μειονέκτημα που παρουσιάζει ο συγκεκριμένος μικροοργανισμός κατά τη χρήση του για τη παραγωγή αιθανόλης είναι η παρεμπόδιση από ουσίες που σχηματίζονται λόγω προκατεργασίας και υδρόλυσης των λιγνινοκυτταρινούχων πρώτων υλών. Επιπρόσθετα, κατά

το συμμεταβολισμό γλυκόζης και ξυλόζης απαιτούνται μικροαερόβιες συνθήκες γεγονός που δημιουργεί δυσκολία στον έλεγχο του αερισμού σε βιομηχανική κλίμακα. Η ζύμη αναπτύσσεται ταχύτατα υπό αερόβιες συνθήκες χωρίς την παραγωγή αιθανόλης, ενώ υπό αναερόβιες συνθήκες σταματά να αναπτύσσεται μέσα σε μια γενιά. Παρά την ικανότητα του μικροοργανισμού να ζυμώνει την ξυλόζη επιτυγχάνοντας υψηλές αποδόσεις αιθανόλης με παραγωγή μικρών ποσοτήτων ξυλιτόλης, έχει αποτελέσει αντικείμενο μελέτης και εφαρμογής της μεταβολικής μηχανικής ώστε να επιτευχθεί η αναερόβια παραγωγή αιθανόλης σε βιομηχανικές διεργασίες που οι συνθήκες ελέγχου του αερισμού είναι δύσκολες [Κούρτογλου, 2009].



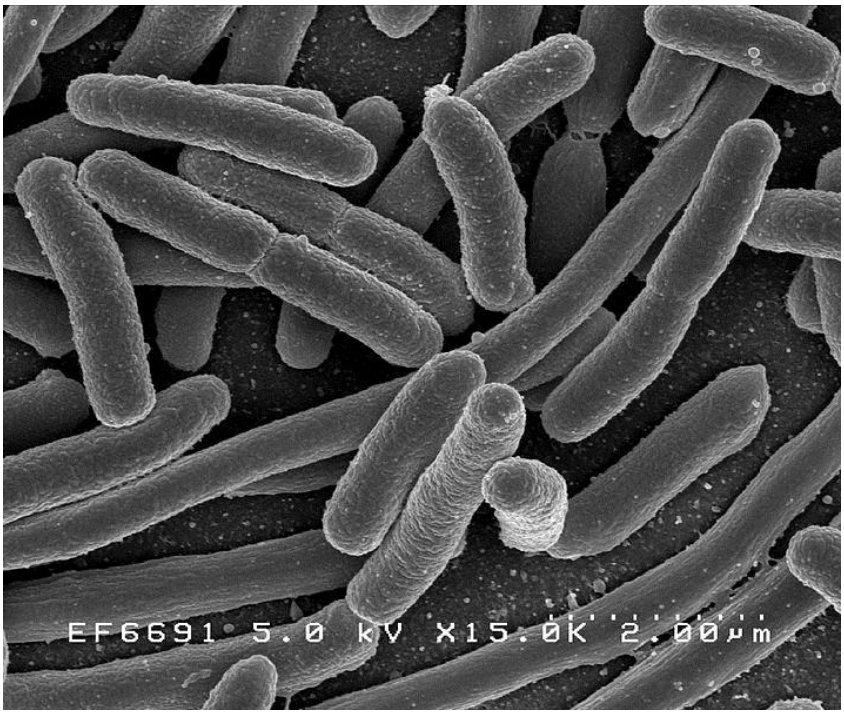
Εικόνα 13. Η μορφολογία του *Pichia stipitis*

<u>*Escerichia coli*</u>

Το βακτήριο *E. coli* αποτελεί έναν ελκυστικό μικροοργανισμό, καθώς μπορεί να μεταβολίσει ένα ευρύ φάσμα υποστρωμάτων όπως: γλυκόζη, μαννόζη, γαλακτόζη, φρουκτόζη (εξόζες) αλλά και ξυλόζη και αραβινόζη (πεντόζες), στον κεντρικό μεταβολίτη, το πυροσταφυλικό οξύ. Το πυροσταφυλικό οξύ στη συνέχεια μετατρέπεται σε ένα ισομοριακό μίγμα αιθανόλης, οξικού οξέος, γαλακτικού οξέος και μυρμηγκικού οξέος. Κατά κανόνα οι ζυμώσεις γίνονται σε pH 7 και θερμοκρασίες 30 και 35°C και μπορεί να δεχτεί υψηλές γλυκολυτικές ροές τόσο υπό αερόβιες όσο και υπό αναερόβιες συνθήκες. Επίσης παρουσιάζει αυξημένη αντοχή στην αιθανόλη (περίπου 50 g/L). Ωστόσο η παρουσία οργανικών οξέων, όπως είναι το οξικό και το

γαλακτικό οξύ, στο τελικό ζυμωτικό υλικό ταυτόχρονα με την αιθανόλη, κάνει την χρησιμοποίηση του *E. coli* μια μη ελκυστική επιλογή για την παραγωγή αιθανόλης. Ακόμη οι αποδόσεις παραγωγής αιθανόλης είναι χαμηλότερες από 0.2 g ανά g σακχάρων (γλυκόζης ή ξυλόζης) [Κούρτογλου, 2009].

Η κύρια στρατηγική για την αύξηση της παραγωγής αιθανόλης από τον *E. coli*, με στόχο να καταστεί κατάλληλος για διεργασίες χρησιμοποίησης λιγνινοκυτταρινούχων υλικών σαν πρώτες ύλες για την παραγωγή αιθανόλης, ήταν να στραφούν οι ροές άνθρακα προς την παραγωγή αιθανόλης, σε βάρος εκείνων των ροών που οδηγούσαν στην παραγωγή παραπροϊόντων, όπως το οξικό και το γαλακτικό [Χριστακόπουλος, Τόπακας, 2011].



Εικόνα 14. Σάρωση ηλεκτρονίων μικρογραφίας ηλεκτρονίων κυττάρων *Escherichia coli*, που αναπτύχθηκαν σε καλλιέργεια και προσχώρησαν σε καλυπτρίδα.

3.2 Ζύμωση πεντοζών

Το κλάσμα των πεντοζών στις ημικυτταρίνες αποτελείται κυρίως από ξυλόζη αλλά ανάλογα με την αρχική πρώτη ύλη το κλάσμα αραβινόζης μπορεί να είναι ουσιώδες. Μερικοί αποτελεσματικοί μικροοργανισμοί που ζυμώνουν τη ξυλόζη έχουν βρεθεί ανάμεσα σε βακτήρια, ζύμες και μύκητες. Τα τελευταία χρόνια οι έρευνες έχουν επικεντρωθεί περισσότερο στους μικροοργανισμούς που ζυμώνουν τη ξυλόζη και κατά συνέπεια στη

κατανόηση του μεταβολισμού της ξυλόζης. Ορισμένες τυπικές αποδόσεις αιθανόλης καθώς και συνολικές ογκομετρικές παραγωγικότητες αιθανόλης σε ζυμώσεις διαλείποντος έργου με χρήση των μικροοργανισμών αυτών και ξυλόζης ως υπόστρωμα φαίνονται παρακάτω στον πίνακα 2. Οι αποδόσεις βασίζονται στην αρχική συγκέντρωση ξυλόζης. Ο θεωρητικός βαθμός απόδοσης της παραγωγής αιθανόλης από γλυκόζη είναι 0.51 g ethanol g^{-1}glucose (2mol mol^{-1}) ενώ από ξυλόζη 0.51 g ethanol g^{-1}xylose (1.67 mol mol^{-1}) [L. Olsson and B. Hahn-Hagerdal].

Παρακάτω παρατίθενται οι αποδόσεις ορισμένων μικροοργανισμών που ζυμώνουν τη ξυλόζη:

Strain	Xylose ($g\ l^{-1}$)	Ethanol ($g\ l^{-1}$)	Yield ($g\ g^{-1}$)	Productivity ($g\ l^{-1}\ h^{-1}$)	References
Bacteria: naturally occurring					
Bacillus macerans DMS 1574	20	3.3	0.16	0.03	29
Bacteroides polypragmatus NRCC 2288	44	6.5	0.15	0.09	30
Clostridium saccharolyticum ATCC 35040	25	5.2	0.21	0.05	31
C. thermohydrosulfuricum 39E	5	2.0	0.39		32
Erwinia chrysanthemi B374	5		0.23[a]		33
Thermoanaerobacter ethanolicus ATCC 31938	4	1.5	0.36		34
Bacteria: recombinant[b]					
Erwinia chrysanthemi B374 (*pdc*)	5		0.44[a]		33
Escherichia coli B, pLOI297 (*pdc, adhB*)	80	39.2	0.49	0.70[c]	35
E. coli B KO11 (*pdc, adhB, frd*$^-$)	80	41.6	0.52	0.87	36
Klebsiella oxytoca M5A1 (*pdc, adhB*)	100	46.0	0.46	0.96	37
K. planticola SDF20 (*pdc, pfl*$^-$)	17	7.7	0.44	0.18	38
Zymomonas mobilis CP4 (pZB5)	25	11	0.44	0.57	65
Yeasts: naturally occurring					
Candida blankii ATCC 18735	50	5.1	0.10	0.07	39
C. famata	20	3.9	0.20	0.07	40
C. fructus JCM-1513	20	4.7	0.24	0.02	41
C. guilliermondii ATCC 22017	40	4.5	0.11	0.04	42
C. shehatae CBS 4705	50	24.0	0.48	0.19	43
C. shehatae CSIR-Y492	90	26.2	0.29	0.66	44
C. sp. CSIR-62 A/2	50	20.1	0.40	0.42	45
C. tenius CBS 4435 (11)[d]	20	6.4	0.32	0.03	46
C. tropicalis KY 5014 (2)	20	2.8	0.14	0.06	47
Clavispora sp. UWO(PS) 83-877-1 (11)	20	5.9	0.30	0.11	48
Kluyveromyces cellobiovorus KV 5199 (3)	20	4.4	0.22	0.09	47
K. marxianus	20	5.6	0.28	0.10	49
Pachysolen tannophilus NRRL Y-2460	20	6.2	0.31	0.06	50
P. tannophilus RL 171	50	13.8	0.28	0.28	51
Pichia segobiensis CBS 6857	20	5.0	0.25	0.02	46
P. stipitis CBS 5773 (5)	20	5.9	0.30	0.02	46
P. stipitis CBS 5776	50	22.3	0.45	0.34	52
Schizosaccharomyces pombe ATCC 2478 (8)	50	5.0	0.10	0.07	39
Yeasts: recombinant[e]					
Saccharomyces cerevisiae (*XYL 1, XYL 2*)	21.7	1.6	0.07	0.07	53
S. cerevisiae TJ1 (*XYL 1, XYL 2*)	50	2.7	0.05	0.02	54
S. cerevisiae H550 (*XYL 1, XYL 2*)	49.2	0.3	0.01	0.01	55
Schizosaccharomyces pombe (*xyl A*)	50	21.0	0.42	0.19	56
Fungi					
Aeurobasidium pullulans (2)	20	4.2	0.21	0.09	40
Fusarium avenaceum VTT-D-80146 (5)	50	12.0	0.24	0.07	57
F. clamydosporum VTT-D-77055	50	11.0	0.22	0.07	57
F. culmorum VTT-D-80148 (3)	50	12.0	0.24	0.07	57
F. graminearum VTT-D-79129 (4)	50	11.0	0.22	0.07	57
F. lycopersici ATCC 16417	50	16.0	0.32	0.17	58
F. oxysporum VTT-D-80134 (3)	50	25.0	0.50	0.17	57
F. sambucium VTT-D-77056	50	13.0	0.26	0.08	57
F. solani VTT-D-77057 (2)	50	11.0	0.22	0.07	57
F. tricinetum VTT-D-80139 (2)	50	7.0	0.14	0.04	57
Monilia sp.	50	12.6	0.25	0.08	59
Mucor 105 (2)	50	8.0	0.16	0.08	58
Neurospora crassa NCIM 870	20	6.9	0.35	0.04	60
Paecilomyces sp. NFI ATCC 20766	100	39.8	0.40	0.24	61

Εικόνα 15.

Πηγή: L. Olsson and B. Hahn-Hagerdal

3.3 Ο μύκητας *Fusarium oxysporum*

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

Ο *F. oxysporum* Schlechtend είναι ένα αναμορφικό είδος που περιγράφεται από συγκεκριμένα μορφολογικά κριτήρια [Nelson et al., 1983], τα κυριότερα των οποίων είναι το σχήμα των μακροκωνιδίων (με διαστάσεις 23-54 x 3-4.5 μm), η δομή των μικροκωνιδίων (5-12 x 2.3-3.5 μm) και ο σχηματισμός και η διάταξη των χλαμυδοσπορίων (5-13 μm). Αν και τα κριτήρια αυτά είναι μοναδικά, έχει παρατηρηθεί σημαντική μορφολογική και φυσιολογική διαφοροποίηση μέσα στο είδος, με αποτέλεσμα να μην έχουν οριοθετηθεί πλήρως τα όρια του.

Η ταξινόμηση των μυκητών που ανήκουν στο γένος Fusarium είναι η εξής:

Υπερβασίλειο: Eukaryota

Βασίλειο: Μύκητες (Fungi)

Φύλο: Ascomycota

Υπόφυλο: Pezizomycotina

Κλάση: Sordariomycetes

Υπόκλαση: Hypocreomycetidae

Τάξη: Hypocreales

Οικογένεια: Nectriaceae

Γένος: *Fusarium*

Είδος: *F. oxysporum*

Εικόνα 16.Ο μύκητας *Fusarium oxysporum*

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

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

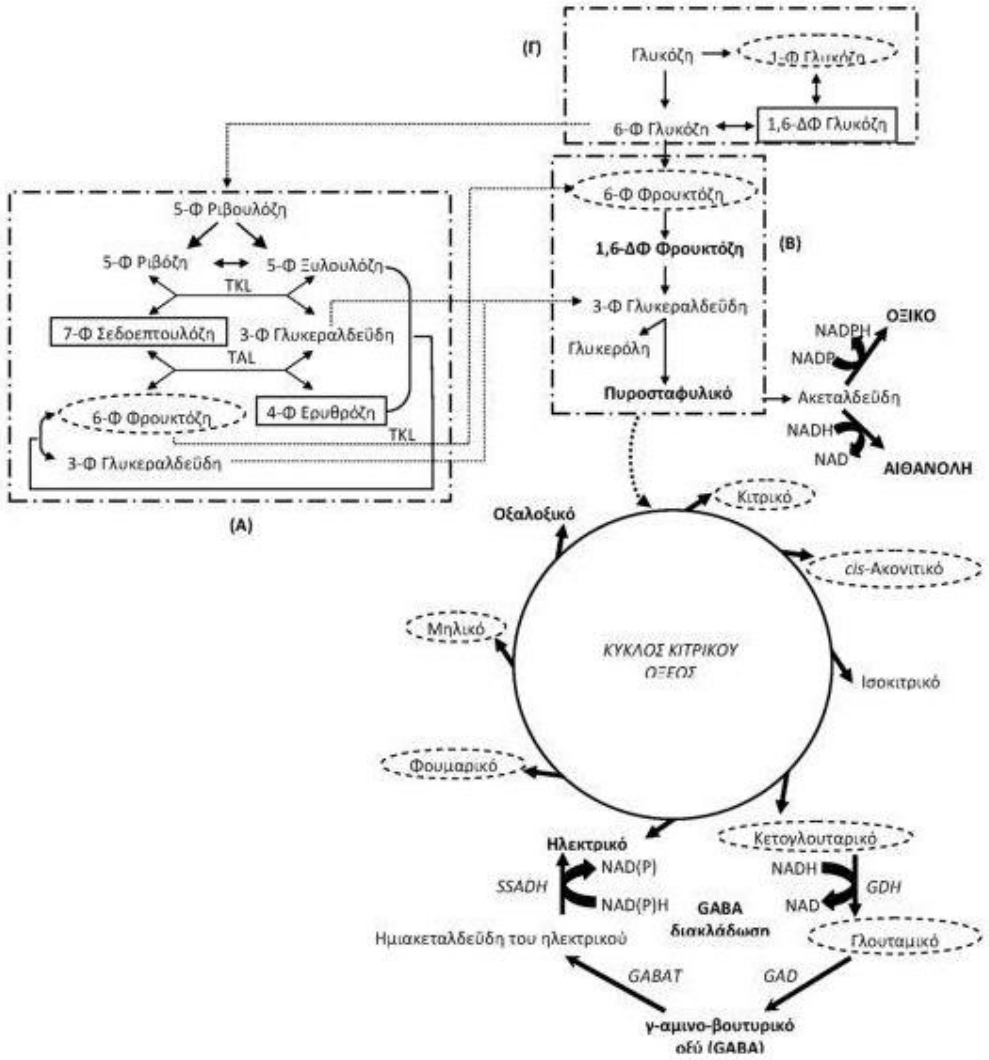
μυκήλια τοποθετούνται σε ημιαναερόβιες συνθήκες για την παραγωγή αιθανόλης [Singh and Kumar 1991, Christakopoulos et al.1989].

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

3.4 Το στέλεχος FF11

Το στέλεχος *Fusarium oxysporum* FF11 όπως και το στέλεχος F3 παράγει ένα ευρύ φάσμα κυτταρινασών και ημικυτταρινασών σε βυθισμένη ζύμωση χρησιμοποιώντας διάφορα λιγνινοκυτταρινούχα υλικά για πηγή άνθρακα. Κατά αυτό το τρόπο μπορεί να πραγματοποιηθεί ενζυμική υδρόλυση της λιγνινοκυτταρινούχου πρώτης ύλης αφού ο μικροοργανισμός παράγει όλα τα απαραίτητα ένζυμα. Επιπλέον το στέλεχος μπορεί να ζυμώνει αποτελεσματικά τόσο τη γλυκόζη όσο και τη ξυλόζη καθώς και δεν απαιτεί τη πραγματοποίηση ξεχωριστής ενζυμικής υδρόλυσης του λιγνινοκυτταρινούχου υλικού [Ανασοντζής, 2010]. Αξίζει να σημειωθεί ακόμη ότι το στέλεχος έχει τη δυνατότητα να μετατρέπει απευθείας τη κυτταρίνη και τη ξυλάνη σε αιθανόλη ενώ έχει πολύ χαμηλές απαιτήσεις σε θρεπτικά συστατικά,

Συνεπώς ο μύκυτας *F. oxysporum* FF11 πληροί πολλά χαρακτηριστικά που πρέπει να έχει ένας μικροοργανισμός προκειμένου να χρησιμοποιηθεί αποτελεσματικά για τη ζύμωση λιγνινοκυτταρινούχων υλικών.



Εικόνα 15. Κεντρικός μεταβολισμός του άνθρακα του μύκητα του *Fusarium oxysporum* [Panagiotou et al., 2005a]

Για τη παρασκευή του στελέχους FF11 χρησιμοποιήθηκε το φυσικό στέλεχος του Aspergillus nidulans από το οποίο απομονώθηκε το γονίδιο της φωσφογλυκομουτάσης και της τρανσαλδολάσης. Για τη δημιουργία του στελέχους FF11 του *F. oxysporum* υπερεκφράστηκαν τα γονίδια της φωσφογλυκομουτάσης και της τρανσαλδολάσης του φυσικού στελέχους F3 κάτω από τη ρύθμιση του ισχυρού υποκινητή συνεχούς έκφρασης του A. Nidulans [Ανασοντζής, 2010].

Τρανσαλδολάση

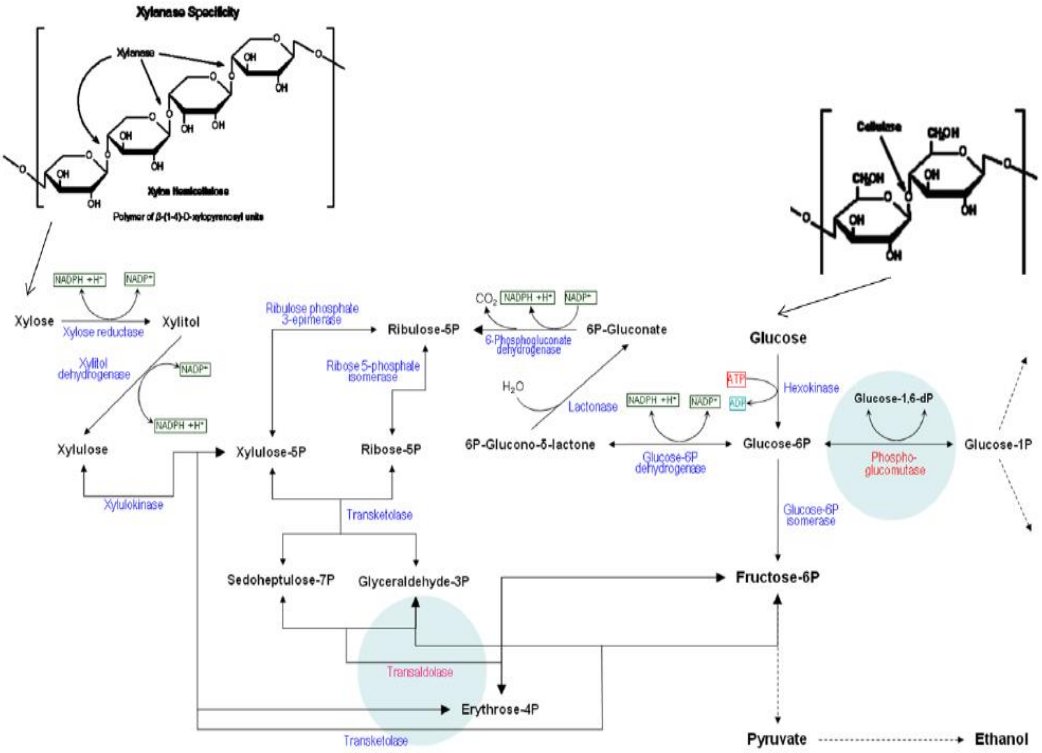
Η τρανσαλδολάση είναι ένζυμο του μη οξειδωτικού κλάδου του μονοπατιού των φωσφορικών πεντοζών (PPP). Το συγκεκριμένο ένζυμο δεν απαιτεί συμπαράγοντες για τη δράση του και επιτελεί μια αντίδραση σχάσης αλδόλης καταλυόμενη από βάση [Κούρτογλου,

2009]. Κατά την αντίδραση αυτή δημιουργείται ένα ενδιάμεσο τύπου βάσης Schiff, όπως παρατηρείται και στις αλδολάσες τύπου Ι. Δρα, όταν το αμινοξύλυσίνη στο ενεργό κέντρο του σχηματίζει δεσμό με την κετο-ομάδα της 7-Ρ-σεδοεπτουλόζης με αποτέλεσμα να διασπάται ο δεσμός που συγκρατεί τα μόρια άνθρακα των θέσεων 3 και 4. Τα προϊόντα της αντίδρασης είναι μια διυδροξυακετόνη, η οποία συνδέεται με την 6-Ρ-γλυκεραλδεΰδη και δίνει τη 6-Ρ-φρουκτόζη, και το σάκχαρο 6-Ρ-ερυθρόζη [Walfridsson et al., 1995]. Η θέση του ενζύμου στο μεταβολισμό φαίνεται στην Εικόνα 16.

Το ένζυμο τρανσαλδολάση απαντάται σε πλήθος ευκαρυωτικών και προκαρυωτικών μικροοργανισμών.

Το προφίλ των φωσφορυλιωμένων ενδιαμέσων κατά τη διάρκεια της ζύμωσης γλυκόζης και του μίγματος γλυκόζης-ξυλόζης του μύκητα *F. Oxysporum* F3, έδειξε συσσώρευση του εσωκυτταρικού μεταβολίτη 7-φωσφορική σεδοεπτουλόζη (S7P) [Panagiotou et al., 2005a; 2005c]. Το γεγονός αυτό υποδεικνύει αναστολή της λειτουργίας του μονοπατιού των φωσφορικών πεντοζών (PPP).

Η υπερέκφραση του γονιδίου της τρανσαλδολάσης ίσως οδηγεί σε ενίσχυση της μεταβολικής ροής στο μονοπάτι των φωσφορικών πεντοζών και αύξηση της παραγωγικότητας του μύκητα κατά τη ζύμωση της ξυλόζης που προκύπτει από την αξιοποίηση ημικυτταρινούχων προϊόντων [Ανασοντζής, 2010].



Εικόνα 16. Σχηματική απεικόνιση του τμήματος του μεταβολισμού του *F. oxysporum* που οδηγεί στη σύνθεση της αιθανόλης: η διάσπαση της ξυλάνης από τις ξυλανάσες και το μονοπάτι των φωσφορικών πεντοζών, καθώς και η διάσπαση της κυτταρίνης από τις κυτταρινάσες και η γλυκόλυση. Η φωσφογλυκομουτάση μετατρέπει την 6-P-Γλυκόζη σε 1-P-γλυκόζη και αντίστροφα, συνδυάζοντας τη γλυκόλυση με τη UDP-Γλυκόζη και το γλυκογόνο.

Πηγή: Γεώργιος Ε. Ανασοντζής, Διδακτορική διατριβή, 2010.

<u>Φωσφογλυκομουτάση</u>

Η φωσφογλυκομουτάση (PGM) είναι το ένζυμο που καταλύει τη μεταφορά της φωσφορυλ-ομάδας από τη θέση 1’ της γλυκόζης στη θέση 6’ (μετατροπή της 1-P-γλυκόζης σε 6-P-γλυκόζη) και το αντίστροφο. Η αντίδραση πραγματοποιείται με τη συμμετοχή ενός ενδιάμεσου μεταβολίτη (1,6-P-γλυκόζη) σύμφωνα με το παρακάτω σχήμα:

1-P-γλυκόζη + 1,6-P-γλυκόζη →1,6-P-γλυκόζη + 6-P-γλυκόζη

Η λειτουργία της είναι σημαντική στη διάσπαση και το σχηματισμό του γλυκογόνου καθώς, στην πρώτη περίπτωση, η 1-P-γλυκόζη που προκύπτει από τη διάσπαση του δε μπορεί να

εισέλθει στο μονοπάτι Embden-Meyerhof της γλυκόλυσης αν δε μετατραπεί πρώτα σε 6-P-γλυκόζη. Για το σχηματισμό του γλυκογόνου αντίστοιχα, η 6-P-γλυκόζη μετατρέπεται από τη φωσφογλυκομουτάση σε 1-P-γλυκόζη, η οποία μπορεί στη συνέχεια να μετατραπεί σε UDP-γλυκόζη και ακολούθως σε γλυκογόνο και ενδεχομένως σε συστατικά του κυτταρικού τοιχώματος [Dunn-Coleman and Pateman, 1979].

Η φωσφογλυκομουτάση αποτελεί ένα από τα σημαντικά ένζυμα καθώς εκτιμάται ότι η υπερέκφραση αυτού του ενζύμου στον μικροοργανισμό *F. oxysporum* μπορεί να αυξήσει το ρυθμό πρόσληψη της γλυκόζης από το μύκητα, τον ειδικό ρυθμό αύξησης και ενδεχομένως σε αναερόβιες συνθήκες την παραγωγή αιθανόλης [Κούρτογλου, 2009].

Πίνακας 4. Συγκριτικά επίπεδα μεταγραφής των γονιδίων pgm (φωσφογλυκομουτάση) και tal (τρανσαλδολάση) στα μετασχηματισμένα στελέχη, σε σχέση με το φυσικό στέλεχος F3.

	pgm	**tal**
F3 (wt)	1,00	1,00
FF1	2,46	5,02
FF2	4,01	1,32
FF3	8,92	1,36
FF4	7,43	2,19
FF5	2,65	5,89
FF6	11,64	3,59
FF7	11,95	1,48
FF8	5,46	1,63
FF10	4,77	5,73
FF11	**10,16**	**6,03**
FF12	11,65	1,25

Πίνακας 5. Ειδική ενζυμική ενεργότητα φωσφογλυκομουτάσης και τρανσαλδολάσης για τα μετασχηματισμένα στελέχη, σε σύγκριση με το φυσικό στέλεχος F3, από υγρές καλλιέργειες με πηγή άνθρακα γλυκόζη.

	pgm		**tal**	
	U/g DCW	**U/g protein**	**U/g DCW**	**U/g protein**
F3 (wt)	19,2	889,7	4,4	191,1
FF1	44,5	1781,2	17,5	1077,8
FF2	38,7	1215,1	3,6	205,9
FF3	11,6	1178,4	0,5	23,2
FF4	27,5	1284,7	1,9	45,7
FF5	15,3	721,8	43,8	1799,2
FF6	102,3	4287,1	36,6	1704,6
FF7	69,8	3125,5	15,7	623,9
FF8	70,7	3185,2	10,8	571,8
FF10	26,4	988,3	50,7	2198,9
FF11	**71,6**	**3910**	**49,1**	**1890,8**
FF12	57,2	2573,4	3,8	164,5

ΙΙ. ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ

1. Υλικά και μέθοδοι

1.1 Χημικά και διαλύματα

Όλα τα χημικά και διαλύματα που χρησιμοποιήθηκαν για τη παρούσα διπλωματική εργασία προμηθευτήκανε από την εταιρεία Sigma-Aldrich(USA).

1.2 Μικροοργανισμός

Ο μικροοργανισμός που χρησιμοποιήθηκε είναι το τροποποιημένο στέλεχος *Fusarium oxysporum* FF11 το οποίο παράχθηκε με γενετική τροποποίηση του Fusarium oxysporum F3 ώστε να υπερεκφραστούν τα γονίδια σε φωσφογλυκομουτάση και τρανσαλδολάση [Ανασοντζής, 2010]. Ο μικροοργανισμός Fusarium oxysporum F3 έχει από κύμινο (Christakopoulos et al., 1989).

Ο μύκητας *Fusarium oxysporum* FF11αναπτύχθηκε σε potato-dextrose-agar PDA σε θερμοκρασία 30°C για 5 μέρες. Μετ' έπειτα αποθηκεύτηκε στους 5 ^{o}C.

1.3 Προκαλλιέργεια

Για την προκαλλιέργεια του μύκητα χρησιμοποιήθηκαν 2 κωνικές φιάλες των 250ml οι οποίες περιείχαν τα άλατα και τις ενώσεις που θα αναφερθούν παρακάτω στη πειραματική διαδικασία καθώς και ξυλόζη αραιωμένα σε 100ml απιονισμένου νερού. Οι φιάλες αποστειρώθηκαν στους 120 ^{o}C για 20 λεπτά και το διάλυμα ρυθμίστηκε σε pH 6.3.

Ακόμη για την προκαλλιέργεια χρησιμοποιήθηκαν 10ml απιονισμένου νερού τα οποία προστέθηκαν στο σωλήνα με τον αποθηκευμένο μικροοργανισμό και μοιράστηκαν ισόποσα στις 2 κωνικές φιάλες, οι οποίες καλύφθηκαν με βαμβάκι.

Τέλος ο επωασμός της προκαλλιέργειας πραγματοποιήθηκε σε αναδευόμενο θάλαμο επώασης ρυθμισμένο στους 30 ^{o}C και 200 rpm για 2 ημέρες (ZHWY-211C, ZHICHENG®).

1.4 Αερόβια ανάπτυξη

Για την αερόβια ανάπτυξη χρησιμοποιήθηκαν κωνικές φιάλες 250ml οι οποίες είχαν αποστειρωθεί στους 120 ^{o}C για 20 λεπτά. Οι φιάλες περιείχαν τα άλατα και τις ενώσεις που θα αναφερθούν παρακάτω καθώς και ξυλόζη αραιωμένα σε100ml απιονισμένου νερού. Το διάλυμα ρυθμίστηκε σε pH 6.3.

Σε κάθε μια προκαλλιέργεια μεταφέρθηκε το 10% του όγκου της προκαλλιέργειας. Ανά δύο μπουκάλες αντιστοιχούσε μια διαφορετική συνθήκη ανάπτυξης, δηλαδή προστέθηκε διαφορετική ποσότητα ξυλόζης ή αλάτων. Τέλος οι κωνικές καλύφθηκαν με βαμβάκι και ο επωασμός έγινε σε θερμοκρασία 30 ^{o}C και 200 rpm για 2 ημέρες σε αναδευόμενο θάλαμο επώασης(ZHWY-211C, ZHICHENG®).

1.5 Αναερόβια ανάπτυξη

Για την αναερόβια ανάπτυξη χρησιμοποιήθηκαν κωνικές φιάλες 250ml οι οποίες είχαν αποστειρωθεί στους120 ^{o}C για 20 λεπτά και περιείχαν ξυλόζη. Στις κωνικές αυτές φιάλες μεταφέρθηκαν 100 ml της αερόβιας καλλιέργειας και στη συνέχεια καλύφθηκαν με φελλούς για να εμποδιστεί η εισροή αέρα. Τέλος ο επωασμός της καλλιέργειας έγινε σε θερμοκρασία 30° C και 80 rpm σε αναδευόμενο θάλαμο επώασης (ZHWY-211C, ZHICHENG®).

1.6 Δειγματοληψία

Τα δείγματα λαμβάνονταν ανά 24 ώρες σε πλαστικά vials υπό στείρες συνθήκες σε θάλαμο νηματικής ροής. Αντιστοιχούσε ένα ζεύγος δειγμάτων ανά συνθήκη και τα αποτελέσματα των μετρήσεων αποτελούν το μέσο όρο των δύο δειγμάτων.

Τα δείγματα χρησιμοποιήθηκαν για μέτρηση αιθανόλης και σακχάρων και είχε προηγηθεί φυγοκέντρηση 10 λεπτών σε ταχύτητα 5000 rpm στη φυγόκεντρο TJ-6 CENTRIFUGE της εταιρείας BEKMAN®.

1.7 Μετρήσεις αιθανόλης

Ο υπολογισμός της παραγόμενης αιθανόλης κατά το αναερόβιο στάδιο έγινε με τη μέθοδο υγρής χρωματογραφίας υψηλής αποδόσεως HPLC. Πριν τις αναλύσεις τα δείγματα

φιλτράρονταν (0,20 mm, Macherey-Nagel) για απομάκρυνση παρεμποδιζουσών ουσιών. Ο διαλύτης που χρησιμοποιήθηκε ήταν διάλυμα θειικού οξέος (H_2SO_4) 5mM και η απαερίωση του γινόταν με ήλιο. Η ροή του διαλύτη ήταν 0,6ml/min, η ποσότητας της κάθε δειγματοληψίας 50μl και η κάθε ανάλυση διαρκούσε 30 λεπτά. Το σύστημα που χρησιμοποιήθηκε ήταν Schimadzu UFLC με αυτόματο δειγματολήπτη και ανιχνευτή RID-10A Schimadzu. Η στήλη διαχωρισμού βρισκόταν σε 40°C και ήταν η HPLC Organic Acid Analysis Column, Animex® HPX-87H Ion Exclusion Column, 300mm*7,8mm της εταιρείας BIORAD.

1.8 Μετρήσεις σακχάρων

Ο υπολογισμός των εναπομεινάντων σακχάρων στη καλλιέργεια κατά την αερόβια και αναερόβια ανάπτυξη του μύκητα έγινε σύμφωνα με τη μέθοδο του δινιτροσαλικυλικου οξέος (DNS). Σύμφωνα με τη μέθοδο του δινιτροσαλικυλικου οξέος προστίθενται 250μl δείγματος και 250μlDNS. Στη συνέχεια πραγματοποιείται βρασμός για 5 λεπτά, μετά το πέρας της οποίας ακολουθεί προσθήκη απιονισμένου νερού 2ml και φωτομέτρηση στα 540nm [Miller, 1959]. (S-22 UV/Vis Spectrophotometer, BOECO, Germany).

1.9 Επίδραση προσθήκης διαφορετικής συγκέντρωσης υποστρώματος

Για να μετρηθεί η επίδραση της συγκέντρωσης υποστρώματος στη ζύμωση του μικροοργανισμού πραγματοποιήθηκε μία σειρά πειραμάτων με 10, 20 30 και 40 g/L ξυλόζης αντίστοιχα. Όλα τα πειράματα πραγματοποιήθηκαν σε δυάδες. Σε κάθε ζεύγος κωνικών φιαλών αντιστοιχούσε διαφορετική συνθήκη, δηλαδή είχε προστεθεί διαφορετική ποσότητα ξυλόζης και το αποτέλεσμα προέκυψε ως ο μέσος όρος των δύο.

Αρχικά κατά το στάδιο παρασκευής της προκαλλιέργειας φτιάχτηκαν σε μια κωνική φιάλη 200ml διαλύματος με τα παρακάτω άλατα και τις αντίστοιχες συγκεντρώσεις: 1.00 g/L KH_2PO_4, 0.30 g/L $CaCl_2$•$2H_2O$, 0.30 g/L $MgSO_4$•$7H_2O$, 10.0 g/L $(NH_4)_2HPO_4$, 6.94 g/L NaH_2PO_4·$2H_2O$ και 9.52 g/L Na_2HPO_4·$2H_2O$. Επιπλέον προστέθηκαν 3 g/L εκχυλίσματος ζύμης, 5 g/L πεπτόνης και 3 g/L malt extract. Το διάλυμα αυτό μεταφέρθηκε ισόποσος σε 2 κωνικές φιάλες που περιείχαν 2 gr γλυκόζης. Ακόμη για την προκαλλιέργεια χρησιμοποιήθηκαν 10ml απιονισμένου νερού τα οποία προστέθηκαν στο σωλήνα με τον αποθηκευμένο μικροοργανισμό και μοιράστηκαν ισόποσα στις 2 κωνικές φιάλες. Όλες οι φιάλες είχαν αποστειρωθεί νωρίτερα στους 120 ^oC για 20 λεπτά και το διάλυμα είχε ρυθμιστεί σε pH 6.3.

Τέλος ο επωασμός της προκαλλιέργειας πραγματοποιήθηκε σε αναδευόμενο θάλαμο επώασης ρυθμισμένο στους 30 ^{o}C και 200 rpm για 2 ημέρες (ZHWY-211C, ZHICHENG®).

Για την αερόβια ανάπτυξη χρησιμοποιήθηκαν κωνικές φιάλες 250ml οι οποίες είχαν αποστειρωθεί στους120 ^{o}C για 20 λεπτά. Οι φιάλες περιείχαν το ίδιο διάλυμα με παραπάνω καθώς και 20g/L γλυκόζης αραιωμένα σε 90ml διαλύματος. Το διάλυμα ρυθμίστηκε σε pH 6.3.

Σε κάθε μια προκαλλιέργεια μεταφέρθηκε το 10% του όγκου της προκαλλιέργειας. Τέλος ο επωασμός έγινε σε θερμοκρασία 30 ^{o}C και 200 rpm για 2 ημέρες σε αναδευόμενο θάλαμο επώασης (ZHWY-211C, ZHICHENG®).

Για την αναερόβια ανάπτυξη χρησιμοποιήθηκαν κωνικές φιάλες 250ml οι οποίες είχαν αποστειρωθεί στους120 ^{o}C για 20 λεπτά και περιείχαν 10, 20, 30 και 40 g/L ξυλόζης αντιστοίχως. Στις φιάλες μεταφέρθηκαν 100 ml της αερόβιας καλλιέργειας. Ανά δύο μπουκάλες αντιστοιχούσε η διαφορετική συνθήκη ανάπτυξης, δηλαδή διαφορετική ποσότητα ξυλόζης. Τέλος, ο επωασμός της καλλιέργειας έγινε σε θερμοκρασία 30° C και 80 rpm σε αναδευόμενο θάλαμο επώασης (ZHWY-211C, ZHICHENG®).

1.10 Επίδραση προσθήκης μεταβλητής συγκέντρωσης $(NH_4)_2HPO_4$

Για να μετρηθεί η επίδραση της προσθήκης $(NH_4)_2HPO_4$στο υπόστρωμα κατά τη ζύμωση του μικροοργανισμού προστέθηκαν 5, 10 και 20 g/L $(NH_4)_2HPO_4$ κατά το αερόβιο στάδιο.

Πιο συγκεκριμένα, αρχικά κατά το στάδιο παρασκευής της προκαλλιέργειας φτιάχτηκαν σε μια κωνική φιάλη 200ml διαλύματος με τα παρακάτω άλατα με τις αντίστοιχες συγκεντρώσεις: 1.00 g/L KH_2PO_4, 0.30 g/L $CaCl_2$•$2H_2O$, 0.30 g/L $MgSO_4$•$7H_2O$, 6.94 g/L NaH_2PO_4·$2H_2O$ και 9.52 g/L Na_2HPO_4·$2H_2O$. Επιπλέον στη κωνική φιάλη με τα άλατα προστέθηκαν 3 g/L εκχυλίσματος ζύμης, 5 g/L πεπτόνη και 3g/L malt extract. Το διάλυμα αυτό μεταφέρθηκε ισόποσος σε 2 κωνικές φιάλες που περιείχαν 2g/L ξυλόζης. Ακόμη για την προκαλλιέργεια χρησιμοποιήθηκαν 10ml απιονισμένου νερού τα οποία προστέθηκαν στο σωλήνα με τον αποθηκευμένο μικροοργανισμό και μοιράστηκαν ισόποσα στις 2 κωνικές φιάλες. Όλες οι φιάλες είχαν αποστειρωθεί νωρίτερα στους 120 ^{o}C για 20 λεπτά και το διάλυμα είχε ρυθμιστεί σε pH 6.3.

Τέλος ο επωασμός της προκαλλιέργειας πραγματοποιήθηκε σε αναδευόμενο θάλαμο επώασης ρυθμισμένο στους 30 ^{o}C και 200 rpm για 2 ημέρες (ZHWY-211C, ZHICHENG®).

Για την αερόβια ανάπτυξη χρησιμοποιήθηκαν 6 κωνικές φιάλες 250ml οι οποίες είχαν αποστειρωθεί στους120 ^{o}C για 20 λεπτά. Οι φιάλες περιείχαν τα παρακάτω άλατα με τις αντίστοιχες συγκεντρώσεις: 6.94 g/L $NaH_2PO_4 \cdot 2H_2O$, 9.52 g/L $Na_2HPO_4 \cdot 2H_2O$, 1.00 g/L KH_2PO_4, 0.30 g/L $MgSO_4 \bullet 7H_2O$, 0.30 g/L $CaCl_2$. Επιπλέον προστέθηκαν 20g/L ξυλόζης καθώς και $(NH_4)_2HPO_4$ σε συγκεντρώσεις 5, 10 και 20 g/L ανά δύο κωνικές αραιωμένα σε 90ml διαλύματος. Το διάλυμα ρυθμίστηκε σε pH 6.3.

Σε κάθε μια προκαλλιέργεια μεταφέρθηκε το 10% του όγκου της προκαλλιέργειας, δηλαδή 10ml. Κατά αυτό τον τρόπο αντιστοιχούσε ανά δύο μπουκάλες μια διαφορετική συνθήκη, δηλαδή διαφορετική συγκέντρωση σε $(NH_4)_2HPO_4$. Τέλος ο επωασμός έγινε σε θερμοκρασία 30°C και 200 rpm για 4 ημέρες σε αναδευόμενο θάλαμο επώασης (ZHWY-211C, ZHICHENG®).

Για την αναερόβια ανάπτυξη χρησιμοποιήθηκαν 6 κωνικές φιάλες 250ml οι οποίες είχαν αποστειρωθεί στους 120 ^{o}C για 20 λεπτά και περιείχαν ανά δύο 20g/L ξυλόζης. Στις φιάλες μεταφέρθηκαν 100 ml της αερόβιας καλλιέργειας. Τέλος ο επωασμός της καλλιέργειας έγινε σε θερμοκρασία 30° C και 80 rpm σε αναδευόμενο θάλαμο επώασης (ZHWY-211C, ZHICHENG®).

1.11 Επίδραση προσθήκης μεταβλητής συγκέντρωσης malt extract

Για να μετρηθεί η επίδραση της προσθήκης malt extract στο υπόστρωμα κατά τη ζύμωση του μικροοργανισμού προστέθηκαν 1, 3 και 5 g/L malt extract ανά δύο κωνικές φιάλες που περιείχαν 20 g/L ξυλόζης.

Αρχικά κατά το στάδιο παρασκευής της προκαλλιέργειας φτιάχτηκαν σε μια κωνική φιάλη 200ml διαλύματος με τα παρακάτω άλατα και τις αντίστοιχες: 1.00 g/L KH_2PO_4, 0.30 g/L $CaCl_2 \bullet 2H_2O$, 0.30 g/L $MgSO_4 \bullet 7H_2O$, 6.94 g/L $NaH_2PO_4 \cdot 2H_2O$ και 9.52 g/L $Na_2HPO_4 \cdot 2H_2O$. Επιπλέον στη κωνική φιάλη με τα άλατα προστέθηκαν 3 gr εκχυλίσματος ζύμης και 3gr πεπτόνης. Το διάλυμα αυτό μεταφέρθηκε ισόποσος σε 2 κωνικές φιάλες που περιείχαν 20 g/L ξυλόζης. Ακόμη για την προκαλλιέργεια χρησιμοποιήθηκαν 10 ml απιονισμένου νερού τα οποία προστέθηκαν στο σωλήνα με τον αποθηκευμένο μικροοργανισμό και μοιράστηκαν ισόποσα στις 2 κωνικές φιάλες. Όλες οι φιάλες είχαν αποστειρωθεί νωρίτερα στους 120 ^{o}C για 20 λεπτά και το διάλυμα είχε ρυθμιστεί σε pH 6.3.

Τέλος ο επωασμός της προκαλλιέργειας πραγματοποιήθηκε σε αναδευόμενο θάλαμο επώασης ρυθμισμένο στους 30 ^{o}C και 200 rpm για 2 ημέρες (ZHWY-211C, ZHICHENG®).

Για την αερόβια ανάπτυξη χρησιμοποιήθηκαν 6 κωνικές φιάλες 250ml οι οποίες είχαν αποστειρωθεί στους120 ^{o}C για 20 λεπτά. Οι φιάλες περιείχαν τα ίδια άλατα με παραπάνω,5 gr πεπτόνης, 3gr εκχυλίσματος ζύμης , 20g/L ξυλόζης καθώς και ανά δύο 1, 3και 5 g/L malt extract αραιωμένα σε 90ml διαλύματος. Το διάλυμα ρυθμίστηκε σε pH 6.3.

Σε κάθε μια προκαλλιέργεια μεταφέρθηκε το 10% του όγκου της προκαλλιέργειας, δηλαδή 10ml. Ανά δύο μπουκάλες αντιστοιχούσε η διαφορετική συνθήκη ανάπτυξης, δηλαδή διαφορετική ποσότητα malt extract. Τέλος ο επωασμός έγινε σε θερμοκρασία 30 ^{o}C και 200 rpm για 4 ημέρες σε αναδευόμενο θάλαμο επώασης(ZHWY-211C, ZHICHENG®).

Για την αναερόβια ανάπτυξη χρησιμοποιήθηκαν 6 κωνικές φιάλες 250ml οι οποίες είχαν αποστειρωθεί στους120 ^{o}C για 20 λεπτά και περιείχαν 20 g/L ξυλόζης. Στις φιάλες μεταφέρθηκαν 100 ml της αερόβιας καλλιέργειας. Τέλος ο επωασμός της καλλιέργειας έγινε σε θερμοκρασία 30° C και 80 rpm σε αναδευόμενο θάλαμο επώασης (ZHWY-211C, ZHICHENG®).

1.12 Επίδραση προσθήκης μεταβλητής συγκέντρωσης εκχυλίσματος ζύμης

Για να μετρηθεί η επίδραση της προσθήκης εκχυλίσματος ζύμης στο υπόστρωμα κατά τη ζύμωση του μικροοργανισμού προστέθηκαν 1, 3 και 5 g/L εκχυλίσματος ζύμης ανά δύο κωνικές φιάλες που περιείχαν 20 g/L ξυλόζης.

Αρχικά κατά το στάδιο παρασκευής της προκαλλιέργειας φτιάχτηκαν σε μια κωνική φιάλη 200ml διαλύματος με τα παρακάτω άλατα και τις αντίστοιχες συγκεντρώσεις: 1.00 g/L KH_2PO_4, 0.30 g/L $CaCl_2$•$2H_2O$, 0.30 g/L $MgSO_4$•$7H_2O$, 6.94 g/L NaH_2PO_4·$2H_2O$ και 9.52 g/L Na_2HPO_4·$2H_2O$. Επιπλέον στη κωνική φιάλη με τα άλατα προστέθηκαν 3 gr εκχυλίσματος ζύμης, 5 gr πεπτόνης και 3 gr malt extract. Το διάλυμα αυτό μεταφέρθηκε ισόποσος σε 2 κωνικές φιάλες που περιείχαν 2 g/L ξυλόζης. Ακόμη για την προκαλλιέργεια χρησιμοποιήθηκαν 10ml απιονισμένου νερού τα οποία προστέθηκαν στο σωλήνα με τον αποθηκευμένο μικροοργανισμό και μοιράστηκαν ισόποσα στις 2 κωνικές φιάλες. Όλες οι φιάλες είχαν αποστειρωθεί νωρίτερα στους 120 ^{o}C για 20 λεπτά και το διάλυμα είχε ρυθμιστεί σε pH 6.3.

Τέλος ο επωασμός της προκαλλιέργειας πραγματοποιήθηκε σε αναδευόμενο θάλαμο επώασης ρυθμισμένο στους 30 ^{o}C και 200 rpm για 2 ημέρες (ZHWY-211C, ZHICHENG®).

Για την αερόβια ανάπτυξη χρησιμοποιήθηκαν 6 κωνικές φιάλες 250ml οι οποίες είχαν αποστειρωθεί στους120 ^{o}C για 20 λεπτά. Οι φιάλες περιείχαν τα ίδια άλατα με παραπάνω, 20 g/L ξυλόζης, 5 g/L πεπτόνης, 3g/L malt extract καθώς και ανά δύο 1, 3 και 5 g/L εκχυλίσματος ζύμης αραιωμένα σε 90ml διαλύματος. Κατά αυτό τον τρόπο αντιστοιχούσε ανά δύο μπουκάλες μια διαφορετική συνθήκη, δηλαδή διαφορετική συγκέντρωση σε εκχύλισμα ζύμης. Το διάλυμα στη συνέχεια ρυθμίστηκε σε pH 6.3.

Σε κάθε μια προκαλλιέργεια μεταφέρθηκε το 10% του όγκου της προκαλλιέργειας, δηλαδή 10ml. Ανά δύο μπουκάλες αντιστοιχούσε η διαφορετική συνθήκη ανάπτυξης, δηλαδή διαφορετική ποσότητα ξυλόζης. Τέλος ο επωασμός έγινε σε θερμοκρασία 30 ^{o}C και 200 rpm για 4 ημέρες σε αναδευόμενο θάλαμο επώασης(ZHWY-211C, ZHICHENG®).

Για την αναερόβια ανάπτυξη χρησιμοποιήθηκαν 6 κωνικές φιάλες 250ml οι οποίες είχαν αποστειρωθεί στους120 ^{o}C για 20 λεπτά και περιείχαν ανά δύο 20g/L ξυλόζης. Στις φιάλες μεταφέρθηκαν 100 ml της αερόβιας καλλιέργειας. Τέλος ο επωασμός της καλλιέργειας έγινε σε θερμοκρασία 30° C και 80 rpm σε αναδευόμενο θάλαμο επώασης (ZHWY-211C, ZHICHENG®).

1.13 Επίδραση προσθήκης μεταβλητής συγκέντρωσης πεπτόνης

Για να μετρηθεί η επίδραση της προσθήκης malt extract στο υπόστρωμα κατά τη ζύμωση του μικροοργανισμού προστέθηκαν 3, 5 και 7 g/L πεπτόνης ανά δύο κωνικές φιάλες που περιείχαν 20 g/L ξυλόζης.

Αρχικά για το στάδιο επωασμού του μικροοργανισμού φτιάχτηκε μια προκαλλιέργεια. Σε μια κωνική φιάλη παρασκευάστηκαν 200ml διαλύματος με τα παρακάτω άλατα και τις αντίστοιχες συγκεντρώσεις: 1.00 g/L KH_2PO_4, 0.30 g/L $CaCl_2$•$2H_2O$, 0.30 g/L $MgSO_4$•$7H_2O$, 6.94 g/L NaH_2PO_4·$2H_2O$ και 9.52 g/L Na_2HPO_4·$2H_2O$. Επιπλέον στη κωνική φιάλη με τα άλατα προστέθηκαν 3 gr εκχυλίσματος ζύμης και 3 gr malt extract. Το διάλυμα αυτό μεταφέρθηκε ισόποσος σε 6 κωνικές φιάλες που περιείχαν 20g/L ξυλόζης. Ακόμη για την προκαλλιέργεια χρησιμοποιήθηκαν 10ml απιονισμένου νερού τα οποία προστέθηκαν στο σωλήνα με τον αποθηκευμένο μικροοργανισμό και μοιράστηκαν ισόποσα στις 2 κωνικές φιάλες. Όλες οι φιάλες είχαν αποστειρωθεί νωρίτερα στους 120 ^{o}C για 20 λεπτά και το διάλυμα είχε ρυθμιστεί σε pH 6.3.

Τέλος ο επωασμός της προκαλλιέργειας πραγματοποιήθηκε σε αναδευόμενο θάλαμο επώασης ρυθμισμένο στους 30 ^{o}C και 200 rpm για 2 ημέρες (ZHWY-211C, ZHICHENG®).

Για την αερόβια ανάπτυξη χρησιμοποιήθηκαν κωνικές φιάλες 250ml οι οποίες είχαν αποστειρωθεί στους120 ^{o}C για 20 λεπτά. Οι φιάλες περιείχαν τα ίδια άλατα με παραπάνω καθώς και 3 g/L εκχυλίσματος ζύμης, 3g/L malt extract, 20g/L ξυλόζης καθώς και ανά δύο 3, 5 και 7g/L πεπτόνης αραιωμένα σε 90ml διαλύματος. Το διάλυμα ρυθμίστηκε σε pH 6.3.

Σε κάθε μια προκαλλιέργεια μεταφέρθηκε το 10% του όγκου της προκαλλιέργειας, δηλαδή 10ml. Ανά δύο μπουκάλες αντιστοιχούσε η διαφορετική συνθήκη ανάπτυξης, δηλαδή διαφορετική ποσότητα πεπτόνης. Τέλος ο επωασμός έγινε σε θερμοκρασία 30 ^{o}C και 200 rpm για 4 ημέρες σε αναδευόμενο θάλαμο επώασης (ZHWY-211C, ZHICHENG®).

Για την αναερόβια ανάπτυξη χρησιμοποιήθηκαν 6 κωνικές φιάλες 250ml οι οποίες είχαν αποστειρωθεί στους120 ^{o}C για 20 λεπτά και περιείχαν ανά δύο 20 g/L ξυλόζης μαζί με 3, 5 και 7 g/L malt extract αντίστοιχα. Στις φιάλες μεταφέρθηκαν 100 ml της αερόβιας καλλιέργειας. Τέλος ο επωασμός της καλλιέργειας έγινε σε θερμοκρασία 30° C και 80 rpm σε αναδευόμενο θάλαμο επώασης (ZHWY-211C, ZHICHENG®).

1.14 Επίδραση προσθήκης μεταβλητής συγκέντρωσης μαγνησίου

Για να μετρηθεί η επίδραση της προσθήκης μαγνησίου στο υπόστρωμα κατά τη ζύμωση του μικροοργανισμού προστέθηκαν 0,2, 0,4, 0,6, 0,8 gr $MgSO_4$ που αντιστοιχούν σε συγκεντρώσεις Mg^+ ανά δύο κωνικές φιάλες 1.1 mM, 2 mM, 3 mM και 4 mM που περιείχαν 20 g/L ξυλόζης. Επίσης φτιάχτηκε ένα control δείγμα που περιείχε μόνο το υπόστρωμα.

Αρχικά κατά το στάδιο παρασκευής της προκαλλιέργειας φτιάχτηκαν σε μια κωνική φιάλη 200ml διαλύματος με τα παρακάτω άλατα και τις αντίστοιχες συγκεντρώσεις: 1.00 g/L KH_2PO_4, 0.30 g/L $CaCl_2$•$2H_2O$, 0.30 g/L $MgSO_4$•$7H_2O$, 6.94 g/L NaH_2PO_4·$2H_2O$ και 9.52 g/L Na_2HPO_4·$2H_2O$. Επίσης στο διάλυμα προστέθηκαν 3 gr εκχυλίσματος ζύμης, 5 gr πεπτόνης και 3 gr malt extract.Το διάλυμα αυτό μεταφέρθηκε ισόποσος σε 2 κωνικές φιάλες που περιείχαν 20 g/L γλυκόζης. Ακόμη για την προκαλλιέργεια χρησιμοποιήθηκαν 10ml απιονισμένου νερού τα οποία προστέθηκαν στο σωλήνα με τον αποθηκευμένο μικροοργανισμό και μοιράστηκαν ισόποσα στις 2 κωνικές φιάλες. Όλες οι φιάλες είχαν αποστειρωθεί νωρίτερα στους 120 ^{o}C για 20 λεπτά και το διάλυμα είχε ρυθμιστεί σε pH 6.3.

Τέλος ο επωασμός της προκαλλιέργειας πραγματοποιήθηκε σε αναδευόμενο θάλαμο επώασης ρυθμισμένο στους 30 ^{o}C και 200 rpm για 2 ημέρες (ZHWY-211C, ZHICHENG®).

Για την αερόβια ανάπτυξη χρησιμοποιήθηκαν κωνικές φιάλες 250ml οι οποίες είχαν αποστειρωθεί στους120 ^{o}C για 20 λεπτά. Οι φιάλες περιείχαν ανά δύο τα ίδια άλατα με

παραπάνω, 20g/L ξυλόζης καθώς και 0 mM, 1.1 mM, 2 mM, 3 mM και 4 mM $MgSO_4$ αραιωμένα σε 90ml διαλύματος. Το διάλυμα ρυθμίστηκε σε pH 6.3.

Σε κάθε μια προκαλλιέργεια μεταφέρθηκε το 10% του όγκου της προκαλλιέργειας. Ανά δύο μπουκάλες αντιστοιχούσε η διαφορετική συνθήκη ανάπτυξης, δηλαδή διαφορετική ποσότητα ξυλόζης. Τέλος ο επωασμός έγινε σε θερμοκρασία 30 ^oC και 200 rpm για 4 ημέρες σε αναδευόμενο θάλαμο επώασης(ZHWY-211C, ZHICHENG®).

Για την αναερόβια ανάπτυξη χρησιμοποιήθηκαν 10 κωνικές φιάλες 250ml οι οποίες είχαν αποστειρωθεί στους120 ^oC για 20 λεπτά και περιείχαν ανά δύο 20 g/L ξυλόζης. Στις φιάλες μεταφέρθηκαν 100 ml της αερόβιας καλλιέργειας. Τέλος ο επωασμός της καλλιέργειας έγινε σε θερμοκρασία 30° C και 80 rpm σε αναδευόμενο θάλαμο επώασης (ZHWY-211C, ZHICHENG®).

1.15 Επίδραση προσθήκης μεταβλητής συγκέντρωσης ιχνοστοιχείων

Για να μετρηθεί η επίδραση της προσθήκης ιχνοστοιχείων στο υπόστρωμα κατά τη ζύμωση του μικροοργανισμού προστέθηκαν ανά δύο κωνικές φιάλες που περιείχαν 20 g/L ξυλόζης τα παρακάτω ιχνοστοιχεία: Fe, Co, Zn, Mn. Τα ιχνοστοιχεία αυτά λήφθηκαν από διάλυμα 20 ml όπου υπήρχαν με τις αντίστοιχες συγκεντρώσεις: $FeSO_4 \cdot 7H_2O$ 5mg/L, $ZnSO_4 \cdot 7H_2O$ 1.4mg/L, $MnSO_4 \cdot 4H_2O$ 1.6mg/L και $CoCl_2$ 2mg/L.

Αρχικά κατά το στάδιο παρασκευής της προκαλλιέργειας φτιάχτηκαν σε μια κωνική φιάλη 200ml διαλύματος με τα παρακάτω άλατα και τις αντίστοιχες συγκεντρώσεις: 1.00 g/L KH_2PO_4, 0.30 g/L $CaCl_2$•2H2O, 0.30 g/L $MgSO_4$•$7H_2O$, 6.94 g/L $NaH_2PO_4 \cdot 2H_2O$ και 9.52 g/L $Na_2HPO_4 \cdot 2H_2O$. Επίσης προστέθηκαν 3 g/L εκχυλίσματος ζύμης, 5 g/L πεπτόνης και 3g/L malt extract. Στη συνέχεια το διάλυμα της προκαλλιέργειας μεταφέρθηκε ισόποσος σε 2 κωνικές φιάλες που περιείχαν 20 g/L ξυλόζης. Ακόμη για κάθε προκαλλιέργεια χρησιμοποιήθηκαν 10ml απιονισμένου νερού τα οποία προστέθηκαν στο σωλήνα με τον αποθηκευμένο μικροοργανισμό και μοιράστηκαν ισόποσα στις 2 κωνικές φιάλες. Όλες οι φιάλες είχαν αποστειρωθεί νωρίτερα στους 120 ^oC για 20 λεπτά και το διάλυμα είχε ρυθμιστεί σε pH 6.3.

Τέλος ο επωασμός της προκαλλιέργειας πραγματοποιήθηκε σε αναδευόμενο θάλαμο επώασης ρυθμισμένο στους 30 ^oC και 200 rpm για 2 ημέρες (ZHWY-211C, ZHICHENG®).

Για την αερόβια ανάπτυξη χρησιμοποιήθηκαν 6 κωνικές φιάλες 250ml οι οποίες περιείχαν 20 g/L ξυλόζη και είχαν αποστειρωθεί στους 120 ^oC για 20 λεπτά. Επιπλέον φτιαχτήκαν σε 3

κωνικές 250ml από τα παραπάνω άλατα και προστέθηκαν ακόμη σε κάθε μία 0.5, 1 και 2 ml ανά 100 ml από τα ιχνοστοιχεία. Το διάλυμα των 3 αυτών κωνικών ρυθμίστηκε σε pH 6.3 και αφού αποστειρώθηκαν όλες οι κωνικές στους120 ^{o}C για 20 λεπτά προστέθηκαν 90ml διαλύματος από κάθε κωνική ανά δύο στις κωνικές με την ξυλόζη.

Ακόμη σε κάθε μια από τις παραπάνω 6 κωνικές μεταφέρθηκε το 10% του όγκου της προκαλλιέργειας. Κατά αυτό τον τρόπο δημιουργήθηκαν 6 κωνικές 250ml που ανά δύο αντιστοιχούσαν σε διαφορετικά ποσότητα ιχνοστοιχείων. Τέλος ο επωασμός έγινε σε θερμοκρασία 30 ^{o}C και 200 rpm για 2 ημέρες σε αναδευόμενο θάλαμο επώασης(ZHWY-211C, ZHICHENG®).

Για την αναερόβια ανάπτυξη χρησιμοποιήθηκαν 6 κωνικές φιάλες 250ml οι οποίες είχαν αποστειρωθεί στους120 ^{o}C για 20 λεπτά και περιείχαν ανά δύο 20 g/L ξυλόζης. Στις φιάλες μεταφέρθηκαν 100 ml της αερόβιας καλλιέργειας. Τέλος ο επωασμός της καλλιέργειας έγινε σε θερμοκρασία 30° C και 80 rpm σε αναδευόμενο θάλαμο επώασης (ZHWY-211C, ZHICHENG®).

1.16 Επίδραση μεταβλητής παροχής αέρα

Για να εξετασθεί η επίδραση της παροχής αέρα κατά τη ζύμωση του μικροοργανισμού πραγματοποιήθηκαν οι ζυμώσεις σε 4 διαφορετικές παροχές αέρα.

Αρχικά κατά το στάδιο παρασκευής της προκαλλιέργειας φτιάχτηκαν σε μια κωνική φιάλη 400ml διαλύματος με τα παρακάτω άλατα και τις αντίστοιχες συγκεντρώσεις: 1.00 g/L KH_2PO_4, 0.30 g/L $CaCl_2$•$2H_2O$, 0.30 g/L $MgSO_4$•$7H_2O$, 10 g/L $(NH_4)_2HPO_4$, 6.94 g/L NaH_2PO_4·$2H_2O$ και 9.52 g/L Na_2HPO_4·$2H_2O$. Στη συνέχεια το διάλυμα της προκαλλιέργειας μεταφέρθηκε ισόποσος σε 4 κωνικές φιάλες που περιείχαν 20 g/L ξυλόζης. Ακόμη για κάθε προκαλλιέργεια χρησιμοποιήθηκαν 10ml απιονισμένου νερού τα οποία προστέθηκαν στο σωλήνα με τον αποθηκευμένο μικροοργανισμό και μοιράστηκαν ισόποσα στις 2 κωνικές φιάλες. Όλες οι φιάλες είχαν αποστειρωθεί νωρίτερα στους 120 ^{o}C για 20 λεπτά και το διάλυμα είχε ρυθμιστεί σε pH 6.3.

Τέλος ο επωασμός της προκαλλιέργειας πραγματοποιήθηκε σε αναδευόμενο θάλαμο επώασης ρυθμισμένο στους 30 ^{o}C και 200 rpm για 2 ημέρες (ZHWY-211C, ZHICHENG®).

Για την αερόβια ανάπτυξη χρησιμοποιήθηκαν 4 βιοαντιδραστήρες ελεγχόμενης παροχής αέρα (New Brunswick Scientific, Bioflo ® &Celligen ® 310). Στους βιοαντιδραστήρες προστέθηκαν 900 ml με όλα τα παραπάνω άλατα τα οποία είχαν αποστειρωθεί στους 120 oC

για 20 λεπτά. Επιπλέον στους αντιδραστήρες προστέθηκαν αφού είχαν αποστειρωθεί ξεχωριστά 20 g/L ξυλόζης. Ακόμη σε κάθε ένα από τις παραπάνω 4 αντιδραστήρες μεταφέρθηκαν 100 ml του όγκου της προκαλλιέργειας. Κατά αυτό τον τρόπο δημιουργήθηκαν 4 κωνικές 1L που ανά δύο αντιστοιχούσαν σε διαφορετικά συνθήκη.

Για την αναερόβια ανάπτυξη χρησιμοποιήθηκαν οι ίδιοι βιοαντιδραστήρες με σκοπό την ελεγχόμενη παροχή αέρα ούτως ώστε να επιβάλουμε αναερόβιες και μικροαερόβιες συνθήκες. Στους βιοαντιδραστήρες προστέθηκαν 20 g/L ξυλόζης στην υπάρχουσα υγρή καλλιέργεια μέσω αποστειρωμένων φίλτρων 0.45 μm. Οι συνθήκες που χρησιμοποιήθηκαν κατά τη ζύμωση ήταν 0, 0.07, 0.15 και 0.3 vvm, όπου vvm είναι οι μονάδες L παροχής αέρα ανά L όγκου αντιδραστήρα ανά λεπτό.

1.17 Επίδραση ζύμωσης προεπεξεργασμένου αχύρου

Αρχικά για το στάδιο της προκαλλιέργειας παρασκευάσθηκαν 200ml διαλύματος σε μια κωνική φιάλη με τα παρακάτω άλατα και τις αντίστοιχες συγκεντρώσεις: 1.00 g/L KH_2PO_4, 0.30 g/L $CaCl_2$•2H2O, 0.30 g/L $MgSO_4$•$7H_2O$, 6.94 g/L NaH_2PO_4·$2H_2O$ και 9.52 g/L Na_2HPO_4·$2H_2O$. Επιπλέον στη κωνική φιάλη με τα άλατα προστέθηκαν 3 gr εκχυλίσματος ζύμης, 5 gr πεπτόνης και 3 gr malt extract. Το διάλυμα αυτό μεταφέρθηκε ισόποσος σε 2 κωνικές φιάλες που περιείχαν 20 g/L αχύρου. Ακόμη για την προκαλλιέργεια χρησιμοποιήθηκαν 10ml απιονισμένου νερού τα οποία προστέθηκαν στο σωλήνα με τον αποθηκευμένο μικροοργανισμό και μοιράστηκαν ισόποσα στις 2 κωνικές φιάλες. Το διάλυμα είχε αποστειρωθεί νωρίτερα στους 120 ^oC για 20 λεπτά και είχε ρυθμιστεί σε pH 6.3.

Τέλος ο επωασμός της προκαλλιέργειας πραγματοποιήθηκε σε αναδευόμενο θάλαμο επώασης ρυθμισμένο στους 30 ^oC και 200 rpm για 2 ημέρες (ZHWY-211C, ZHICHENG®).

Για την αερόβια ανάπτυξη χρησιμοποιήθηκαν 4 κωνικές φιάλες 250ml οι οποίες περιείχαν ανά δύο τα ίδια άλατα με παραπάνω και 20 g/L αχύρου. Επιπλέον οι 2 κωνικές περιείχαν 3 g/L εκχυλίσματος ζύμης, 3g/L malt extract, 5 g/L πεπτόνης καθώς και 0.1ml/L ιχνοστοιχείων αραιωμένα σε 90ml διαλύματος. Οι υπόλοιπες 2 κωνικές περιείχαν εκτός από τα άλατα και 10 g/L $(NH_4)_2HPO_4$. Όλες οι κωνικές ρυθμίστηκαν σε pH 6.3.

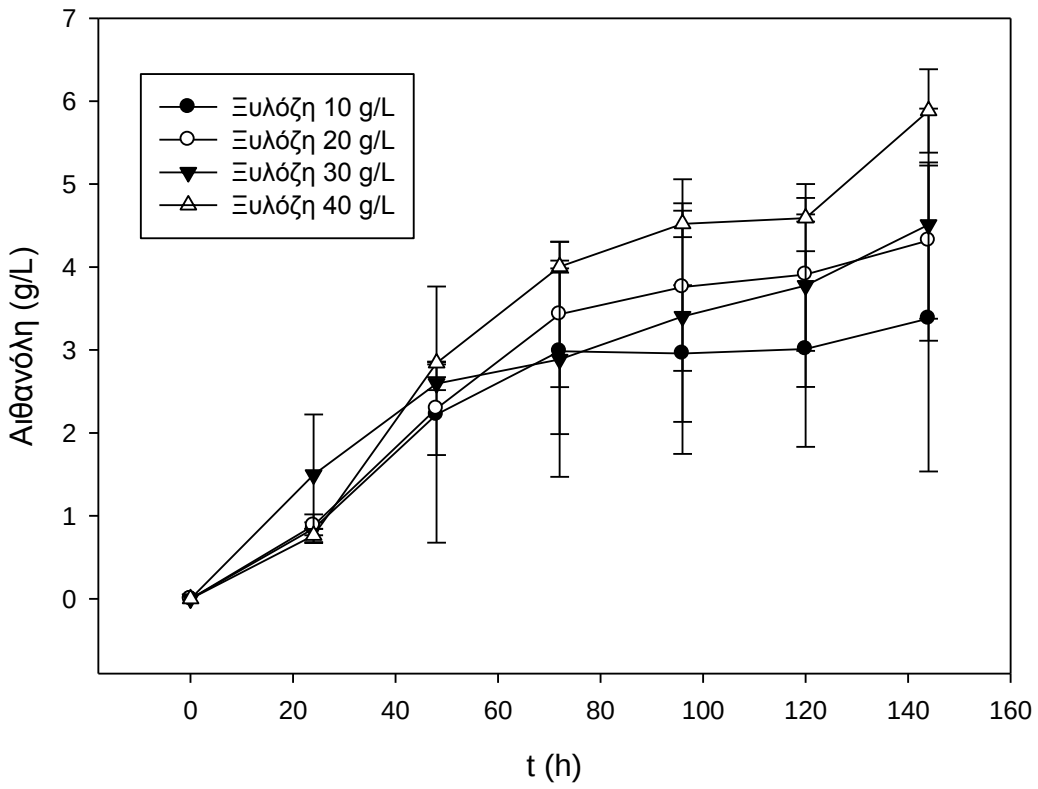
Σε κάθε μια κωνική μεταφέρθηκε το 10% του όγκου της προκαλλιέργειας, δηλαδή 10ml. Ανά δύο μπουκάλες αντιστοιχούσε κατά αυτό το τρόπο διαφορετική συνθήκη ανάπτυξης. Τέλος ο επωασμός έγινε σε θερμοκρασία 30 ^oC και 200 rpm για 2 ημέρες σε αναδευόμενο θάλαμο επώασης(ZHWY-211C, ZHICHENG®).

Για την αναερόβια ανάπτυξη χρησιμοποιήθηκαν 4 κωνικές φιάλες 250ml οι οποίες περιείχαν ανά δύο 20 g/L άχυρο. Στις φιάλες μεταφέρθηκαν 100 ml της αερόβιας καλλιέργειας. Τέλος ο επωασμός της καλλιέργειας έγινε σε θερμοκρασία 30° C και 80 rpm σε αναδευόμενο θάλαμο επώασης (ZHWY-211C, ZHICHENG®).

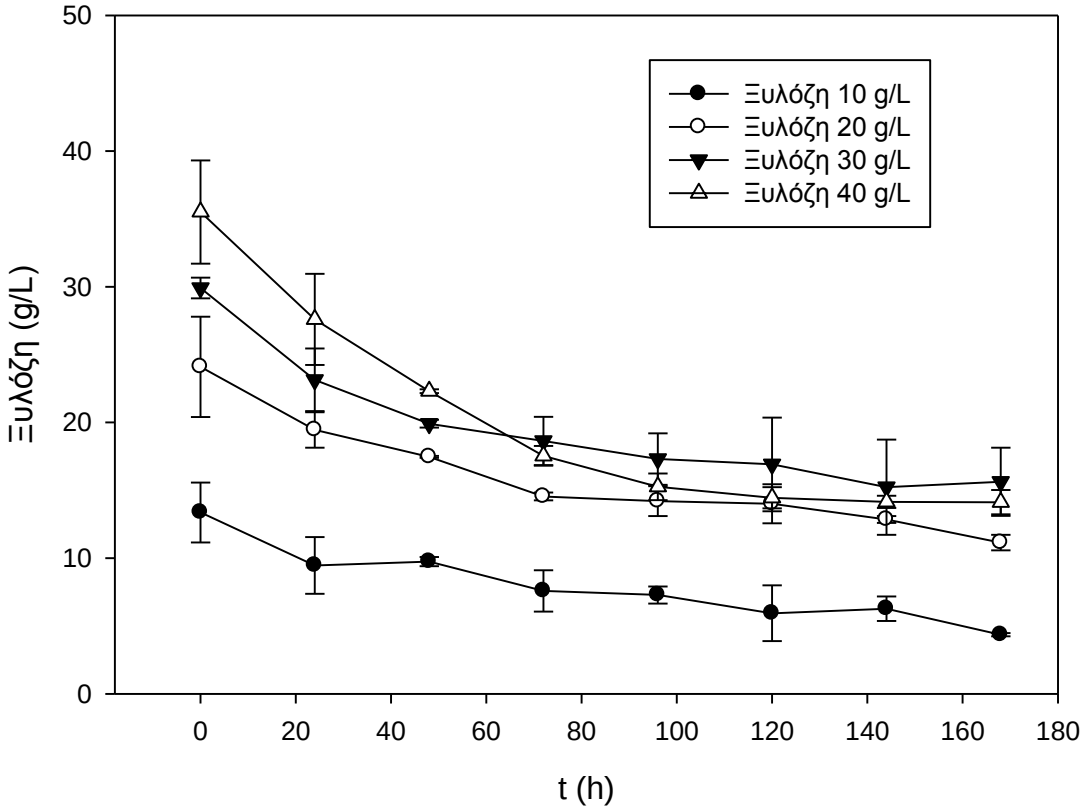
Τέλος κατά τη δειγματοληψία της καλλιέργειας αχύρου τα δείγματα τοποθετήθηκαν σε προζυγισμένα φιαλίδια και βρέθηκε το καθαρό βάρος των δειγμάτων. Το βάρος αυτό θεωρούμε ότι αντιστοιχούσε στην ισότιμη ογκομετρική ποσότητα με βάση τη παραδοχή ότι η πυκνότητα του αχύρου είναι 1 g/ml. Κατά αυτό τον τρόπο συμπληρώθηκε στη συνέχεια η ανάλογη ποσότητα νερού και τα δείγματα φυγοκεντρήθηκαν ώστε να απομονωθεί το υπερκείμενο το οποίο ακολούθως φιλτραρίστηκε σε vials και eppendorf.

2. Αποτελέσματα-Σχολιασμός

2.1 Μελέτη ζύμωσης του μικροοργανισμού *F. oxysporum* σε αυξανόμενες συγκεντρώσεις υποστρώματος.

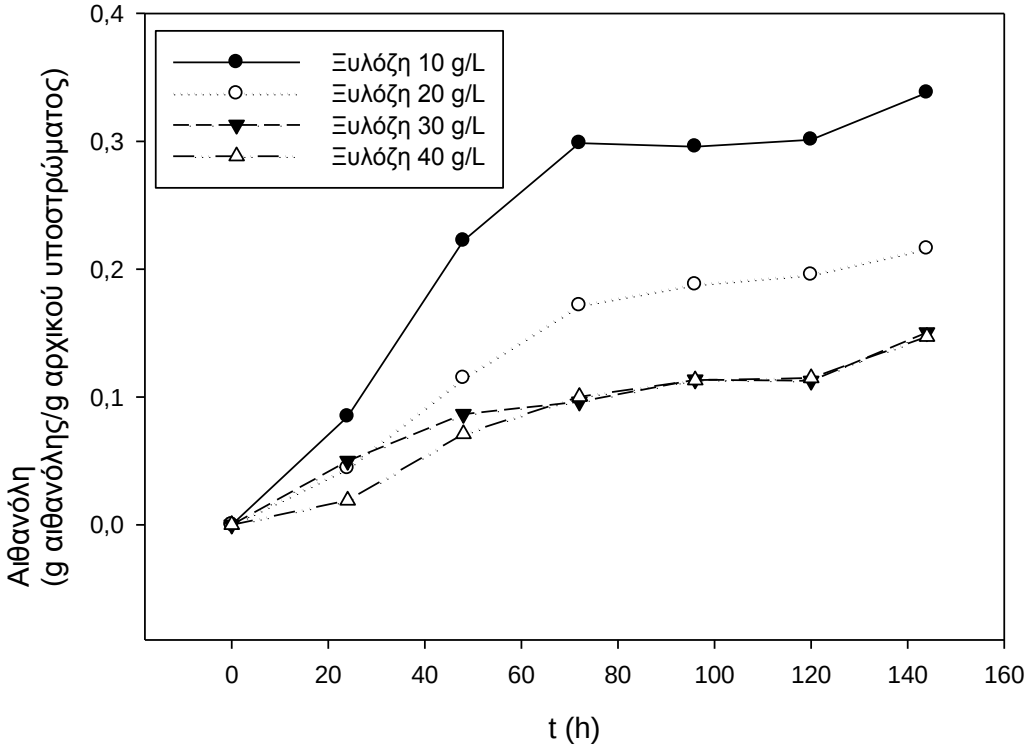


Διάγραμμα 1: Παραγωγή αιθανόλης κατά τη ζύμωση του μύκητα σε σχέση με το χρόνο ανάλογα με τη συγκέντρωση ξυλόζης που περιεχόταν στην καλλιέργεια.



Διάγραμμα 2: Κατανάλωση ξυλόζης κατά τη ζύμωση του μύκητα σε σχέση με το χρόνο ανάλογα με τη συγκέντρωση ξυλόζης που περιεχόταν στην καλλιέργεια.

Από το διάγραμμα παραγωγής αιθανόλης παρατηρούμε ότι έχουμε σημαντική παραγωγή αιθανόλης από τις πρώτες κιόλας μέρες. Ιδιαίτερα για τις περιεκτικότητες 10, 20 και 40 g/L παρατηρούμε για τις 3 πρώτες μέρες και ανά ημέρα σχεδόν διπλασιάζεται η αιθανόλη ενώ για ξυλόζη με 30 g/L παρατηρείται σταθερός χαμηλός ρυθμός αύξησης μέχρι και το πέρας της ζύμωσης. Είναι εμφανές ακόμη για τα πειράματα με περιεκτικότητες 10 και 20 g/L ότι η παραγωγή αιθανόλης τείνει να σταθεροποιηθεί μετά το πέρας των 72h.



Διάγραμμα 3: Παραγωγή αιθανόλης ανά ποσότητα αρχικού υποστρώματος κατά τη ζύμωση του μύκητα σε σχέση με το χρόνο ανάλογα με τη συγκέντρωση ξυλόζης που περιεχόταν στην καλλιέργεια.

Για να μελετηθεί όμως η αποδοτικότητα και η παραγωγικότητα των πειραμάτων θα πρέπει να εξετασθεί η παραγόμενη ποσότητα αιθανόλης ανά τη ποσότητα υποστρώματος που προστέθηκε αρχικά.

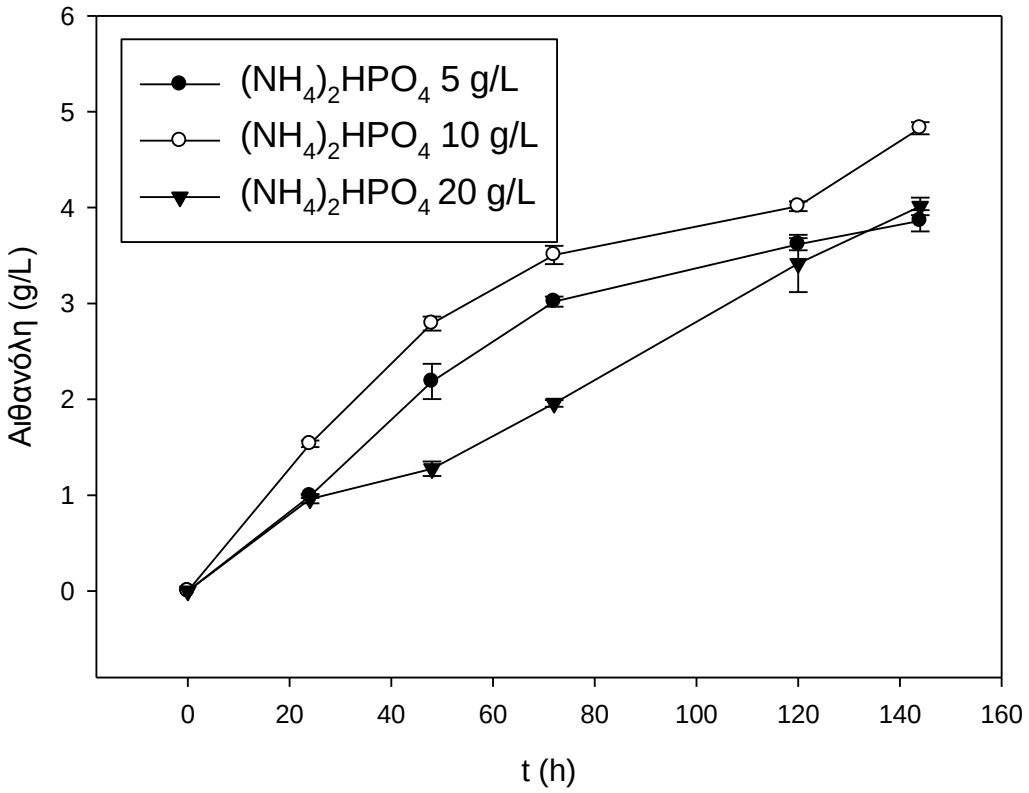
Από το διάγραμμα 3 καταλήγουμε στο συμπέρασμα ότι η αρχική περιεκτικότητα σε ξυλόζη επιδρά σημαντικά στην παραγωγικότητα του μικροοργανισμού. Η βέλτιστη απόδοση του μικροοργανισμού επιτεύχθηκε για αρχική περιεκτικότητα σε ξυλόζη 10 g/L, ενώ αμέσως μετά ακολουθεί η περιεκτικότητα των 20 g/L. Αυτό επιβεβαιώνεται και από το διάγραμμα κατανάλωσης ξυλόζης καθώς για τη καλλιέργεια που αναπτυσσόταν με 10 g/L ξεκινώντας από 13.4 g/L καταλήξαμε σε 4.4 g/L, ενώ για τη καλλιέργεια που αναπτυσσόταν με 20 g/L ξεκινώντας από 24 g/L καταλήξαμε σε 11.15 g/L . Συνεπώς συμπεραίνουμε ότι συγκέντρωση ξυλόζης μεγαλύτερη από 20 g/L επιδρά αρνητικά στη ζύμωση παρεμποδίζοντας την.

Ως ιδανική κρίνεται η επιλογή προσθήκης 20 g/L καθώς οδηγεί σε υψηλή απόδοση και σε μεγαλύτερη παραγωγή αιθανόλης σε σχέση με την προσθήκη 10 g/L.

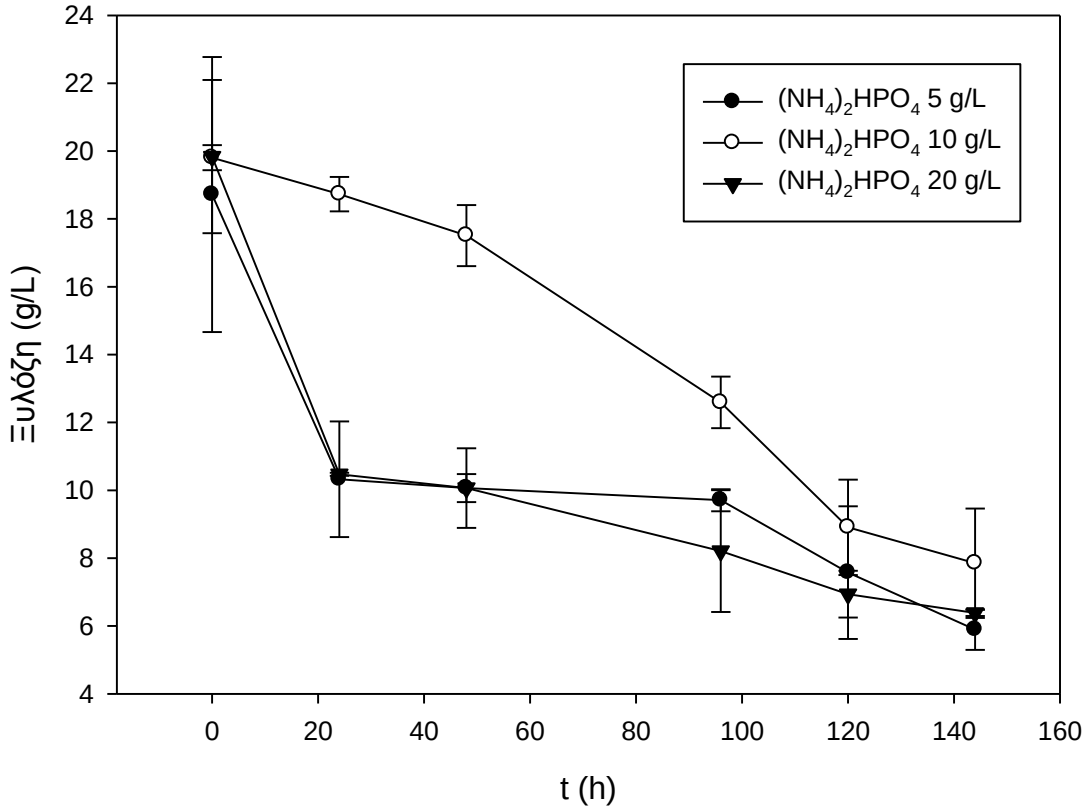
Τα αποτελέσματα αυτά συμφωνούν εν μέρει με παλαιότερες έρευνες όπου βρέθηκε για ζύμωση υποστρώματος ξυλόζη 30 g/L με τον μικροοργανισμό *Pachysolen Tannophilus* μέγιστη παραγωγή αιθανόλης 3.9 g/L [Lei Zhao et al. 2008] και για ζύμωση ξυλόζης 40 g/L με τον μικροοργανισμό FF11 *F. oxysporum* βρέθηκε αιθανόλη 4.9 g/L [Ανασοντζής 2010].

2.2 Μελέτη ζύμωσης του μύκητα *F. oxysporum* υπό την επίδραση αζωτούχων ενώσεων

2.2.1 Επίδραση $(NH_4)_2HPO_4$ κατά τη ζύμωση



Διάγραμμα 4: Παραγωγή αιθανόλης κατά τη ζύμωση του μύκητα σε σχέση με το χρόνο ανάλογα με τη συγκέντρωση $(NH_4)_2HPO_4$ που περιεχόταν στην καλλιέργεια.



Διάγραμμα 5: Κατανάλωση ξυλόζης κατά τη ζύμωση του μύκητα σε σχέση με το χρόνο ανάλογα με τη συγκέντρωση $(NH_4)_2HPO_4$ που περιεχόταν στην καλλιέργεια.

Από το παραπάνω διάγραμμα παρατηρούμε ότι η προσθήκη $(NH_4)_2HPO_4$ επιδρά σημαντικά στην απόδοση της αιθανόλης.

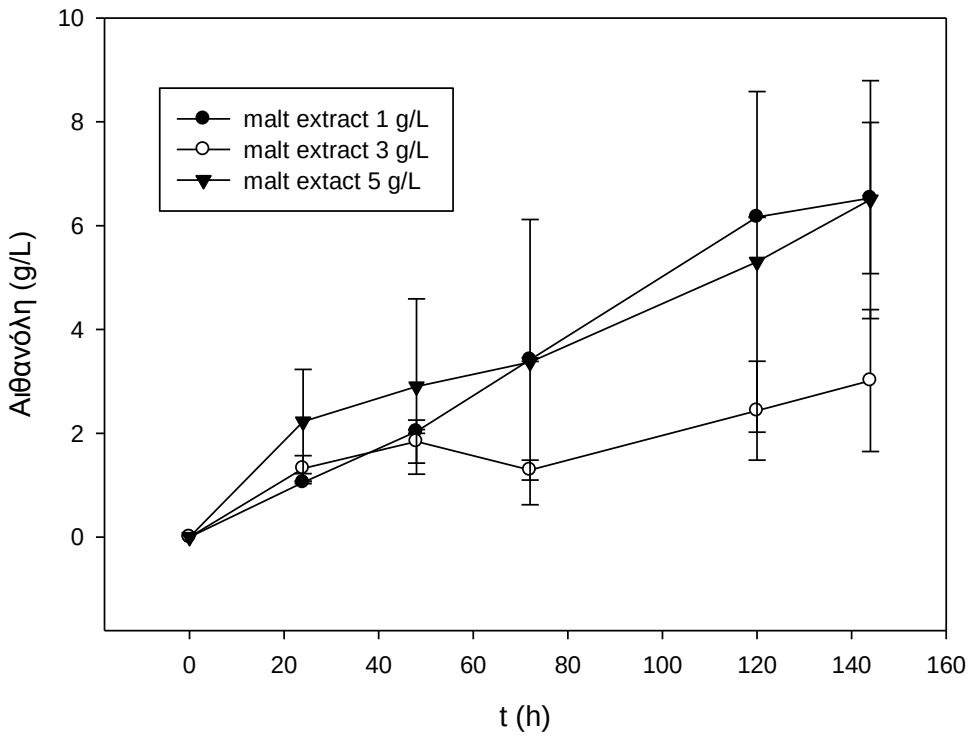
Οι συγκεντρώσεις των 5 g/L και 20 g/L οδήγησαν σε σχεδόν ίδιο τελικό αποτέλεσμα. Ωστόσο η προσθήκη 5 g/L κρίνεται ως καλύτερη αφενός επειδή οδηγεί σε γρηγορότερη αύξηση της παραγωγής αιθανόλης κατά τις πρώτες 3 μέρες και αφετέρου επειδή σε τέτοιες περιπτώσεις θεωρείται ευνοϊκότερη για οικονομικούς λόγους η προσθήκη της μικρότερης δυνατής συγκέντρωσης.

Ως βέλτιστη κρίνεται η προσθήκη $(NH_4)_2HPO_4$ συγκέντρωσης 10 g/L καθώς από τη καμπύλη φαίνεται ότι η προσθήκη αυτής της ένωσης στη συγκέντρωση αυτή οδήγησε σε μεγαλύτερη παραγωγή αιθανόλης (4.8 g/L) σε όλες τις μέρες. Η επιλογή αυτής της συγκέντρωσης

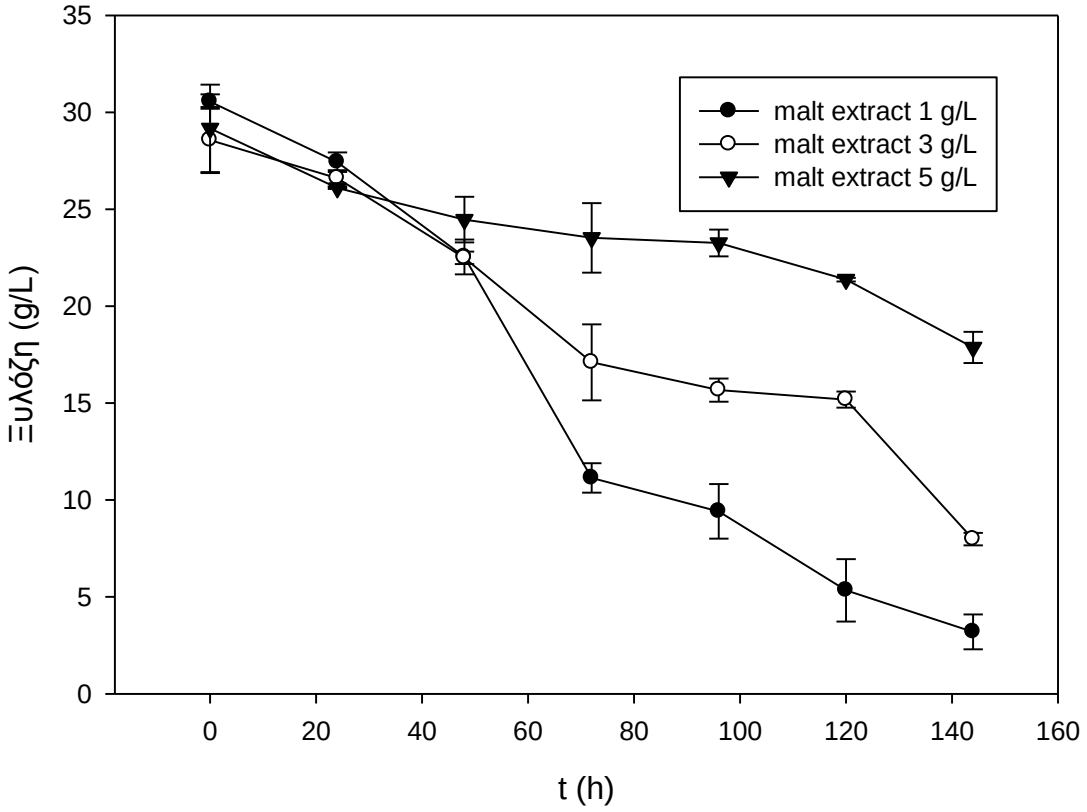
επιβεβαιώνεται και από τη χρησιμοποίησή της σε άλλες έρευνες [Lei Zhao et al. 2008, Ανασοντζής 2010, Christakopoulos et al., 1995].

Τα αποτελέσματα αυτής της σειράς πειραμάτων που βρέθηκαν θεωρούνται συγκρίσιμα με αυτά που πήραμε παραπάνω για ξυλόζη 20 g/L με τα βασικά άλατα (4.3 g/L) και επομένως συμπεραίνουμε ότι η προσθήκη περαιτέρω ποσότητας $(NH_4)_2HPO_4$ δεν επιδρά στη βελτίωση της παραγωγής αιθανόλης.

2.2.2 Επίδραση Malt extract κατά τη ζύμωση



Διάγραμμα 6: Παραγωγή αιθανόλης κατά τη ζύμωση του μύκητα σε σχέση με το χρόνο ανάλογα με τη συγκέντρωση malt extract που περιεχόταν στην καλλιέργεια.

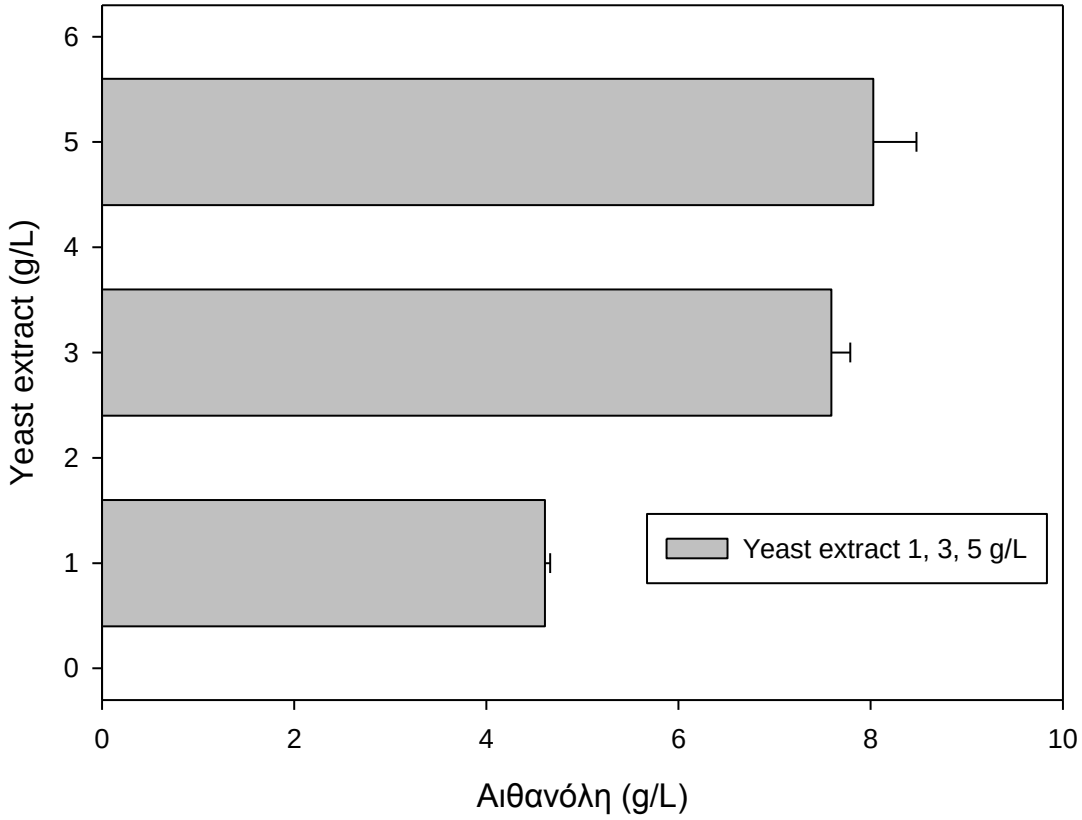


Διάγραμμα 7: Κατανάλωση ξυλόζης κατά τη ζύμωση του μύκητα σε σχέση με το χρόνο ανάλογα με τη συγκέντρωση malt extract που περιεχόταν στην καλλιέργεια.

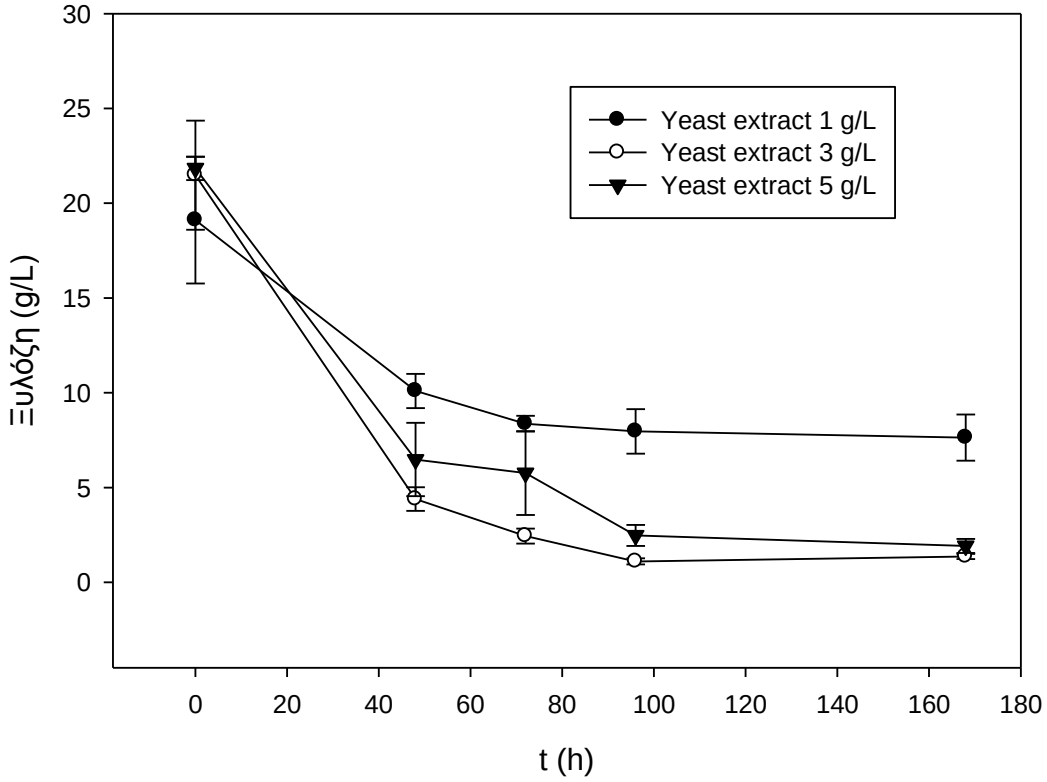
Από το παραπάνω διάγραμμα παρατηρούμε ότι η προσθήκη malt extract 1 g/L και 5 g/L βελτιώνει πολύ την παραγωγή αιθανόλης καθώς οι καμπύλες τους σχεδόν ταυτίζονται ενώ εμφανίζουν ίδια τελική παραγωγή αιθανόλης (περίπου 6.5 g/L) μετά από 6 μέρες. Από τις δύο ιδανικότερη όμως εκτιμάται η προσθήκη συγκέντρωσης 1 g/L δεδομένου ότι οδηγεί σε αυξημένη παραγωγή αιθανόλης κατά τη $5^{η}$ μέρα ενώ θεωρείται και ευνοϊκότερο για οικονομικούς λόγους η προσθήκη όσο το δυνατόν μικρότερης ποσότητας. Τέλος παρατηρούμε από τα αποτελέσματα ότι βελτιώθηκε περισσότερο η παραγωγή αιθανόλης σε σχέση με αυτά της ζύμωσης υπό την επίδραση του $(NH_4)_2HPO_4$.

Η προσθήκη malt extract και η επίδραση του στη ζύμωση εξετάστηκε με βάση παλαιότερες έρευνες που έγιναν σε μύκητα και χρησιμοποιήθηκε ως μέσο ανάπτυξης [Okamoto et al. 2012].

2.2.3 Επίδραση εκχυλίσματος ζύμης κατά τη ζύμωση



Διάγραμμα 8: Κατανάλωση ξυλόζης κατά τη ζύμωση του μύκητα ανάλογα με τη συγκέντρωση εκχυλίσματος ζύμης που περιεχόταν στην καλλιέργεια.



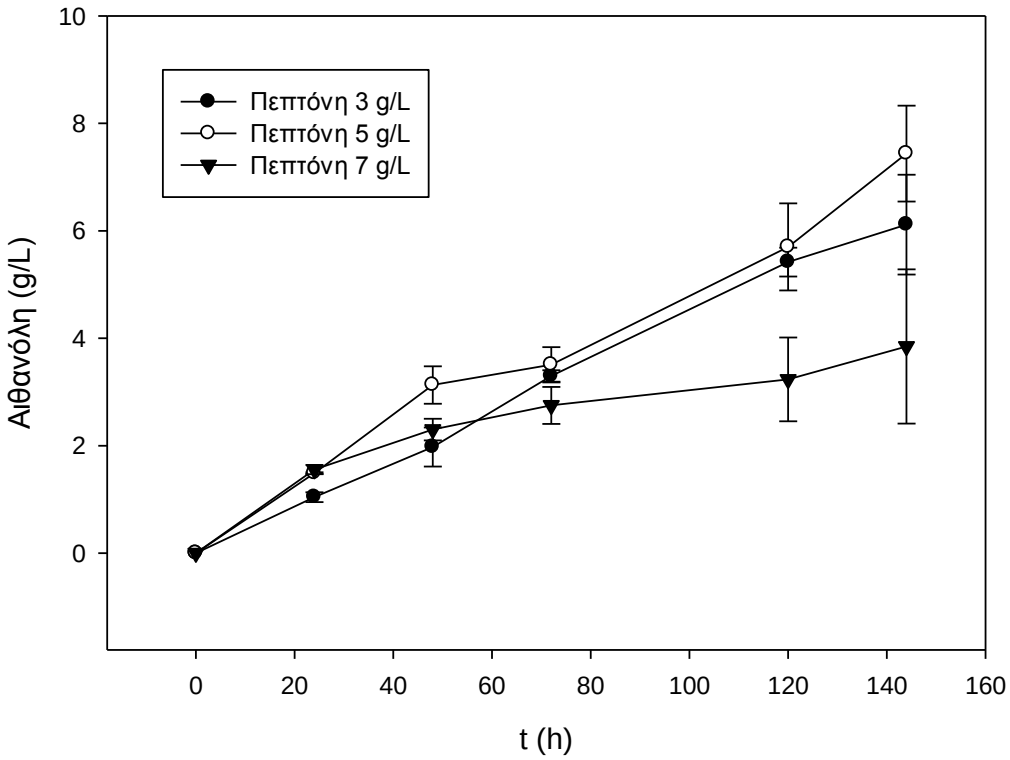
Διάγραμμα 9. Κατανάλωση ξυλόζης κατά τη ζύμωση του μύκητα σε σχέση με το χρόνο ανάλογα με τη συγκέντρωση εκχυλίσματος ζύμης που περιεχόταν στην καλλιέργεια.

Από το διάγραμμα 8 φαίνεται ότι η προσθήκη εκχυλίσματος ζύμης 3 και 5 g/L βελτιώνει σημαντικά την τελική παραγωγή αιθανόλης σε σχέση με τη συγκέντρωση 1 g/L. Τα αποτελέσματα αυτά επιβεβαιώνονται και από το διάγραμμα κατανάλωσης της ξυλόζης όπου για τις συγκεντρώσεις 3 και 5 g/L καταναλώνεται σε όλες τις μέρες μεγαλύτερη ποσότητα ξυλόζης. Ως βέλτιστη κρίνεται η προσθήκη 5 g/L καθώς οδηγεί σε τελική παραγωγή αιθανόλης 8 g/L έναντι 7.6 g/L των 3 g/L.

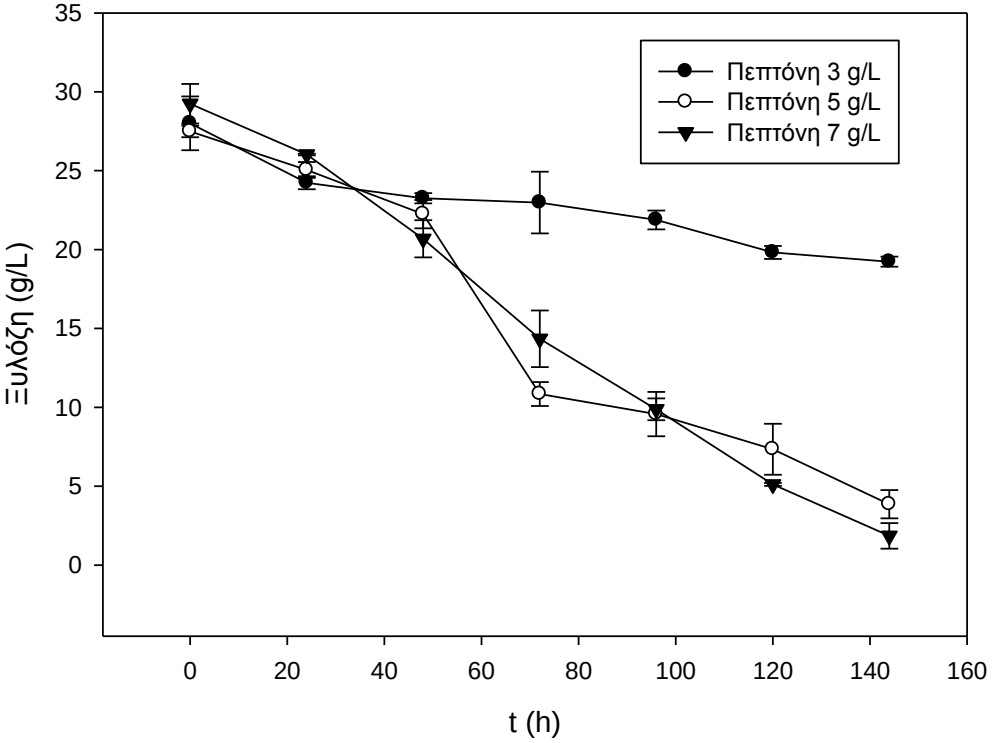
Αντίστοιχα σε παλαιότερες έρευνες που εξετάσθηκε η βελτίωση της παραγωγής αιθανόλης χρησιμοποιήθηκαν 6 g/L εκχυλίσματος ζύμης [Jin et al. 1980] , ενώ σε πιο πρόσφατες έρευνες που διεξάχθηκαν χρησιμοποιήθηκαν 20 g/L εκχυλίσματος ζύμης για τη φάση της ανάπτυξης του μικροοργανισμού και 2 g/L για τη φάση της ζύμωσης [Zhao et al. 2008].

Τα αποτελέσματα αυτά είναι καλύτερα από τα αντίστοιχα των παραπάνω πειραμάτων για μεταβλητά malt extract και $(NH_4)_2HPO_4$. Επομένως συμπεραίνουμε ότι είναι ιδιαίτερα σημαντική η συμβολή του εκχυλίσματος ζύμης για τη βελτίωση της ζύμωσης.

2.2.4 Επίδραση πεπτόνης κατά τη ζύμωση



Διάγραμμα 10: Παραγωγή αιθανόλης κατά τη ζύμωση του μύκητα σε σχέση με το χρόνο ανάλογα με τη συγκέντρωση πεπτόνης που περιεχόταν στην καλλιέργεια.



Διάγραμμα 11: Κατανάλωση ξυλόζης κατά τη ζύμωση του μύκητα σε σχέση με το χρόνο ανάλογα με τη συγκέντρωση πεπτόνης που περιεχόταν στην καλλιέργεια.

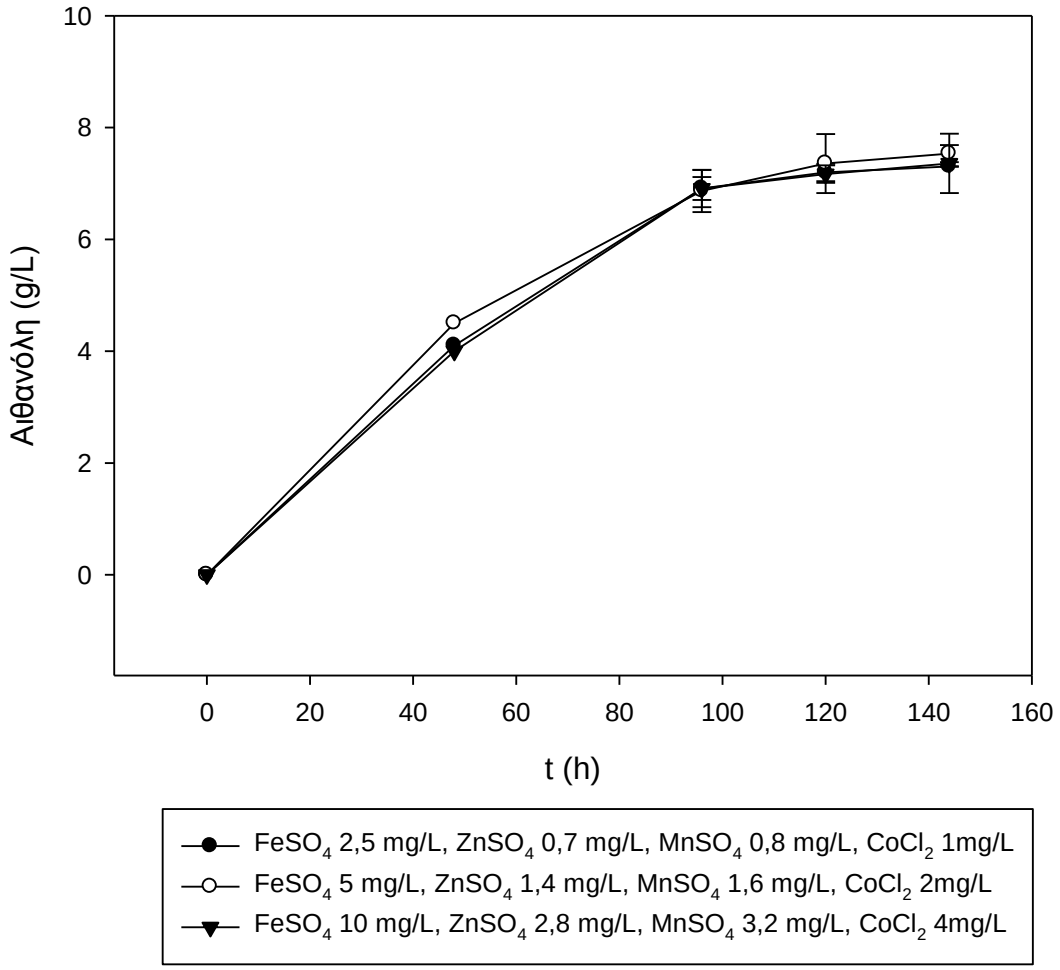
Από το παραπάνω διάγραμμα παρατηρούμε ότι η προσθήκη πεπτόνης 3 g/L και 5 g/L βελτιώνει πολύ την παραγωγή αιθανόλης. Όπως φαίνεται και από το διάγραμμα κατανάλωσης ξυλόζης η προσθήκη πεπτόνης σε αυτές τις συγκεντρώσεις οδήγησε σε αυξημένη κατανάλωση υποστρώματος.

Από τις δύο ιδανικότερη εκτιμήθηκε η προσθήκη συγκέντρωσης 5 g/L δεδομένου ότι η τελική παραγωγή αιθανόλης βρέθηκε 7.44 g/L. Η συγκέντρωση αυτή έχει χρησιμοποιηθεί και σε παλαιότερες έρευνες για ζυμώσεις σε ζυμομύκητες [Badawi et al. 2012].

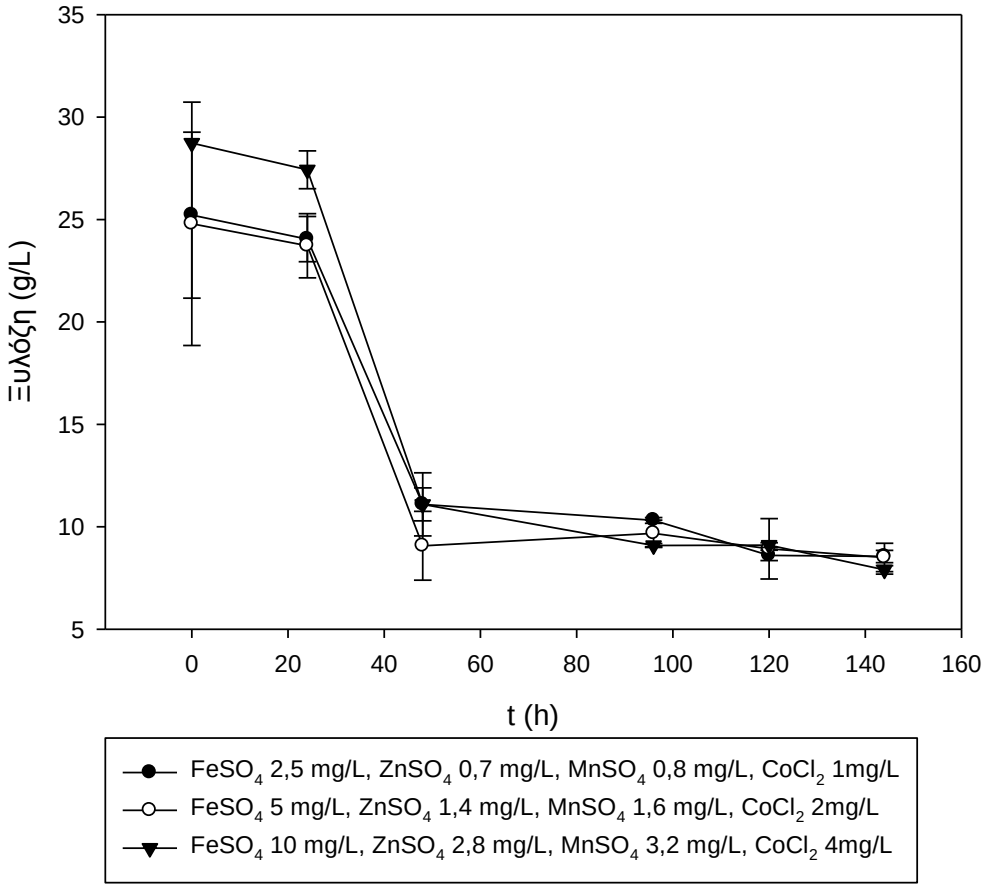
Επομένως καταλήγουμε στο συμπέρασμα ότι η προσθήκη πεπτόνης ευνοεί την παραγωγή αιθανόλης με αποτελέσματα συγκρίσιμα με αυτά του εκχυλίσματος ζύμης.

2.3 Μελέτη ζύμωσης του μύκητα *F. oxysporum* υπό την επίδραση μεταλλικών ενώσεων

2.3.1 Επίδραση ιχνοστοιχείων κατά τη ζύμωση



Διάγραμμα 12: Παραγωγή αιθανόλης κατά τη ζύμωση του μύκητα σε σχέση με το χρόνο ανάλογα με τη συγκέντρωση των ιχνοστοιχείων που περιέχονταν στην καλλιέργεια.



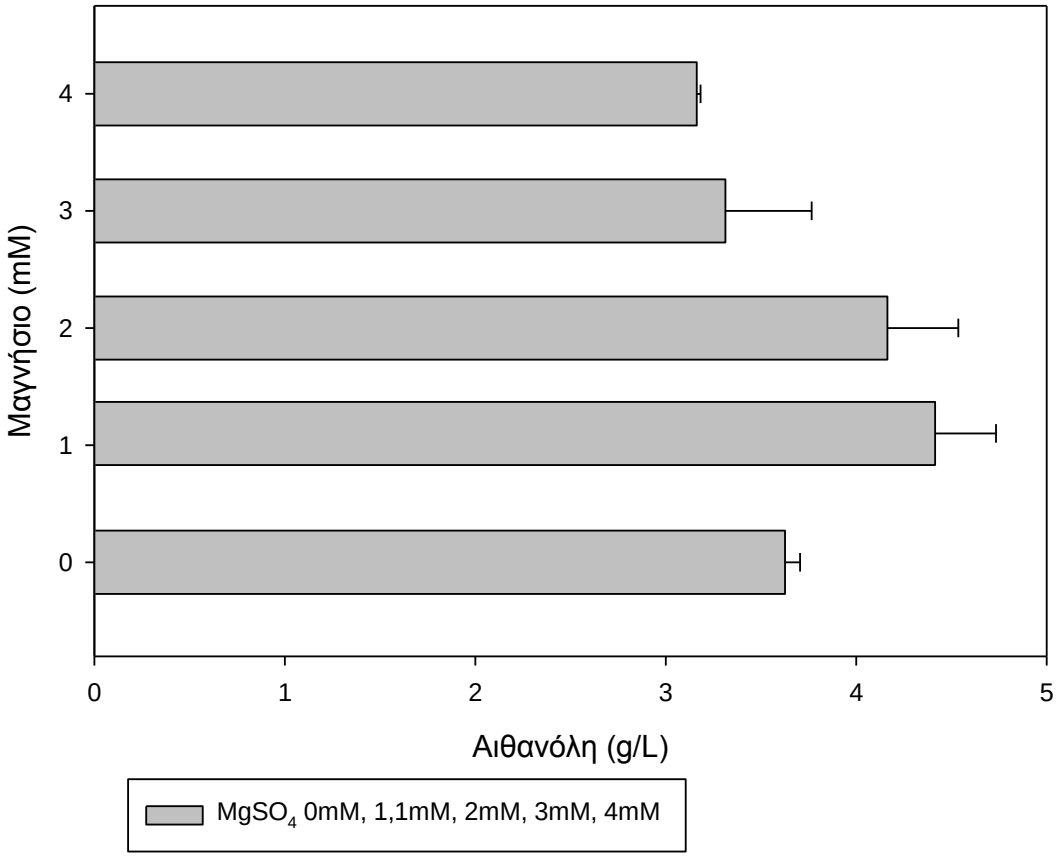
Διάγραμμα 13: Κατανάλωση ξυλόζης κατά τη ζύμωση του μύκητα σε σχέση με το χρόνο ανάλογα με τη συγκέντρωση των ιχνοστοιχείων που περιέχονταν στην καλλιέργεια.

Από το παραπάνω διάγραμμα παρατηρούμε ότι η προσθήκη ιχνοστοιχείων επιδρά σημαντικά τόσο στη βελτίωση της απόδοσης σε αιθανόλη, όσο και στην αύξηση του ρυθμού παραγωγής. Όλες οι συγκεντρώσεις ιχνοστοιχείων οδήγησαν σε όμοια αποτελέσματα καθώς παρατηρήθηκε αντίστοιχη παραγωγή αιθανόλης και για τις τρεις διαφορετικές συγκεντρώσεις ιχνοστοιχείων που χρησιμοποιήθηκαν. Αυτό επαληθεύεται και από το διάγραμμα κατανάλωσης της ξυλόζης όπου οι καμπύλες ταυτίζονται μετά τη δεύτερη μέρα.

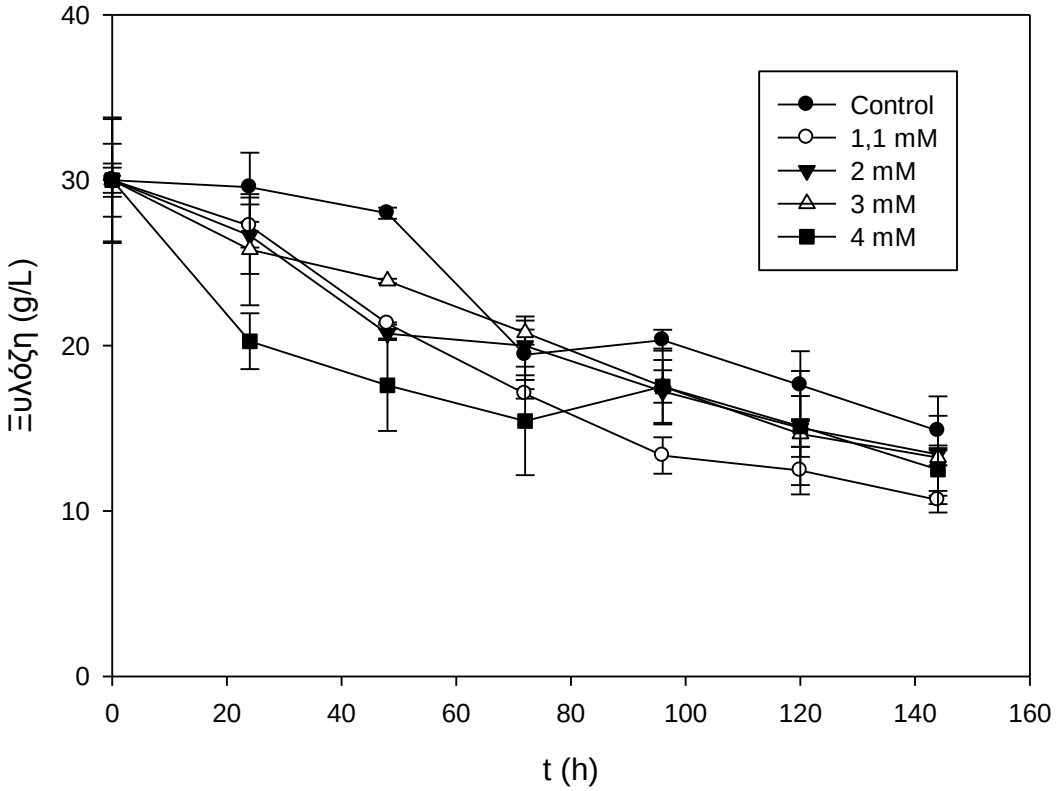
Ελάχιστα καλύτερα αποτελέσματα πήραμε για τις παρακάτω συγκεντρώσεις ιχνοστοιχείων: $FeSO_4$ 5 mg/L, $ZnSO_4$ 1.4 mg/L, $MnSO_4$ 1.6 mg/L, $CoCl_2$ 2mg/L όπου η παραγωγή αιθανόλης έφτασε μέχρι 7.5 g/L.

Τα παραπάνω ιχνοστοιχεία χρησιμοποιήθηκαν σε παλαιότερες έρευνες σε διαφορετικές συγκεντρώσεις με σκοπό τη βελτίωση της παραγωγής αιθανόλης κατά τη ζύμωση [Maddipati et al. 2011] και τη μείωση της λανθάνουσας φάσης κατά τη ζύμωση γλυκόζης [Soto-Cruz et al. 2002].

2.3.2 Επίδραση ιόντων μαγνησίου κατά τη ζύμωση



Διάγραμμα 14: Παραγωγή αιθανόλης κατά τη ζύμωση του μύκητα ανάλογα με τη συγκέντρωση μαγνησίου που περιεχόταν στην καλλιέργεια.

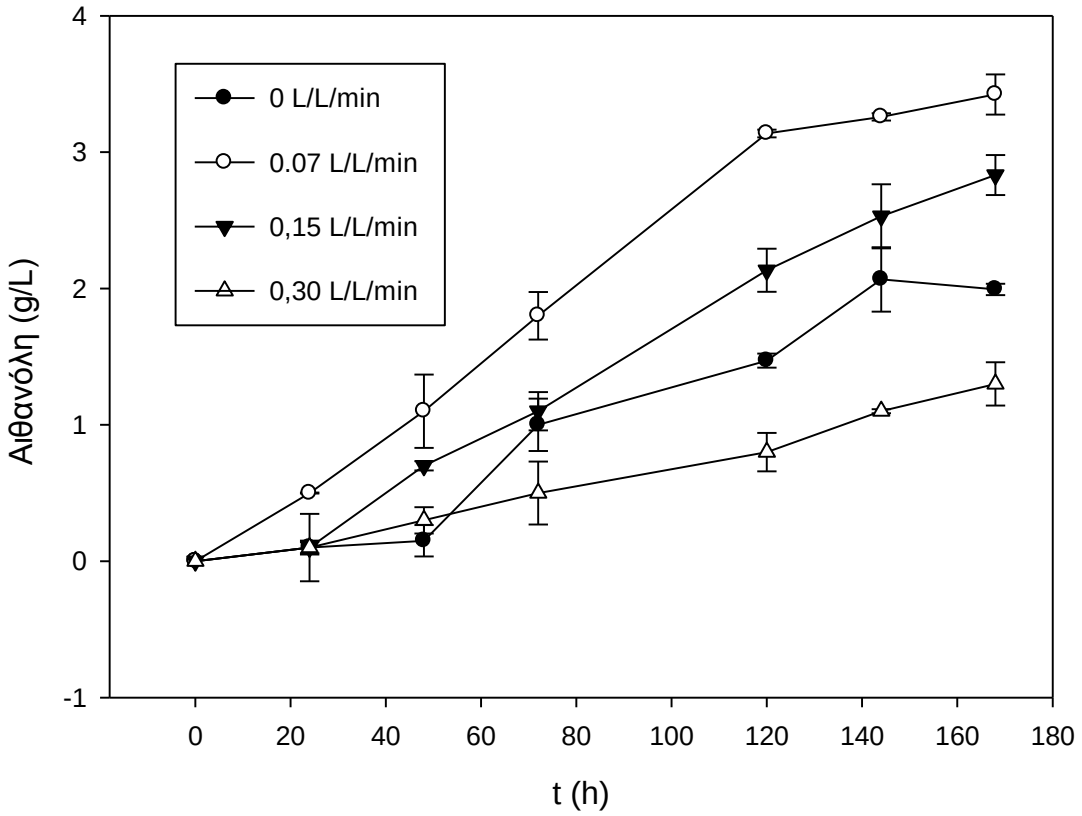


Διάγραμμα 15: Κατανάλωση ξυλόζης κατά τη ζύμωση του μύκητα σε σχέση με το χρόνο ανάλογα με τη συγκέντρωση μαγνησίου που περιεχόταν στην καλλιέργεια.

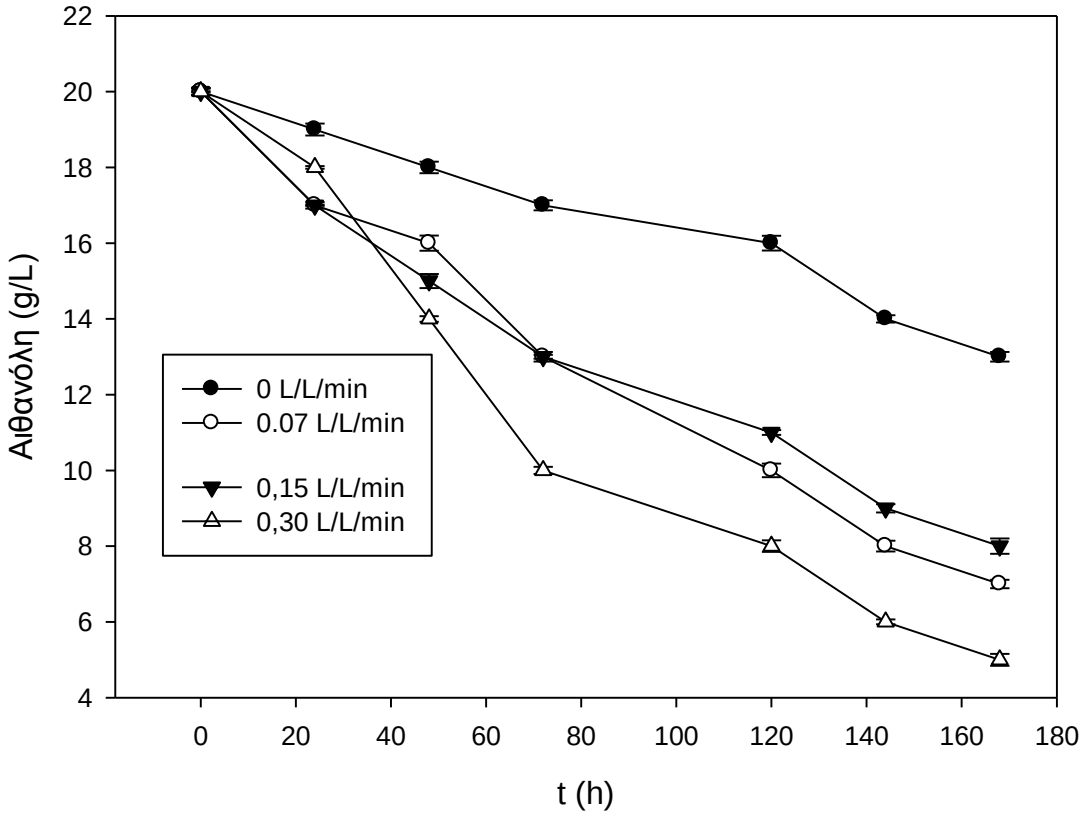
Από τα παραπάνω διαγράμματα παρατηρούμε ότι τα ιόντα μαγνησίου επηρεάζουν την απόδοση του μικροοργανισμού καθώς η προσθήκη 1.1 mM και 2 mM βελτιώνει τη παραγωγή αιθανόλης σε σχέση με το δείγμα control που δεν περιείχε μαγνήσιο ενώ περαιτέρω προσθήκη ιόντων μαγνησίου οδηγεί σε μειωμένη τελική παραγωγή αιθανόλης. Από τα αποτελέσματα τελικής παραγωγής αιθανόλης κρίνεται ως ιδανική η προσθήκη 1.1 mM καθώς οδηγεί σε παραγωγή 4.41 g/L αιθανόλης.

Τα ιόντα μαγνησίου προστέθηκαν και σε παλαιότερες έρευνες με σκοπό τη βελτίωση της αντοχής του αιθανολοπαραγωγού μικροοργανισμού στην αναστολή λόγω αιθανόλης [Hu et al. 2003].

2.4 Μελέτη ζύμωσης του μύκητα *F. oxysporum* υπό διαφορετικές συνθήκες παροχής αέρα



Διάγραμμα 16: Παραγωγή αιθανόλης κατά τη ζύμωση του μύκητα σε σχέση με το χρόνο ανάλογα με τη παροχή αέρα όπου οι μονάδες αντιστοιχούν σε λίτρα αέρα που παρέχονται όγκο αντιδραστήρα ανά λεπτό.



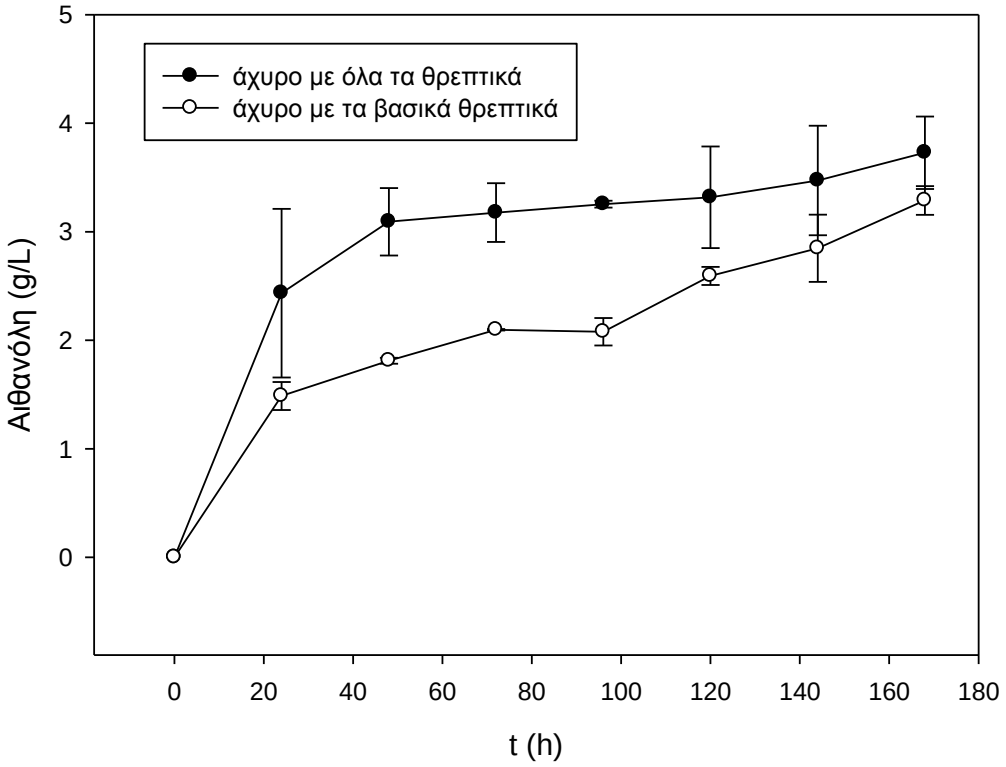
Διάγραμμα 17: Κατανάλωση ξυλόζης κατά τη ζύμωση του μύκητα σε σχέση με το χρόνο ανάλογα με τη παροχή αέρα όπου οι μονάδες αντιστοιχούν σε λίτρα αέρα που παρέχονται όγκο αντιδραστήρα ανά λεπτό.

Από τα παραπάνω διαγράμματα παρατηρούμε ότι η βέλτιστη παραγωγή αιθανόλης επιτυγχάνεται υπό τη παροχή 0.07 L/L/min του αέρα που αντιστοιχεί ουσιαστικά σε μικροαερόβια διαδικασία. Αντιθέτως φαίνεται από τα αποτελέσματα ότι όσο αυξάνεται μετέπειτα η παροχή του αέρα μειώνεται η παραγωγή αιθανόλης αλλά αυξάνεται η κατανάλωση ξυλόζης. Αυτό οφείλεται στο γεγονός ότι ο αέρας ευνοεί την ανάπτυξη των κυττάρων. Ειδικά για παροχή 0.3 L/L/min παρατηρείται ελάχιστη παραγωγή αιθανόλης κάτι το οποίο αποδίδεται στην προσέγγιση των αερόβιων συνθηκών η οποία ευνοεί την ανάπτυξη των κυττάρων χωρίς να παράγει αιθανόλη.

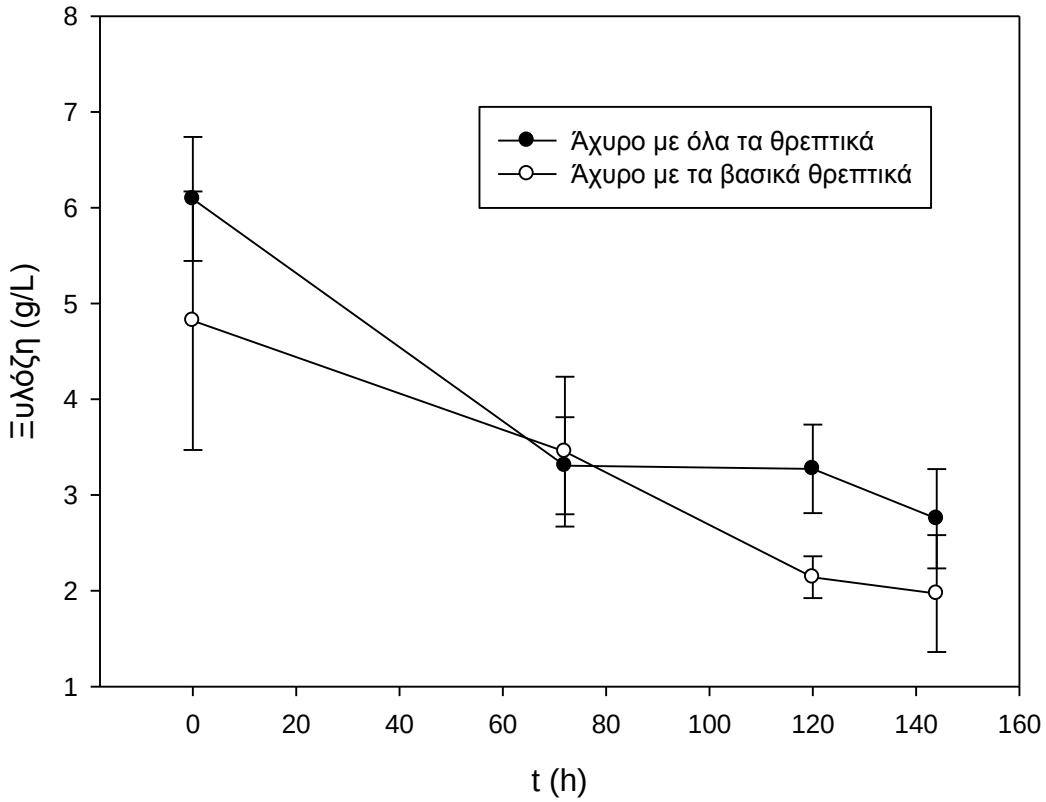
Η επίδραση της παροχής του αέρα και η επιβολή μικροαερόβιων συνθηκών έχει υπάρξει αντικείμενο μελέτης και σε παλαιότερες έρευνες [Pang et al. 2011, Nigam et al. 1985, Panagiotou et al. 2001].

Τα αποτελέσματα μας στη προκειμένη περίπτωση επιβεβαιώνουν παλιότερες έρευνες όπου αποδείχτηκε η αυξημένη παραγωγή αιθανόλης για παροχή αέρα 0.18 L/L/min σε σχέση με τη πλήρως αναερόβια ζύμωση [Panagiotou et al. 2001].

2.5 Μελέτη ζύμωσης του μύκητα *F. oxysporum* σε προεπεξεργασμένο άχυρο



Διάγραμμα 18: Παραγωγή αιθανόλης κατά τη ζύμωση του μύκητα σε σχέση με το χρόνο ανάλογα με τα θρεπτικά που χρησιμοποιήθηκαν σε άχυρο.



Διάγραμμα 19: Κατανάλωση ξυλόζης κατά τη ζύμωση του μύκητα σε σχέση με το χρόνο ανάλογα με τα θρεπτικά που χρησιμοποιήθηκαν σε άχυρο.

Από το παραπάνω διάγραμμα παρατηρούμε ότι η παραγωγή αιθανόλης σε άχυρο δίνει χειρότερα αποτελέσματα (3.73 και 3.3 g/L) από τη ξυλόζη των 20 g/L (4.32 g/L). Αυτό ενδεχομένως οφείλεται στη χαμηλή περιεκτικότητα του άχυρου που χρησιμοποιήθηκε σε σάκχαρα.

Η προσθήκη όλων των θρεπτικών (εκχύλισμα ζύμης, πεπτόνη, malt extract και ιχνοστοιχείων) εκτιμάται ως επιθυμητή καθώς οδήγησε σε αυξημένο ρυθμό παραγωγής κατά τις πρώτες 3 μέρες και σε αυξημένη τελική παραγωγή αιθανόλης.

3. Συμπεράσματα – Προτάσεις

Συνοψίζοντας, στην παρούσα διπλωματική εργασία μελετήθηκε η επίδραση της προσθήκης αυξανόμενης ποσότητας ξυλόζης, αζωτούχων ενώσεων και ιχνοστοιχείων στην ανάπτυξη και στην παραγωγή αιθανόλης του μύκητα *F. oxysporum* σε υγρές καλλιέργειες. Επιπλέον μελετήθηκε η επίδραση της παροχής αέρα κατά τη διαδικασία της ζύμωσης καθώς και η ζύμωση προεπεξεργασμένου άχυρου ως εναλλακτικό υπόστρωμα.

Από την μελέτη της επίδρασης προσθήκης αντιδρώντων στην αερόβια και αναερόβια ανάπτυξη προκύπτουν τα παρακάτω συμπεράσματα:

- Η ποσότητα υποστρώματος επηρεάζει σημαντικά την απόδοση της ζύμωσης και η συγκέντρωση ξυλόζης 20g/L εκτιμήθηκε ως βέλτιστη με βάση τη παραγόμενη αιθανόλη και την απόδοση της ζύμωσης.
- Ο μικροοργανισμός τόσο για την ανάπτυξη του όσο και για τη ζύμωση χρειάζεται μια πηγή αζώτου. Για το λόγο αυτό πραγματοποιήθηκαν 4 σειρές πειραμάτων όπου εξετάστηκε η επίδραση της προσθήκης $(NH_4)_2HPO_4$, malt extract, εκχυλίσματος ζύμης και πεπτόνης. Οι βέλτιστες συνθήκες που βρέθηκαν είναι 10 g/L $(NH_4)_2HPO_4$, 1 g/L malt extract, 5 g/L εκχυλίσματος ζύμης και 5g/L πεπτόνης.
- Η συμβολή των ιχνοστοιχείων $FeSO_4$, $ZnSO_4$, $MnSO_4$ και $CoCl_2$ στη διαδικασία της ζύμωσης είναι ιδιαίτερης σημασίας καθώς και οι τρεις διαφορετικές συγκεντρώσεις που χρησιμοποιήθηκαν με τα παραπάνω ιχνοστοιχεία βελτιώνουν την παραγωγή αιθανόλης περίπου κατά 40%. Από τις τρεις αυτές συγκεντρώσεις ως βέλτιστη εκτιμήθηκε η προσθήκη 5 mg/L $FeSO_4$, 1.4mg/L $ZnSO_4$, 1.6 mg/L $MnSO_4$ και 2mg/L $CoCl_2$. Επιπλέον βρέθηκε ότι η προσθήκη συγκέντρωσης μαγνησίου 1.1mM ευνοεί την παραγωγή αιθανόλης κατά τη διαδικασία της ζύμωσης ενώ η προσθήκη περαιτέρω συγκέντρωσης μαγνησίου στην καλλιέργεια παρεμποδίζει τη ζύμωση και μειώνει σημαντικά την παραγωγή αιθανόλης.

Από την μελέτη της επίδρασης του οξυγόνου κατά τη ζύμωση εξάγεται το συμπέρασμα ότι η ύπαρξη μικροαερόβιων συνθηκών (0.07 L/L/min) ευνοεί την ανάπτυξη του μύκητα και παράλληλα βελτιώνει την παραγωγή αιθανόλης. Ωστόσο περαιτέρω αύξηση της παροχής του αέρα είναι ανεπιθύμητη καθώς κάτι τέτοιο βελτιώνει την κυτταρική ανάπτυξη αλλά παρεμποδίζει την διαδικασία της ζύμωσης που είναι αναερόβια.

Από την μελέτη της επίδρασης του προεπεξεργασμένου άχυρου στη ζύμωση ως εναλλακτικό υπόστρωμα προέκυψαν χειρότερα αποτελέσματα παραγωγής αιθανόλης από ότι με την προσθήκη ξυλόζης λόγω της χαμηλής περιεκτικότητας του άχυρου σε μονομερή σάκχαρα.
Ταυτόχρονα όμως έγινε εμφανές πως η προσθήκη ενός διαλύματος αλάτων πλούσιου σε άζωτο και μεταλλικά ιόντα αυξάνει την παραγωγή αιθανόλης από λιγνινοκυτταρινούχο υπόστρωμα.
Επιπλέον βρέθηκε ότι η προσθήκη των θρεπτικών 3 g/L εκχυλίσματος ζύμης, 5 g/L πεπτόνης, 3 g/L malt extract και των ιχνοστοιχείων 5 mg/L $FeSO_4$, 1.4mg/L $ZnSO_4$, 1.6 mg/L $MnSO_4$ και 2mg/L $CoCl_2$ ευνοεί περισσότερο την αναερόβια ζύμωση από ότι η προσθήκη 10 g/L $(NH_4)_2HPO_4$.

Επομένως λαμβάνοντας υπόψη τα παραπάνω συμπεράσματα καταλήγουμε ότι η καλλιέργεια που οδηγεί σε βέλτιστη παραγωγή αιθανόλης θα πρέπει να διεξάγεται σε μικροαερόβιες συνθήκες (0.07 L/L/min) περιέχει 20g/L ξυλόζης, τα θρεπτικά1 g/L malt extract, 5 g/L εκχυλίσματος ζύμης και 5g/L πεπτόνης καθώς και 5 mg/L $FeSO_4$, 1.4mg/L $ZnSO_4$, 1.6 mg/L $MnSO_4$ και 2mg/L $CoCl_2$.

Επιπλέον ως λύση για βελτίωση της παραγωγής αιθανόλης θα μπορούσαμε να προτείνουμε την προσθήκη προστατευτικών ενώσεων κατά την ανάπτυξη των κυττάρων. Οι ενώσεις αυτές καθιστούν δυνατή τη βελτίωση της ανθεκτικότητας του μικροοργανισμού στην παραγόμενη αιθανόλη η οποία ενδεχομένως να παρεμποδίζει την περαιτέρω ζύμωση του υποστρώματος.

ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

Aguilera, F., Peinado, R.A., Millán, C., Ortega, J.M., Mauricio, J.C., 2006, Relationship between Ethanol Tolerance, H+-ATPase Activity and the lipid Composition of the Plasma Membrane in different Wine Yeast Strains, International Journal of Food Microbiology 110 (2006), 34–42.

Akpa, U., G., Kovo, A., S., Abdulahhi, M., Ijah, J.,J., 2005, The Production of Ethanol from Maize Cobs and Groundnut Shells, Australian Journal of Technology, 9(2), 106-110.

Alberts B., Bray D., Hopkin K., Johnson A., Lewis J., Raff M., Roberts K., Walter P., 2003, Essential Cell Biology, Second Edition, Ιατρικές Εκδόσεις Π.Χ. Πασχαλίδης.

Alper, H., Moxley, J., Nevoigt, E., Fink, G.R., Stephanopoulos, G., 2006, Engineering Yeast Transcription Machinery for Improved Ethanol Tolerance and Production, Science, Vol. 314, (2006).

Armbruster, W., Coyle, W., Transportation Infrastructure and the Asia-Pacific Food System, Australian Agricultural and Resource Economics Society 2005 Conference (49th), February 9-11, Coff's Harbour, Australia.

Badawi, A.M., Fahmy, A.A., Mohamed, K.A., Noor El- Din, Riad, M.G., 2012, Enhancement of Ethanol Production by simultaneous Saccharification and Fermentation (SSF) of Rice Straw using Ethoxylated Span 20, Preparative Biochemistry Biotechnology, 42:1, 44-59.

Balat, M., 2005, Current Alternative Engine Fuels, Energy Sources, 27:6, 569-577.

Bandara, A, Fraser, S., Chambers, P., J., Grant A. Stanley, 2009, Trehalose promotes the Survival of *Saccharomyces cerevisiae* during lethal Ethanol Stress, but does not influence Growth under sublethal Ethanol Stress, 2009 Federation of European Microbiological Societies.

Bernstein, P., Montgomery, D., Sugandha, D., Tuladhar, S., 2007, Potential for reducing Carbon Emissions from non-Annex B Countries through Changes in Technology, Energy Economics 28, 742- 762.

Chaganti, S.,R., Kim, D.-H., Lalman, A., Shewa, W., A., 2012, Statistical Optimization of Factors affecting Biohydrogen Production from Xylose Fermentation using inhibited mixed anaerobic Cultures, International Journal of Hydrogen Energy 37, 2012, 11710-11718.

Christakopoulos, P., Macris, B.J., Kekos, D., 1989, Direct Fermentation of Cellulose to Ethanol by *Fusarium oxysporum*, Enzym Microb. Technol. 1989, vol. 11.

Chunkeng, H., Qing, Q., Peipei, G, 2011, Medium Optimization for Improved Ethanol Production in Very High Gravity Fermentation, Biotechnology and Bioengineering Chinese Journal of Chemical Engineering, 19(6), 1017-1022 (2011).

Conde-Mejva C., Jimınez-Gutiırrez, A., El-Halwagi, M., A Comparison of Pretreatment Methods for Bioethanol Production from Lignocellulosic Materials, Process Safety and Environmental Protection 90 (2012), 189-202.

Ding, J., Huang, X., Zhang, L., Zhao, N., Yang, D., Zhang, K., 2009, Tolerance and Stress Response to Ethanol in the Yeast *Saccharomyces cerevisiae*, Appl Microbiol Biotechnol (2009) 85:253–263.

Dunn-Coleman, N.,S., Pateman, J.,A., 1979, The Regulation of Hexokinase and Phosphoglucomutase Activity in Aspergillus Nidulans, Molec Gen Genet. 171, 69-73.

Escobar, J.C., Lora, E.S., Venturini, O., J., Yanez, Castillo, E. F., 2009, Biofuels: Environment, Technology and Food Security, Renewable and Sustainable Energy Reviews 13 (2009), 1275-1287.

Fulton, E., A., Anthony D.M. Smith, A., Johnson, C., 2004, Biogeochemical marine ecosystem Models I: IGBEM—a Model of marine Bay Ecosystems, Ecological Modelling 174 (2004), 267-307.

Gabler, F. M., Mansour M.F., Smilanick J.L. and Mackey B.E., 2004, Survival of Sporus of Rhizopus Stolonifer Aspergillus Niger, Botrytis Cinerea and Alternaria Alternata after Exposure to Ethanol Solutions at various Temperatures, Journal of Microbiology 2004, 94, 1354-1360.

Garrote, G., Dominguez, H., Parajo, J.,C., Hydrothermal Processing of lignocellulosic Materials, Holz als Roh- und Verkstoff 57 (1999), 191-202.

Gnansounou, E., Dauriat, A. 2010, Techno-economic Analysis of Lignocellulosic Ethanol: A Review, Bioresource Technology, 101 4980–4991.

Goldemberg, J., 2006, The Promise of clean Energy, Energy Policy 34 (2006), 2185-2190.

Goldemberg, J., Johansson, T., Reddy, A., Williams, R., 2004, A global clean Cooking Fuel Initiative, Energy for Sustainable Development, Volume 8, No. 3.

Hahn-Hagerdal, B., Galbe, M., Gorwa-Grauslund, M.F., Liden G., Zacchi, G. ,2006, Bio-ethanol – the Fuel of tomorrow from the Residues of Today, Trends in Biotechnology, Vol.24, No.12.

Hallsworth, J.E, 1998, Ethanol-Induced Water Stress in Yeast, Journal of Fermetation and Bioengineering, Vol. 85, No. 2 pp. 125-137.

Heipieper, H. J., Sonja Isken, S., Saliola, M, 2000, Ethanol Tolerance and Membrane fatty Acid Adaptation in adh multiple and null Mutants of Kluyveromyces Lactis, Res. Microbiol. 151 (2000) 777–784.

Hu, C., Bai, F.& An L., 2003, Enhancing Ethanol Tolerance of a Self flocculating Fusant of *Schizosaccharomyces Pombe* and *Saccharomyces cerevisiae* by Mg2+ via Reduction in Pasma Membrane Permeability, *Biotechnology Letters* 25**:** 1191–1194.

James, G., 2008, Beyond Biofuel, New Scientist, Vol. 197, Issue 2642, 24.

Jin, C., K., Chiang, H., L., Wang, S.,S., 1980, Steady State Analysis of the Enhancement in Ethanol Productivity of a Continuous Fermentation Process employing a Protein Phospholipid Complex as a protecting Agent, Department of Chemical and Biochemical Engineering, Rutgers, The State University of New Jersey, College of Engineering.

Kaparaju, P., Buendia, I., Ellegaard, L., Angelidaki, I., 2008, Effects of mixing on Methane Production during thermophilic anaerobic Digestion of Manure: Lab-scale and pilot-scale Studies, Bioresource Studies 99 (2008), 4919-4928.

Kaparaju, P., Serrano, M, Thomsen, A. B., Kongjan, P., Angelidaki, I., 2009, Bioethanol, Biohydrogen and Biogas Production from Wheat Straw in a Biorefinery Concept, Bioresource Technology, 100, 2562–2568.

Koh, L., P., Ghazoul, J., 2008, Biofuels, Biodiversity, and People: Understanding the Conflicts and finding Opportunities, Biological Conservation I 4 I (2008), 2450-2460.

Lakshmi, G., S., Rao, C., S., Rao, R., S., Hobbs, P., J., Prakasham, R., S., 2009, Enhanced Production of Xylanase by a newly isolated Aspergillus Terreus under solid State Fermentation using palm industrial Waste: A statistical Optimization, Biochemical Engineering Journal 48 (2009), 51-57.

Lee, T.-Y., Kim, M.-D., Kim, K.-Y., Park, K., Ryu, Y.-W., Seo, J.-H., 2000, A Parametric Study on Ethanol Production from Xylose by Pichia Stipitis, Biotechnol, Bioprocess, Eng. 2000, 5: 27-31.

Li, J., Huang, W., Wang, X., Tang, T., Hua, Z., Yan, G., 2010, Improvement of Alcoholic Fermentation by Calcium Ions under Enological Conditions involves the increment of Plasma Membrane H+-ATPase Activity, World J Microbiol Biotechnol (2010) 26, 1181-1186.

Luong, J.H.T., 1984, Kinetics of Ethanol Inhibition in Alcohol Fermentation, National Research Council of Canada, Montreal, Quebec, Canada.

Maclean, H., Lave, L., 2003, Life Cycle Assessment of Automobile/Fuel Options, Environ. Sci. Technol., 2003, 37, 5445- 5452.

Maddipati, P., Atiyeh, H. K., Bellmer, D. D., Huhnke, L. R., 2011, Ethanol Production from Syngas by Clostridium Strain P11 using corn steep Liquor as a nutrient Replacement to Yeast Extract, Bioresource Technology, 102, 6494–6501.

Matsushika, A., Sawayasama S., 2008, Efficient Bioethanol Production from Xylose by Recombinant *Saccharomyces cerevisiae* Requires High Activity of Xylose Reductase and Moderate Xylulokinase Activity, Journal of Bioscience and Bioengineering (2008), Vol. 106, No. 3, 306–309.

Meyrial, V., Delgenes J.P., Romieu C., Moletta, R., Gournot, A.M., 1995, Ethanol Tolerance and Activity of Plasma Membrane ATPase in Pichia *Stipitis* grown on D-xylose or on D-glucose. Enzyme and Microbial Technology 17:535-540.

Murphy, J.,D., McCarthy, K., 2005, Ethanol Production from Energy Crops and Wastes for Use as a Transport Fuel in Ireland, Applied Energy 82 (2005), 148-166.

Murray, D., 2005, Ethanol's Potential: Looking Beyond Corn, World Business Academy, Project Earthrise, Energy Task Force, Vol. 19, Issue 2.

Nigam, J. N. , Margaritis ,W. A. , Lachance, M.A. 1985, Aerobic Fermentation of D-Xylose to Ethanol by *Clavispora* sp., Applied and environmental Microbiology, Oct. 1985, p. 763-766.

Nigam, P., S., Singh, A., 2011, Production of Liquid Biofuels from Renewable Resources, Progress in Energy and Combustion Science 37 (2011), 52-68.

Novotny, C., Karst, F., 1994, Sterol Dependend Growth and Ethanol Tolerance of a Sterol-Auxotropic erg9:: HIS_3 Mutant of *Saccharomyces cerevisiae*, Biotechnology Letters, Vol. 16, No. 5, pp. 539-542.

Okamoto, K., Kanawaku, R., Masumoto, M., Yanase, Y., 2012, Efficient Xylose Fermentation by the brown rot Fungus *Neolentinus lepideus*, Enzyme and Microbial Technology 50 (2012), 96– 100.

Olofsson, K., Wiman, M., Liden, G., 2010, Controlled Feeding of Cellulases improves Conversion of Xylose in simultaneous Saccharification and Co-fermentation for Bioethanol Production, Journal of Biotechnology 145 (2010) 168–175.

Olsson, L., Hahn-Hagerdal, B., 1996, Fermentation of Lignocellulosic hydrolysates for Ethanol Production, Enzym and Microbial Technology 18:312-331.

Panagiotou, G., Christakopoulos, P., Olsson, L, 2005, The Influence of different Cultivation Conditions on the Metabolome of *Fusarium oxysporum*, Journal of Biotechnology 118:304-315.

Panagiotou, G., Christakopoulos, P., Olsson, L., 2005, Simultaneous Saccharification and Fermentation of Cellulose by *Fusarium oxysporum* F3-growth Characteristics and Metabolite Profiling, Enzyme and Microbial Technology 36:693-699.

Panagiotou, G., Christakopoulos, P., Villas-Boas, S.G., Olsson L., 2005, Fermentation Performance and intracellular Metabolite profiling of *Fusarium oxysporum* cultivated on a Glucose-Xylose Mixture, Enzyme and Microbial Technology 36:100-106.

Panagiotou, G., Kekos, D., Macris, B.J., Christakopoulos P. Production of cellulolytic and xylanolytic Enzymes by *Fusarium oxysporum* grown on corn Stover in solid State Fermentation, Industrial Crops and Products 18, 37-45, 2003.

Panagiotou, G., Villas-Boas, S.G., Christakopoulos P., Nielsen, J., Olsson L., 2005, Intracellular metabolite Profiling of *Fusarium oxysporum* converting Glucose to Ethanol, Journal of Biotechnology, 115: 425-434.

Panagiotou, G., Topakas, E., Moukouli, M., Christakopoulos, P., Olsson, L., 2011, Studying the ability of Fusarium *oxysporum* and recombinant *Saccharomyces cerevisiae* to efficiently cooperate in Decomposition and ethanolic Fermentation of Wheat Straw, Biomass and Bioenergy 35, 3727-3732.

Panagiotou, G., Christakopoulos, P., Villas-Boas, S.G., Olsson, L., 2005, Fermentation Performance and intracellular Metabolite Profiling of *Fusarium oxysporum* cultivated on a Glucose- Xylose Mixture, Enzyme and Microbial Technology 36 (2005) 100–106.

Pang, Z. W., Liang, J. , Huang, R., 2011, Fermentation of Xylose into Ethanol by a new Fungus Strain *Pestalotiopsis* sp. XE-1. Ind., Microbiol. Biotechnol., 38: 927–933.

Peres, M., F., S., Laluce, C., 1998, Ethanol Tolerance of Thermotolerant Yeasts Cultivated on Mixtures of Sucrose and Ethanol, Journal of Fermetation and Bioengineering, Vol. 85, No. 4, 388-397.

Rahman Mohamed, A., R., Tan, K., Keat Teong Lee, K., 2008, Role of Energy Policy in renewable Energy Accomplishment: The Case of second-generation Bioethanol, Energy Policy 36 (2008), 3360 - 3365.

Rao, K., Chelikani, S., 2008, A Novel Technique that Enables Efficient Conduct of Simultaneous Isomerization and Fermentation (SIF) of Xylose Appl. Biochem Biotechn 146: 101-117.

Ravindranath, C., Lakshmi S., Manuvie, R., Balachandra, P., 2011, Biofuel Production and Implications for Land Use, Food Production and Environment in India N.H., Energy Policy 39 (2011), 5737-5745.

Shuler M. L., Kargi F., 2002, Bioprocess Engineering, Basic Concepts, Second Edition, Πανεπιστημιακές Εκδόσεις Ε.Μ.Π.

Singh, A., Bishnoi, N. R., 2013, Ethanol Production from pretreated Wheat Straw hydrolyzate by *Saccharomyces cerevisiae* via sequential statistical optimization, Industrial Crops and Products, 41, 221– 226.

Singh, A., Kumar, P., K., *Fusarium oxysporum*: Status in Bioethanol Production, Critical Reviews in Biotechnology, 1991, Vol. 11, No. 2 : 129-147.

Soto-Cruz, O., Favela-Torres, E., Saucedo-Castaneda, G., 2002, Modeling of Growth, Lactate Consumption, and Volatile Fatty Acid Production by Megasphaera Elsdenii Cultivated in minimal and complex Media, Biotechnol, Prog. 2002, 18, 193-200.

Stryer L., 1994, Βιοχημεία, Τόμος Πρώτος, Ηράκλειο, Πανεπιστημιακές Εκδόσεις Κρήτης

Stanley, D., Bandara, A., Fraser, S., Chambers, P.J., Stanley, G., A., 2009, The Ethanol Stress Response and Ethanol Tolerance of *Saccharomyces cerevisiae*, Journal of Applied Microbiology, ISSN 1364-5072.

Van Zyl, C., Prior, B., Kilian, S., Kock, J., 1989, D-Xylose Utilization by *Saccharomyces cerevisiae*, Journal of General Microbiology, 135, 2791-2798.

Walfridsson, M., Hallborn, J., Penttila, M., Keraenen, S., Hahn-Haegerdal, B., 1995, Xylose - Metabolizing Saccharomyces cervisiae Strains overexpressing the TKL1 and TAL1 Genes encoding the Pentose Phosphate Pathway Enzymes Transketolase and Transaldolase, Applied and Environmental Microbiology, Dec. 1995, Vol. 61, No 12, 4184–4190.

Walker, G. M., Metals in Yeast Fermentation Processes, Advances in Applied Microbiology, Vol. 54.

Watanabe, S., Ahmed Abu Saleh, Seung Pil Pack, Annaluru , N., Kodaki T., Makino K., 2007, Ethanol Production from Xylose by Recombinant *Saccharomyces cerevisiae* expressing Protein engineered NADP+-dependent Xylitol Dehydrogenase, Journal of Biotechnology 130 (2007) 316–319.

Wu, Z, Lee Y.Y., 1997, Inhibition of the enzymatic Hydrolysis of Cellulose by Ethanol Biotechnology Letters, Vol. 19, No. 10, pp. 977-979.

Xiros, C., Topakas, E., Katapodis, P., Christakopoulos, P., 2008, Evaluation of *Fusarium oxysporum* as an Enzyme Factory for the Hydrolysis of Brewer's spent Grain with improved

Biodegradability for Ethanol Production, Industrial Crops and Production, Industrial Crops and Products 28, 213-224.

Xue, C., Zhao, X. - Q., Yuan, W.-J., Bai, F.-W., 2008, Improving Ethanol Tolerance of a self-flocculating Yeast by Optimization of Medium Composition, World J Microbiol Biotechnol (2008) 24:2257–2261.

Zaldivar, J., Nielsen, J., Olsson, M., 2001, Fuel Ethanol Production from Lignocellulose: A Challenge for metabolic Engineering and Process Integration, Applied Microb. Biotechnol., 56: 17- 34.

Zhao, L., Yu, Z., Xu Z., Tan, T., 2010, The Ethanol Tolerance of Pachysolen Tannophilus in Fermentation of Xylose, Applied Biochem Biotechnol (2010), 160: 378-385.

Ανασοντζής, Γ. Ε., 2010, Γενετική Τροποποίηση του Μύκητα *Fusarium oxysporum* με Στόχο τη Δημιουργία Στελεχών με αυξημένη Παραγωγικότητα Αιθανόλης, Διδακτορική διατριβή, ΕΚΠΑ, Τμήμα Βιολογίας.

Δόγαρης, Ι., 2010, Σχεδιασμός ολοκληρωμένης Διεργασίας Παραγωγής Βιοαιθανόλης από Λιγνινοκυτταρινούχα Υλικά, Διδακτορική Διατριβή, Εθνικό Μετσόβιο Πολυτεχνείο (ΕΜΠ). Σχολή Χημικών Μηχανικών. Τομέας Σύνθεσης και Ανάπτυξης Βιομηχανικών Διαδικασιών, Εργαστήριο Βιοτεχνολογίας.

Κούρτογλου, Ε., 2009, Μεταβολή Μελέτη της Παραγωγής Βιοαιθανόλης από το γενετικά τροποποιημένο Μύκητα *Fusarium oxysporum*, Διδακτορική Διατριβή, Εθνικό Μετσόβιο Πολυτεχνείο (ΕΜΠ), και Ανάπτυξης Βιομηχανικών Διαδικασιών, Σχολή Χημικών Μηχανικών, Τομέας Σύνθεσης.

Ρήγας, Φ., 2003, Επιστήμη και Τεχνολογία Περιβάλλοντος, Αθήνα, Εκδόσεις ΕΜΠ: 45-46.

Χριστακόπουλος, Π., Τόπακας, Ε., 2011, Βιοτεχνολογία Παραγωγής Βιοκαυσίμων, Αθήνα, Εκδόσεις ΕΜΠ.