



ΕΘΝΙΚΟ ΜΕΤΣΟΒΙΟ ΠΟΛΥΤΕΧΝΕΙΟ

ΣΧΟΛΗ ΧΗΜΙΚΩΝ ΜΗΧΑΝΙΚΩΝ

ΤΟΜΕΑΣ ΣΥΝΘΕΣΗΣ ΚΑΙ ΑΝΑΠΤΥΞΗΣ ΒΙΟΜΗΧΑΝΙΚΩΝ
ΔΙΑΔΙΚΑΣΙΩΝ (IV)

Βελτιστοποίηση της ταυτόχρονης υδρόλυσης και
ζύμωσης (SSF) του υδροθερμικά κατεργασμένου και
ρευστοποιημένου άχυρου σίτου με τη χρήση του μύκητα
Fusarium oxysporum

ΔΙΠΛΩΜΑΤΙΚΗ ΕΡΓΑΣΙΑ

ΤΟΥ

Γελεγένη Νικολάου

Επιβλέποντες: Ευάγγελος Τόπακας
Λέκτορας Ε.Μ.Π

Αθήνα, 2013

Ευχαριστίες

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

Αρχικά, θα ήθελα να απευθύνω τις ευχαριστίες μου στον επιβλέποντα καθηγητή της εργασίας μου Λέκτορα Τόπακα Ευάγγελο, για την ευκαιρία που μου προσέφερε να πραγματοποιήσω τη διπλωματική μου εργασία υπό την επίβλεψή του, καθώς επίσης και για τις πολύτιμες συμβουλές του, που συνεισέφεραν ουσιαστικά στην ολοκλήρωση της παρούσας εργασίας. Επιπλέον, θα ήθελα να ευχαριστήσω και τον καθηγητή Χριστακόπουλο Παύλο για τις σημαντικές οδηγίες του κατά την διάρκεια διεξαγωγής της διπλωματικής μου εργασίας.

Επίσης, θα ήθελα να ευχαριστήσω θερμά τον Υπ. Διδάκτορα Θωμά Πάσχο για την άριστη συνεργασία που είχαμε καθ' όλη τη διάρκεια της εκπόνησης της διπλωματικής εργασίας. Η βοήθεια του, οι γνώσεις του, οι συμβουλές του, η κατανόηση του και η άριστη επικοινωνία μας συνέβαλε στην πραγματοποίηση της διπλωματικής εργασίας σε ένα ευχάριστο και φιλόξενο εργαστηριακό περιβάλλον. Ήταν τιμή μου που συνεργάστηκα μαζί του.

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

Περίληψη

Η παρούσα διπλωματική εργασία εκπονήθηκε στο εργαστήριο Βιοτεχνολογίας, της Σχολής Χημικών Μηχανικών του Εθνικού Μετσόβιου Πολυτεχνείου από τον Φεβρουάριο του 2013 έως και τον Ιούνιο του 2013. Σκοπός της εργασίας ήταν η μελέτη της επίδρασης των κυττάρων και των ενζύμων του μύκητα *Fusarium oxysporum* στην ζύμωση του προϋδρολυμένου και προκατεργασμένου αχύρου (PPWS) για την παραγωγή αιθανόλης.

Η ανάπτυξη του μύκητα έγινε σε αναδεδυμένο βιοαντιδραστήρα βυθισμένης καλλιέργειας 20 λίτρων (λειτουργικός όγκος 16 λίτρα). Οι ενεργότητες των λιγνινοκυτταρινούχων ενζύμων που παράχθηκαν από την καλλιέργεια ήταν στα αναμενόμενα από τη βιβλιογραφία επίπεδα. Πραγματοποιήθηκε προϋδρόλυση του αχύρου σιταριού με τη χρήση εμπορικών ενζύμων, με σκοπό την διάσπαση της δομής της κυτταρίνης και της ημικυτταρίνης του αχύρου ώστε να επιτευχθεί η απελευθέρωση σακχάρων (ολιγοσακχαριτών) 27-35 g/L αναγωγικά σάκχαρα.

Στη συνέχεια, πραγματοποιήθηκε ζύμωση με ταυτόχρονη υδρόλυση (SSF) του προϋδρολυμένου αχύρου με χρήση κυττάρων και ενζύμων του *F. oxysporum*, εμπορικών ενζύμων Celluclast 1,5L – Novozyme 188 και ζύμης *Saccharomyces cerevisiae* σε διαφορετικά ποσοστά ξηρής μάζας και με διαφορετικό ενζυμικό φορτίο σε κάθε πείραμα. Τα ένζυμα προστέθηκαν προκειμένου να βοηθήσουν στην περαιτέρω υδρόλυση της κυτταρίνης ώστε ο εκάστοτε μικροοργανισμός (ζύμη ή μύκητας) να έχει τη δυνατότητα να μεταβολίσει περισσότερα σάκχαρα σε αιθανόλη. Η δράση των ενζύμων του *F. oxysporum* βρέθηκε ικανοποιητική και σε κάποια πειράματα προσέγγισε την δράση των εμπορικών ενζύμων Celluclast 1,5L – Novozyme 188. Τα κύτταρα του *F. oxysporum* παρήγαγαν μέχρι 2% w/w αιθανόλη, ενώ ζυμώσεις σε υψηλό ποσοστό ξηρής μάζας με ταυτόχρονη παρουσία κυττάρων *S. cerevisiae* και *F. oxysporum* παρουσίασαν τη μέγιστη παραγωγή αιθανόλης, ίση με 3,5% w/w. Συνολικά, τα αποτελέσματα έδειξαν ότι η παραγωγή αιθανόλης αυξάνεται με αύξηση του ποσοστού της ξηρής μάζας του μίγματος που πρόκειται να ζυμωθεί, αύξηση του ενζυμικού φορτίου και συνεργιστική δράση της ζύμης *S. cerevisiae* και του μύκητα *F. oxysporum*.

Λέξεις κλειδιά

Ρευστοποίηση, Ζύμωση με ταυτόχρονη υδρόλυση (SSF), *Fusarium oxysporum*, *Saccharomyces cerevisiae*, κυτταρίνη, ημικυτταρίνη, βιοκαύσιμα, βιοαιθανόλη, προϋδρόλυση, προκατεργασμένο και προϋδρολυμένο άχυρο σίτου, κυτταρινολυτικά ένζυμα.

Abstract

This thesis was carried out in the Biotechnology laboratory of the Faculty of Chemical Engineering, in the National Technical University of Athens, between February and June 2013.

The scope of this thesis is to study the effects of cells and enzymes of the fungus *F. oxysporum* on fermentation of liquefied pretreated wheat straw (PPWS) for bioethanol production.

The fungus growth took place in a 20L batch bioreactor with operational volume of 16 litres and the maximum activities of lignocellulosic enzymes produced were equal to the expected ones. Commercial enzymes were used, during the liquefaction of lignocellulosic biomass, to perform the hydrolysis of cellulose and hemicellulose, in order to release additional sugars available for fermentation (27-35g/L reducing sugars).

After the liquefaction of wheat straw, a process of simultaneous saccharification and fermentation (SSF) of pentoses and hexoses took place. The SSF was performed by fungus *F. oxysporum* and yeast *S. cerevisiae* separately, using two kinds of enzymes: a) *F. oxysporum* enzymes and b) commercial enzymes Celluclast 1,5L – Novozyme 188 in different rates of dry matter content. The purpose of the use of lignocellulosic enzymes was to release sugars for further fermentation. The performance of *F. oxysporum* enzymes was comparable to that of commercial ones. *F. oxysporum* cells produced up to 2% w/w bioethanol, whereas SSF with higher dry matter and both *F. oxysporum* and *S. cerevisiae*, resulted in higher bioethanol production equal to 3,5% w/w. Overall results showed that higher dry matter along with higher enzymatic content and cooperation of yeast and fungus lead to higher bioethanol production.

Keywords

Liquefaction, Simultaneous Saccharification and Fermentation (SSF), Ζύμωση, *Fusarium oxysporum*, *Saccharomyces cerevisiae*, cellulose, hemicellulose, lignocellulosic enzymes, biofuels, bioethanol, pro-hydrolyzed pretreated wheat straw (PPWS).

Περιεχόμενα

| | |
|---------------------------------------------------------------------------------------|-----------|
| Ευχαριστίες | 2 |
| Περίληψη | 3 |
| Λέξεις κλειδιά | 3 |
| Abstract | 4 |
| Keywords..... | 4 |
| Θεωρητικό Μέρος..... | 6 |
| ΚΕΦΑΛΑΙΟ 1 : Γενικά για την Βιοαιθανόλη..... | 7 |
| 1.1 Εισαγωγή..... | 7 |
| 1.2 Βιομάζα | 7 |
| 1.2.1 Πλεονεκτήματα | 8 |
| 1.2.2 Μειονεκτήματα | 9 |
| 1.3 Βιοκαύσιμα | 9 |
| 1.3.1 Είδη Βιοκαυσίμων | 9 |
| 1.3.2 Γενιές Βιοκαυσίμων | 10 |
| 1.4 Βιοαιθανόλη..... | 12 |
| 1.4.1 Γενικά | 12 |
| 1.4.2 Η Χημεία της αιθανόλης | 13 |
| 1.4.3 Βασικές πηγές παραγωγής αιθανόλης | 14 |
| 1.4.4 Η Παγκόσμια αγορά αιθανόλης..... | 15 |
| 1.4.5 Οικονομία καυσίμου | 16 |
| ΚΕΦΑΛΑΙΟ 2: Παραγωγή Βιοαιθανόλης | 17 |
| 2.1 Εισαγωγή..... | 17 |
| 2.2 Άχυρο Σιταριού: Παραγωγή..... | 18 |
| 2.3 Το άχυρο σιταριού ως πιθανή πρώτη ύλη για 2 ^{ης} γενιάς βιοκαύσιμα | 19 |
| 2.4 Προεπεξεργασία αχύρου σιταριού..... | 20 |
| 2.4.1 Στόχοι της προεπεξεργασίας του αχύρου σίτου..... | 20 |
| 2.4.2 Φυσική Επεξεργασία..... | 21 |
| 2.4.3 Φυσικοχημική Επεξεργασία..... | 22 |
| 2.4.4 Χημική Επεξεργασία..... | 22 |
| 2.4.5 Βιολογική Επεξεργασία | 22 |

| | |
|----------------------------------------------------------------------------|----|
| 2.5 Υδρόλυση | 23 |
| 2.6 Ζύμωση | 25 |
| 2.6.1 Μέθοδοι ζύμωσης..... | 26 |
| 2.6.2 Τεχνολογίες Παραγωγής Αιθανόλης..... | 27 |
| Κεφάλαιο 3: Πρώτες ύλες και μικροοργανισμοί | 30 |
| 3.1 Πρώτες ύλες για την παραγωγή αιθανόλης | 30 |
| 3.2 Λιγνινοκυτταρινούχα υλικά..... | 31 |
| 3.3 Υδροθερμικά προκατεργασμένο άχυρο σίτου..... | 35 |
| 3.3.1 Παραγωγή | 35 |
| 3.3.2 Σύσταση..... | 36 |
| 3.3.3 Χρήσεις..... | 36 |
| 3.4 Ο μύκητας <i>F. oxysporum</i> | 37 |
| Πειραματικό Μέρος..... | 39 |
| Κεφάλαιο 4: Υλικά και μέθοδοι | 40 |
| 4.1 Μικροοργανισμοί..... | 41 |
| 4.2 Πηγές Άνθρακα | 41 |
| 4.3 Χημικά και διαλύματα | 41 |
| 4.4 Ενζυμικά Συστήματα | 41 |
| 4.4.1 Ένζυμα <i>F. oxysporum</i> | 41 |
| 4.4.2 Celluclast 1,5L – Novozyme 188..... | 42 |
| 4.5 Μετρήσεις ενζυμικών ενεργοτήτων | 42 |
| 4.6 Μέτρησεις αιθανόλης..... | 44 |
| 4.7 Μετρήσεις Σακχάρων..... | 44 |
| 4.8 Παραγωγή κυττάρων | 45 |
| 4.8.1 Αποστείρωση..... | 45 |
| 4.8.2 Εμβόλιο βιοαντιδραστήρα | 45 |
| 4.8.3 Βιοαντιδραστήρας..... | 45 |
| 4.8.4 Παραλαβή κυττάρων..... | 46 |
| 4.9 Προκατεργασία Αχύρου..... | 46 |
| 4.10 Υγροποίηση, Σακχαροποίηση, και Ζύμωση και παρουσίαση του Mixer | 47 |
| 4.11 Υγροποίηση και Σακχαροποίηση σε αντιδραστήρα υγροποίησης (Mixer)..... | 47 |
| 4.12 Ζύμωση με ταυτόχρονη υδρόλυση (SSF)..... | 48 |
| Κεφάλαιο 5: Αποτελέσματα - Σχολιασμός..... | 49 |

| | |
|-----------------------------------------------------------------------------|----|
| 5.1 Παραγωγή Ενζύμων από μύκητα <i>F. Oxysporum</i> σε βιοαντιδραστήρα..... | 49 |
| 5.2 Ρευστοποίηση αχύρου σίτου..... | 51 |
| 5.3 Μελέτη της επίδρασης του μύκητα <i>F. oxysporum</i> στη ζύμωση..... | 53 |
| 5.2.1 Αποτελέσματα..... | 54 |
| 5.3.2 Σχολιασμός..... | 58 |
| Κεφάλαιο 6: Συμπεράσματα – Προτάσεις | 61 |
| Βιβλιογραφία | 65 |

Θεωρητικό Μέρος

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 1 : Γενικά για την Βιοαιθανόλη

Εισαγωγή

Η συνεχής χρήση ορυκτών καυσίμων προκειμένου να καλυφθεί η παγκόσμια ζήτηση ενέργειας, οδηγεί σε αυξημένες συγκεντρώσεις του CO₂ στην ατμόσφαιρα και κατ' επέκταση στην παγκόσμια αύξηση της θερμοκρασίας [1]. Συγκεκριμένα, η καύση των ορυκτών καυσίμων είναι υπεύθυνη για το 73% της παραγωγής του CO₂, που αποτελεί το σημαντικότερο αέριο του θερμοκηπίου (GHG) [2].

Η παγκόσμια υπερθέρμανση έχει ενισχύσει το ενδιαφέρον για την ανάπτυξη μεθόδων που θα μετριάσουν τις εκπομπές των αερίων του θερμοκηπίου. Ένα μεγάλο μέρος της τρέχουσας προσπάθειας να ελεγχθούν τέτοιες εκπομπές εστιάζεται στις ακόλουθες τεχνολογίες: (α) μείωση της κατανάλωσης ενέργειας, (β) αύξηση της αποδοτικότητας της ενεργειακής μετατροπής ή αξιοποίησή της, (γ) χρήση καυσίμων με μικρότερη περιεκτικότητα σε άνθρακα, (δ) ενίσχυση των φυσικών δεξαμενών για το CO₂ και (ε) συλλογή και αποθήκευση του CO₂. Η μείωση της χρήσης των ορυκτών καυσίμων θα μείωνε αρκετά το ποσό του παραχθέντος CO₂, καθώς επίσης και τα επίπεδα των ρύπων [3]. Δεδομένου ότι η ανησυχία για την παγκόσμια θέρμανση ολοένα και μεγαλώνει, σε συνδυασμό με την αύξηση στις τιμές των συμβατικών καυσίμων, καθώς και τα περιορισμένα αποθέματα τους, καθιστούν την παραγωγή των καυσίμων αυτών αγοραστικό μονοπώλιο. Λόγω της εξάρτησης πολλών χωρών από τις αγορές αυτές, η αναζήτηση εναλλακτικών και ανανεώσιμων πηγών ενέργειας που μειώνουν τις εκπομπές του CO₂ αποτελεί ένα θέμα εκτεταμένης προσοχής.

1.2 Βιομάζα

Η ενέργεια της βιομάζας (βιοενέργεια ή πράσινη ενέργεια) είναι δευτερογενής ηλιακή ενέργεια. Η ηλιακή ενέργεια μετασχηματίζεται από τα φυτά μέσω της φωτοσύνθεσης. Οι βασικές πρώτες ύλες που χρησιμοποιούνται, είναι το νερό και το διοξείδιο του άνθρακα, που είναι άφθονα στη φύση.

Η μόνη φυσικά ευρισκόμενη πηγή ενέργειας με άνθρακα που τα αποθέματά της είναι ικανά ώστε να μπορεί να χρησιμοποιηθεί ως υποκατάστατο των ορυκτών καυσίμων, είναι η βιομάζα.

Αντίθετα από αυτά, η βιομάζα είναι ανανεώσιμη καθώς απαιτείται μόνο μια σύντομη χρονική περίοδος για να αναπληρωθεί ό,τι χρησιμοποιείται ως πηγή ενέργειας. Εν γένει, για τις διάφορες τελικές χρήσεις υιοθετούνται διαφορετικοί όροι. Έτσι, ο όρος "βιοισχύς" περιγράφει τα συστήματα που χρησιμοποιούν πρώτες ύλες βιομάζας αντί των συνήθων ορυκτών καυσίμων (φυσικό αέριο, άνθρακα) για ηλεκτροπαραγωγή, ενώ ως "βιοκαύσιμα" αναφέρονται κυρίως τα υγρά καύσιμα μεταφορών που υποκαθιστούν πετρελαϊκά προϊόντα, π.χ. βενζίνη ή ντίζελ.

Βασικό πλεονέκτημα της βιομάζας είναι ότι είναι ανανεώσιμη πηγή ενέργειας και ότι παρέχει ενέργεια αποθηκευμένη με χημική μορφή. Η αξιοποίηση της μπορεί να γίνει με μετατροπή της σε μεγάλη ποικιλία προϊόντων, με διάφορες μεθόδους και τη χρήση σχετικά απλής τεχνολογίας. Σαν πλεονέκτημά της καταγράφεται και το ότι κατά την παραγωγή και την μετατροπή της δεν δημιουργούνται οικολογικά και περιβαλλοντολογικά προβλήματα. Από την άλλη, σαν μορφή ενέργειας η βιομάζα χαρακτηρίζεται από πολυμορφία, χαμηλό ενεργειακό περιεχόμενο, σε σύγκριση με τα ορυκτά καύσιμα, λόγω χαμηλής πυκνότητας και/ή υψηλής περιεκτικότητας σε νερό, εποχικότητα, μεγάλη διασπορά, κλπ. Τα χαρακτηριστικά αυτά συνεπάγονται πρόσθετες, σε σχέση με τα ορυκτά καύσιμα, δυσκολίες στη συλλογή, μεταφορά και αποθήκευσή της. Σαν συνέπεια το κόστος μετατροπής της σε πιο εύχρηστες μορφές ενέργειας παραμένει υψηλό.

Εντούτοις, η έρευνα και η τεχνολογική πρόοδος που έχει πραγματοποιηθεί τα τελευταία 10 χρόνια έχουν καταστήσει τις τεχνολογίες ενεργειακής μετατροπής της βιομάζας εξαιρετικά ελκυστικές σε παγκόσμιο επίπεδο. Οι προοπτικές, μάλιστα, της βιοενέργειας καθίστανται διαρκώς μεγαλύτερες και πιο ελπιδοφόρες. Στις πιο προηγμένες οικονομικά χώρες, αναμένεται να καλύπτει σημαντικό τμήμα της ενεργειακής παραγωγής μελλοντικά. [4]

1.2.1 Πλεονεκτήματα

1. Η καύση της βιομάζας έχει μηδενικό ισοζύγιο διοξειδίου του άνθρακα (CO₂) δεν συνεισφέρει στο φαινόμενο του θερμοκηπίου - επειδή οι ποσότητες του διοξειδίου του άνθρακα (CO₂) που απελευθερώνονται κατά την καύση της βιομάζας δεσμεύονται πάλι από τα φυτά για τη δημιουργία της βιομάζας.
2. Η μηδαμινή ύπαρξη του θείου στη βιομάζα συμβάλλει σημαντικά στον περιορισμό των εκπομπών του διοξειδίου του θείου (SO₂) που είναι υπεύθυνο για την όξινη βροχή.
3. Εφόσον η βιομάζα είναι εγχώρια πηγή ενέργειας, η αξιοποίησή της σε ενέργεια συμβάλλει σημαντικά στη μείωση της εξάρτησης από εισαγόμενα καύσιμα και βελτίωση του εμπορικού ισοζυγίου, στην εξασφάλιση του ενεργειακού εφοδιασμού και στην εξοικονόμηση του συναλλάγματος.
4. Η ενεργειακή αξιοποίηση της βιομάζας σε μια περιοχή, αυξάνει την απασχόληση στις αγροτικές περιοχές με τη χρήση εναλλακτικών καλλιεργειών (διάφορα είδη ελαιοκράμβης, σόργο,καλάμι, κενάφ) τη δημιουργία εναλλακτικών αγορών για τις παραδοσιακές καλλιέργειες (ηλιάνθος κ.ά.), και τη συγκράτηση του πληθυσμού στις εστίες τους, συμβάλλοντας έτσι στη κοινωνικο-οικονομική ανάπτυξη της περιοχής. Μελέτες έχουν

δείξει ότι η παραγωγή υγρών βιοκαυσίμων έχει θετικά αποτελέσματα στον τομέα της απασχόλησης τόσο στον αγροτικό όσο και στο βιομηχανικό χώρο.

5. Είναι ανανεώσιμη πηγή ενέργειας.

1.2.2 Μειονεκτήματα

1. Ο αυξημένος όγκος και η μεγάλη περιεκτικότητα σε υγρασία, σε σχέση με τα ορυκτά καύσιμα δυσχεραίνουν την ενεργειακή αξιοποίηση της βιομάζας.
2. Η μεγάλη διασπορά και η εποχιακή παραγωγή της βιομάζας δυσκολεύουν την συνεχή τροφοδοσία με πρώτη ύλη των μονάδων ενεργειακής αξιοποίησης της βιομάζας.
3. Βάσει των παραπάνω παρουσιάζονται δυσκολίες κατά τη συλλογή, μεταφορά, και αποθήκευση της βιομάζας που αυξάνουν το κόστος της ενεργειακής αξιοποίησης.
4. Οι σύγχρονες και βελτιωμένες τεχνολογίες μετατροπής της βιομάζας απαιτούν υψηλό κόστος εξοπλισμού, συγκρινόμενες με αυτό των συμβατικών καυσίμων.

Στην Ελλάδα υπάρχει μεγάλη διαθεσιμότητα pellets βιομάζας καθόσον λειτουργούν 5 εργοστάσια παραγωγής πελλετών, ενώ εντός του 2010 άρχισε παραγωγή και ένα έκτο στο Νευροκόπι που είναι και το μεγαλύτερο στη χώρα. [5]

1.3 Βιοκαύσιμα

Ο όρος βιοκαύσιμα αναφέρεται σε καύσιμα τα οποία παράγονται από ανανεώσιμες ύλες του εμβιόκοσμου και χρησιμοποιούνται πρωτογενώς είτε κατόπιν επεξεργασίας. Τα βιοκαύσιμα μελετώνται διότι είναι καθαρά, μη τοξικά, βιοαποικοδομήσιμα, έχουν αμελητέες εκπομπές μονοξειδίου του άνθρακα, οξειδίων του θείου και μικροσωματιδίων. Επιπλέον, δεν συμβάλλουν στο φαινόμενο του θερμοκηπίου καθώς το CO₂ που απελευθερώνεται κατά την καύση είχε δεσμευθεί από το φυτό. Στις ανεπτυγμένες χώρες επικρατεί μία αυξανόμενη τάση προς τη βιοενέργεια και τα βιοκαύσιμα που γίνονται όλο και πιο ανταγωνιστικά ως προς το κόστος σε σχέση με τα συμβατικά καύσιμα. [6]

1.3.1 Είδη Βιοκαυσίμων

Στην κατηγορία των βιοκαυσίμων ανήκουν:

- **Βιοντήζελ:** Μεθυλεστέρας παραγόμενος από φυτικά έλαια και ζωικά λίπη.
- **Βιοαιθανόλη:** Πρόκειται για αιθανόλη παραγόμενη από σακχαρούχα και αμυλούχα φυτά.
- **Βιοαέριο:** Παράγεται από βιομάζα ή/και από το βιοαποικοδομήσιμο κλάσμα αποβλήτων.
- **Βιομεθανόλη:** Πρόκειται για μεθανόλη παραγόμενη από βιομάζα.
- **Βιοδιμεθυλαιθέρας:** Πρόκειται για διμεθυλαιθέρα που παράγεται από βιομάζα.
- **Βιο-ETBE:** Αιθυλοτριτοβουτυλαιθέρας που παράγεται από βιοαιθανόλη.
- **Βιο-MTBE:** Μεθυλοτριτοβουτυλαιθέρας που παράγεται από βιομεθανόλη.

- **Συνθετικά βιοκαύσιμα:** Πρόκειται για συνθετικούς υδρογονάνθρακες ή μίγμα αυτών που έχουν προέλθει από βιομάζα.
- **Καθαρά φυτικά έλαια:** Έλαια φυτών παραγόμενα με μεθόδους όπως η συμπίεση, η έκθλιψη φυσικά ή εξευγενισμένα αλλά μη χημικώς τροποποιημένα.
- **Βιουδρογόνο:** Υδρογόνο που παράγεται από βιομάζα ή/και από βιοαποικοδομήσιμο κλάσμα βιομηχανικών και αστικών αποβλήτων. [7]

1.3.2 Γενιές Βιοκαυσίμων

Πρώτης Γενιάς

Στόχος τους είναι η παραγωγή βιοκαυσίμων από διαθέσιμες πρώτες ύλες. Προέρχονται από σάκχαρα, άμυλο, φυτικά έλαια και ζωικά λίπη. Οι πρώτες ύλες που χρησιμοποιούνται είναι σπόροι δημητριακών, σακχαρότευτλα, σακχαροκάλαμο (για την παραγωγή βιοαιθανόλης) και ελαιούχοι σπόροι (για την παραγωγή βιοντήζελ). Τα μειονεκτήματα των βιοκαυσίμων πρώτης γενιάς είναι ότι η πλειονότητα των πρώτων υλών χρησιμοποιείται στη διατροφική αλυσίδα των ανθρώπων και των ζώων και η χρήση τους για παραγωγή βιοκαυσίμων έχει αρνητική επίδραση στη διαθεσιμότητα των τροφών και στη διατήρηση της βιοποικιλότητας. Επιπλέον, η διαδικασία παραγωγής τους έχει σαν αποτέλεσμα την παραγωγή παραπροϊόντων.

Δεύτερης Γενιάς

Στόχος τους είναι η χρήση πρώτων υλών που δεν χρησιμοποιούνται για τροφές. Αυτό είναι και το βασικό πλεονέκτημά τους σε σχέση με τα βιοκαύσιμα πρώτης γενιάς. Οι πρώτες ύλες που χρησιμοποιούνται είναι:

- Φυτά πλούσια σε κυτταρίνη όπως γλυκό σόργο, αγριαγκινάρα
- Γεωργικά παραπροϊόντα όπως άχυρα, φύλλα και κελύφη καρπών

Βιομηχανικά παραπροϊόντα όπως πριονίδι, όξινα έλαια, λιπαρά οξέα και απόβλητα σφαγείων

Τα βιοκαύσιμα που ανήκουν σε αυτή την κατηγορία είναι το βιοντήζελ, η βιοαιθανόλη, η βιομεθανόλη, το βιοϋδρογόνο, το συνθετικό (FT) ντήζελ, το πράσινο ντήζελ και η συνθετική κηροζίνη. Τα κύρια μειονεκτήματα των βιοκαυσίμων αυτής της γενιάς είναι η διαθεσιμότητα των πρώτων υλών καθώς και των απαιτούμενων γεωργικών εκτάσεων αλλά και του ύδατος.

Τρίτης Γενιάς

Στόχος τους είναι η αύξηση της απόδοσης παραγωγής των πρώτων υλών. Προέρχονται από βιομάζα μεγάλης στρεμματικής απόδοσης και οι χρησιμοποιούμενες πρώτες ύλες είναι τα μικροάλγη. Τα πλεονεκτήματα που παρουσιάζουν είναι:

- Υπολογίζεται ότι μπορούν να αποδώσουν περίπου 30 φορές περισσότερη ενέργεια ανά μονάδα καλλιεργούμενης έκτασης.
- Χρήση διοξειδίου του άνθρακα ως θρεπτική ύλη των μικροοργανισμών.

Τα βιοκαύσιμα που ανήκουν σε αυτή την κατηγορία είναι το βιοντήζελ, το συνθετικό ή πράσινο ντήζελ, η βιοαιθανόλη κλπ.

Τέταρτης Γενιάς

Στόχος τους είναι η ανάπτυξη βιομάζας με αυξημένη δέσμευση CO₂ και διεργασιών παραγωγής βιοκαυσίμων αρνητικού άνθρακα με γεω-αποθήκευση CO₂. Τα βιοκαύσιμα που ανήκουν σε αυτή την κατηγορία είναι το βιοϋδρογόνο, το βιομεθάνιο, τα συνθετικά βιοκαύσιμα κλπ. [7]

Σχόλια

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

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

Τα υγρά βιολογικά καύσιμα μπορούν να χρησιμοποιηθούν ως πρόσθετες ουσίες και σε μερικές περιπτώσεις μπορούν να αντικαταστήσουν τα συμβατικά καύσιμα μεταφορών [8]. Τα βιολογικά καύσιμα μπορούν επίσης να χρησιμοποιηθούν και για άλλους λόγους όπως η αγροτική ηλεκτροδότηση [9]. Οι δύο πιο κοινές μορφές υγρών βιολογικών καυσίμων είναι βιοαιθανόλη και βιοντήζελ [10].

Η Βραζιλία είναι ηγέτης στην εισαγωγή των βιολογικών καυσίμων ως καύσιμα μεταφορών από τα μέσα της δεκαετίας του '70 και το πρόγραμμα pro-Alcool. Για διάφορους αλληλένδετους λόγους το βραζιλιάνο πείραμα κρίνεται ως οικονομική και ενεργειακά ασφαλής επιτυχία [11] και διάφορες άλλες χώρες προσπαθούν να μιμηθούν την επιτυχία της Βραζιλίας. Αυτήν την περίοδο, διάφορες χώρες ανά τον κόσμο χρησιμοποιούν το συνδυασμό των βιολογικών καυσίμων σε διαφορετικές αναλογίες στα συμβατικά καύσιμα μεταφορών.

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

Ένας άλλος παράγοντας που αφορά τα βιοκαύσιμα πρώτης γενιάς είναι και το νερό. Η συνολική απαίτηση για νερό στην παραγωγή βιοκαυσίμων πρώτης γενιάς, ιδίως για τις αρδευόμενες πρώτες ύλες, είναι αρκετά μικρό σε σύγκριση με το αντίστοιχο νερό για την παραγωγή τροφίμων [10]. Ωστόσο η εξάπλωση της χρήσης βιοκαυσίμων θα μπορούσε να οδηγήσει σε αυξημένη κατανάλωση νερού. Αυτό μπορεί να οδηγήσει σε ανταγωνισμό μεταξύ των τροφίμων

και της παραγωγή βιοκαυσίμων όχι μόνο για τη γη και την εργασία, αλλά για το νερό.

Ταυτόχρονα η ενεργειακή ασφάλεια είναι μια από τις κύριες κινητήριες δυνάμεις της παραγωγής βιοκαυσίμων σε διάφορες περιοχές του κόσμου. Στην πραγματικότητα, πολλές χώρες φαίνεται να έχουν ξεκινήσει τα προγράμματα τους για τα βιοκαύσιμα ως απάντηση στους φόβους για την ενεργειακή ασφάλεια. Τα βιοκαύσιμα πρώτης γενιάς που είναι καθαροί πάροχοι ενέργειας μπορεί να παρέχουν μια αξιόπιστη και ανανεώσιμη πηγή ενέργειας. Η Βραζιλία είναι ένα τέτοιο παράδειγμα, όπου η βιοαιθανόλη από ζαχαροκάλαμο αποτελεί ένα σημαντικό τμήμα του συνόλου της κατανάλωσης καυσίμων για τις μεταφορές στη χώρα εν μέρει λόγω των σημαντικών κερδών της ενέργειας [12].

Η παραγωγή βιοκαυσίμων και η χρήση μπορεί πράγματι να επηρεάσει αρκετούς τύπους τομέων του οικοσυστήματος αρνητικά ή θετικά: (π.χ. καύσιμα, τα τρόφιμα, γλυκό νερό), (π.χ., η ρύθμιση του κλίματος, της ποιότητας των ρυθμίσεων αέρα). Την ίδια ώρα η παραγωγή βιοκαυσίμων είναι ένας παράγοντας της αγροτικής ανάπτυξης που επηρεάζει την πρόσβαση στην ενέργεια (ενεργειακή ασφάλεια), την πρόσβαση στα τρόφιμα (επισιτιστική ασφάλεια), και την υγεία. Ως εκ τούτου η παραγωγή βιοκαυσίμων και η χρήση τους μπορεί να επηρεάσει άμεσα και έμμεσα όλες τις πτυχές της ανθρώπινης ευημερίας.

1.4 Βιοαιθανόλη

1.4.1 Γενικά

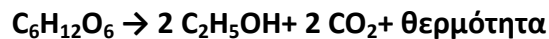
Η βιοαιθανόλη είναι αιθυλική αλκοόλη ($\text{CH}_3\text{CH}_2\text{OH}$ ή $\text{E}2\text{OH}$), και ονομάζεται επίσης οινόπνευμα, ή «αιθανόλη». Είναι μια ανανεώσιμη πηγή ενέργειας, και παράγεται με τη ζύμωση των συστατικών της ζάχαρης και του αμύλου των φυτικών υποπροϊόντων - κυρίως ζαχαροκάλαμων - και καλλιέργειες όπως σιτηρά, με τη χρήση μαγιάς. Παράγεται, επίσης, και από καλαμπόκι, πατάτες, ρύζι, παντζάρι και πρόσφατα σταφύλια και μπανάνα.



Παρόλα αυτά, διάφορες συζητήσεις σχετικά με την χρησιμότητα της βιοαιθανόλης ως αντικατάστατο της βενζίνης δημιούργησαν ποικίλες ανησυχίες σχετικά με την παραγωγή της αιθανόλης και την επίδραση της στις αυξημένες τιμές των τροφίμων, οι οποίες προέκυψαν λόγω της μεγάλης ποσότητας καλλιεργήσιμων εκτάσεων που απαιτούνταν, καθώς επίσης και της ισορροπίας μόλυνσης ολόκληρου του κύκλου της παραγωγής της αιθανόλης, ειδικά από καλαμπόκι [13],[14]. Πρόσφατες έρευνες, σχετικές με την παραγωγή αιθανόλης από κυτταρίνη έχουν καθυστερήσει μερικές από αυτές τις ανησυχίες.

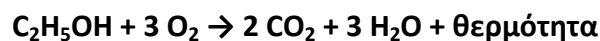
1.4.2 Η Χημεία της αιθανόλης

Κατά την ζύμωση για την παραγωγή αιθανόλης, η γλυκόζη και άλλα σάκχαρα στο καλαμπόκι (ή σε ζαχαρότευτλα ή άλλες καλλιέργειες) μετατρέπεται σε αιθανόλη και διοξείδιο του άνθρακα σύμφωνα με την αντίδραση:



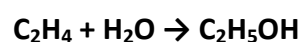
Όπως σε κάθε παρόμοια αντίδραση, η διαδικασία της ζύμωσης δεν είναι 100% επιλεκτική και η παραγωγή παρα-προϊόντων είναι αναπόφευκτη. Προϊόντα όπως το οξικό οξύ, οι γλυκόλες κ.α σχηματίζονται σε ποσότητες που απαιτούν την απομάκρυνση αυτών κατά την διαδικασία καθαρισμού της αιθανόλης. Η ζύμωση λαμβάνει χώρα σε υδατικό διάλυμα και το διάλυμα που προκύπτει με το πέρας της ζύμωσης έχει περιεκτικότητα σε αιθανόλη περίπου 15%. Στη συνέχεια, η αιθανόλη απομονώνεται και καθαρίζεται με συνδυασμό μεθόδων προσρόφησης και απόσταξης. Ο καθαρισμός της αιθανόλης είναι μια αρκετά κοστοβόρα διεργασία.

Κατά την καύση της, η αιθανόλη αντιδρά με οξυγόνο και παράγει διοξείδιο του άνθρακα, νερό και θερμότητα σύμφωνα με την γνωστή αντίδραση:



Το άμυλο και η κυτταρίνη είναι αλυσίδες μορίων γλυκόζης. Είναι, συνεπώς, δυνατό να παραχθεί αιθανόλη, από κυτταρινούχες πρώτες ύλες. Παρόλα αυτά, μια προκατεργασία είναι απαραίτητη προκειμένου να διασπαστεί η κυτταρίνη σε μόρια γλυκόζης και άλλα σάκχαρα τα οποία ακολούθως θα υποστούν ζύμωση. Το προϊόν που παράγεται ονομάζεται κυτταρινούχα αιθανόλη μαρτυρώντας έτσι την «πηγή» του.

Η αιθανόλη μπορεί, επιπλέον, να παραχθεί και βιομηχανικά χρησιμοποιώντας ως πρώτη ύλη το αιθυλένιο, μέσω υδρόλυσης του διπλού δεσμού υπό την παρουσία ειδικών καταλυτών και υψηλής θερμοκρασίας σύμφωνα με την αντίδραση:



Παρόλα αυτά, το μεγαλύτερο ποσοστό της παραγόμενης αιθανόλης παγκοσμίως παράγεται με την διαδικασία της ζύμωσης [15],[16].

1.4.3 Βασικές πηγές παραγωγής αιθανόλης

Η αιθανόλη θεωρείται ανανεώσιμη πηγή ενέργειας γιατί η ενέργεια της προέρχεται από φυσικό πόρο, την ηλιακή ακτινοβολία, η οποία δεν μπορεί να εξαντληθεί. Η παραγωγή της αιθανόλης ξεκινά με την φωτοσύνθεση δημιουργώντας βιομάζα, όπως σαχαροκάλαμο ή σιτηρά όπως αραβόσιτος (καλαμπόκι). Στην συνέχεια, η βιομάζα αυτή επεξεργάζεται για την παραγωγή αιθανόλης.

Περίπου 5% της αιθανόλης που παράχθηκε το 2003 ήταν στην πραγματικότητα προϊόν πετρελαίου. [17] Παράχθηκε από καταλυτική υδρόλυση του αιθυλενίου με θειικό οξύ σαν καταλύτη. Μπορεί, επίσης, να παραχθεί από ακετυλένιο, ασβεστούχο καρβίδιο, κάρβουνο και άλλες πηγές. Η παγκόσμια παραγωγή αιθανόλης προερχόμενης από πετρελαϊκά παράγωγα, ανέρχεται στα 2 εκατομμύρια τόνους ετησίως. Οι βασικοί προμηθευτές είναι φυτείες στην Αμερική, την Ευρώπη και την Νότια Αφρική [18].

Η βιο-αιθανόλη, συνήθως, παράγεται από την μετατροπή οργανικής βιομάζας. Οι γεωργικές πρώτες ύλες θεωρούνται ανανεώσιμες επειδή εξασφαλίζουν την ενέργεια τους από τον ήλιο χρησιμοποιώντας την διαδικασία της φωτοσύνθεσης, με την παραδοχή ότι όλα τα μέταλλα που απαιτούνται για την ανάπτυξη (όπως τα νιτρικά και τα φωσφορικά ιόντα) επιστρέφουν ξανά στη γη. Η αιθανόλη μπορεί, επίσης, να παραχθεί από μια ποικιλία πρώτων υλών όπως το ζαχαροκάλαμο, ο μίσχανθος, τα ζαχαρότευτλα, το σόργο, το σιτάρι, το κριθάρι, η κάνναβη, το κενάφ, οι γλυκοπατάτες, η μανιόκα, ο ηλιάνθος, τα φρούτα, η μελάσα, το καλαμπόκι, το άχυρο, το βαμβάκι και άλλα είδη βιομάζας, καθώς επίσης και άλλα είδη κυτταρινούχων υπολειμμάτων.

Μια εναλλακτική διεργασία για παραγωγή βιο-αιθανόλης από άγλη βρίσκεται υπό ανάπτυξη. Αντί να αναπτυχθούν τα άγλη και μετά να ζυμωθούν, αυτά αναπτύσσονται υπό την παρουσία ηλιακής ακτινοβολίας και παράγουν αιθανόλη απευθείας, η οποία ακολούθως αφαιρείται χωρίς την θανάτωση των αλγών. Υποστηρίζεται ότι η διεργασία μπορεί να παράξει ετησίως 6.000 Αμερικανικά γαλόνια ανά στρέμμα συγκριτικά με τα 400 αμερικανικά γαλόνια ανά στρέμμα που μπορούν να παραχθούν από σιτάρι.

Αυτή την περίοδο, οι πρώτης γενιάς διεργασίες για την παραγωγή αιθανόλης από σιτάρι χρησιμοποιούν μόνο ένα μικρό κομμάτι του φυτού του σιταριού: ο πυρήνας του σιταριού παραλαμβάνεται από το φυτό και μόνο το άμυλο, το οποίο αντιπροσωπεύει περίπου το 50% του ξηρής μάζας του πυρήνα, μετατρέπεται σε αιθανόλη. Υπάρχουν 2 τύποι δεύτερης γενιάς βιοδιεργασιών για την παραγωγή αιθανόλης. Το πρώτο είδος χρησιμοποιεί ένζυμα και ζύμωση με ζύμη για την μετατροπή της κυτταρίνης των φυτών σε αιθανόλη ενώ το δεύτερο είδος χρησιμοποιεί πυρόλυση για να μετατρέψει ολόκληρο το φυτό είτε σε βιο-λάδι είτε σε συνθετικό αέριο (syngas). Οι δεύτερης γενιάς διεργασίες μπορούν, επίσης, να χρησιμοποιηθούν και σε φυτά όπως γρασίδι, ξύλο ή υπολείμματα γεωργικής παραγωγής, όπως άχυρο. [19]

1.4.4 Η Παγκόσμια αγορά αιθανόλης

Σήμερα, η βιοαιθανόλη έχει πολλές χρήσεις. Αναμιγνύεται με βενζίνη για να κάνει μια πραγματικά μια ανανεώσιμη πηγή καυσίμου για τις μεταφορές.

Χρησιμοποιείται, συνήθως, στα καύσιμα των μηχανών, ως πρόσθετο στην συμβατή βενζίνη. Η παγκόσμια παραγωγή αιθανόλης τριπλασιάστηκε στο διάστημα μεταξύ 2000 και 2007 από 17 δισεκατομμύρια σε πάνω από 52 δισεκατομμύρια λίτρα. Από το 2007 στο 2008, το ποσοστό της αιθανόλης στην παγκόσμιο καύσιμο συμβατικής βενζίνης αυξήθηκε από 3,7% σε 5,4%. [20] Το 2011 η παγκόσμια παραγωγή αιθανόλης έφτασε τα 22,36 δισεκατομμύρια Αμερικανικά γαλόνια (84,6 δις. λίτρα), με τις Ηνωμένες Πολιτείες πρώτες στην παραγωγή με 13,9 δισεκατομμύρια γαλόνια (52,6 δις. λίτρα), αντιπροσωπεύοντας το 62,2% της παγκόσμιας παραγωγής, με δεύτερη την Βραζιλία με 5,6 δις. γαλόνια (21,1 δις. λίτρα). [21] Προκειμένου να μετρηθεί η ενεργειακή απόδοση της βιοαιθανόλης, έχει εισαχθεί ο όρος “Gas gallon equivalency” (η ποσότητα του εναλλακτικού καυσίμου που έχει ίσο ενεργειακό περιεχόμενο με ένα γαλόνι συμβατικής βενζίνης) ο οποίος δείχνει ότι 1,5 γαλόνια βιοαιθανόλης παράγουν την ενέργεια ενός γαλονιού βενζίνης [22].

Η αιθανόλη ως καύσιμο χρησιμοποιείται ευρέως στην Βραζιλία και στις Ηνωμένες Πολιτείες, οι οποίες ήταν υπεύθυνες για το 87,1% της παγκόσμιας παραγωγής αιθανόλης το 2011. [21] Τα περισσότερα αυτοκίνητα στις ΗΠΑ μπορούν να καύσουν μέχρι και 10% αιθανόλη. Από το 1976, η κυβέρνηση της Βραζιλίας όρισε, με νόμο, απαραίτητη την χρήση αιθανόλης ως πρόσθετο στην βενζίνη και από το 2007 η νομοθεσία προβλέπει μίγμα αιθανόλης-βενζίνης ίσο με 25% ethanol – 75% gasoline (E25). [23] Από τον Δεκέμβριο του 2011, η Βραζιλία παρήγαγε έναν πληθυσμό 14,8 εκατ. αυτοκινήτων και ελαφρών φορτηγών και 1,5 εκατ. μοτοσυκλετών, τα οποία χρησιμοποιούν εξ ολοκλήρου αιθανόλη (E100). [24] [25] [26]

| Χώρα | Υλικό | Ποσοστό αιθανόλης στο μίγμα βενζίνης %/v |
|--------------------|---------------------------------|------------------------------------------|
| Βραζιλία | Ζαχαροκάλαμο | 24 |
| Ηνωμένες Πολιτείες | Καλαμπόκι | 10 |
| Καναδάς | Καλαμπόκι, σιτάρι, κριθάρι | 7.5-10 |
| Κολομβία | Ζαχαροκάλαμο | 10 |
| Ισπανία | Σιτάρι, κριθάρι | - |
| Γαλλία | Ζαχαρότευτλο, σιτάρι, καλαμπόκι | - |
| Σουηδία | Σιτάρι | 5 |
| Κίνα | Σιτάρι, καλαμπόκι | |
| Ινδία | Ζαχαροκάλαμο | 5 |
| Ταϊλάνδη | Ζαχαροκάλαμο, ρύζι | 10 |

Πίνακας 1: Χρήση αιθανόλης ως καύσιμο

Πηγή: Murray, 2005; Berg, 2004.

1.4.5 Οικονομία καυσίμου

Θεωρητικά, όλες οι μηχανές καυσίμου έχουν έναν δείκτη οικονομίας καυσίμου (μετράται σε μίλια ανά αμερικανικό γαλόνι ή λίτρα ανά 100km) που είναι άμεσα συσχετιζόμενος με το ενεργειακό περιεχόμενο του καυσίμου. [27] Στην πραγματικότητα, υπάρχουν πολλές μεταβλητές οι οποίες επηρεάζουν την απόδοση ενός συγκεκριμένου καυσίμου σε μια συγκεκριμένη μηχανή. Η αιθανόλη περιέχει περίπου 34% λιγότερη ενέργεια ανά μονάδα όγκου συγκριτικά με τη βενζίνη, και παρόλο που θεωρητικά, θα ήταν αναμενόμενη μια μείωση της τάξης του 34% στα μίλια/US gallon από την καύση καθαρής αιθανόλης, στην πραγματικότητα προκύπτει η ίδια οικονομία καυσίμου με την καθαρή βενζίνη. Αυτό οφείλεται στο γεγονός ότι η αιθανόλη έχει υψηλότερο αριθμό οκτανίου, οπότε η μηχανή μπορεί να έχει μεγαλύτερη απόδοση αυξάνοντας τον λόγο συμπίεσης της. Στην πραγματικότητα, χρησιμοποιώντας ένα μεταβλητό turbocharger, ο λόγος συμπίεσης μπορεί να φτάσει μεγιστοποιηθεί για το συγκεκριμένο καύσιμο που χρησιμοποιείται, αποδίδοντας έτσι οικονομία καυσίμου. [28] [29] Για το E10 (10% αιθανόλη – 90% βενζίνη), η επίδραση είναι μικρή (περίπου 3%) συγκριτικά με την συμβατή βενζίνη [30]. Για το E85 (85% αιθανόλη), η επίδραση γίνεται σημαντική. Το E85 καύσιμο «βγάζει» λιγότερα μίλια σε σχέση με την βενζίνη και απαιτεί πιο συχνό γέμισμα. Η πραγματική επίδοση διαφέρει ανάλογα με το όχημα. Έρευνες που πραγματοποιήθηκαν για όλα τα E85 μοντέλα του 2006, έδειξαν ότι η μέση οικονομία καυσίμου για οχήματα E85 είναι 25,56% χαμηλότερη από την αμόλυβδη βενζίνη [31]. Η σύγκριση όμως θα έπρεπε να γίνεται και με βάση τις τιμές των καυσίμων. Το E85 είναι υψηλών επιδόσεων καύσιμο με αριθμό οκτανίου 94-96, γι' αυτό και θα πρέπει να συγκρίνεται με premium καύσιμα. [32] Όπως υπολογίζεται η τιμή για E85 καύσιμο είναι 2,62 δολάρια/γαλόνι ή 3,71 δολάρια/γαλόνι εξισωμένο με το ενεργειακό περιεχόμενο της βενζίνης. Η αντίστοιχη τιμή της βενζίνης είναι 3,03 δολάρια/ γαλόνι. Η E100 αιθανόλη που έχει παραχθεί από Βραζιλία έχει τιμή 3,88 δολάρια συγκριτικά με 4,91 δολάρια/γαλόνι για την E25 (Ιούλιος 2007). [33]

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 2: Παραγωγή Βιοαιθανόλης

2.1 Εισαγωγή

Το άχυρο σίτου είναι ένα από τα γεωργικά υπολείμματα σε αφθονία με χαμηλή εμπορική αξία. Μια εναλλακτική χρήση του άχυρου σίτου είναι η αξιοποίηση του για την παραγωγή βιοαιθανόλης. Ωστόσο, το κόστος παραγωγής με βάση την τρέχουσα τεχνολογία εξακολουθεί να είναι πολύ υψηλό και εμποδίζει την εμπορευματοποίηση της διαδικασίας. Τα τελευταία χρόνια, η πρόοδος που έχει σημειωθεί στην ανάπτυξη πιο αποτελεσματικών διαδικασιών προεπεξεργασίας και υδρόλυσης του άχυρου οδήγησε σε υψηλότερη απόδοση των σακχάρων. Με βάση τον τύπο της μεθόδου προεπεξεργασίας, μετά από ενζυματική υδρόλυση του άχυρο σίτου επιτεύχθηκε μια απόδοση ζάχαρης 74 - 99,6% της μέγιστης θεωρητικής. Διάφορα βακτήρια, ζυμομύκητες και μύκητες έχουν διερευνηθεί με αιθανόλη και η απόδοση κυμαίνεται από 65% έως 99% της θεωρητικής αξίας. Μέχρι στιγμής, τα καλύτερα αποτελέσματα όσον αφορά την απόδοση αιθανόλης, είναι με τελική συγκέντρωση και παραγωγικότητα αιθανόλης που ελήφθησαν από τη χρήση του *S. cerevisiae*. Μερικά ανασυνδυασμένα βακτήρια και ζύμες έχουν δείξει ενθαρρυντικά αποτελέσματα και εξετάζονται σε εμπορική κλίμακα. Το άχυρο σίτου από biorefinery επεξεργασία θα μπορούσε να είναι η βραχυπρόθεσμη λύση για καθαρή, αποδοτική και οικονομικά εφικτή παραγωγή βιοαιθανόλης, καθώς και υψηλής προστιθέμενης αξίας προϊόντα [34].

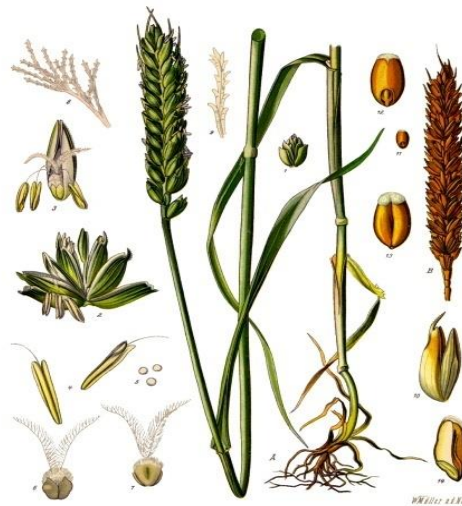
Η παγκόσμια ζήτηση για ενέργεια συνεχίζει να αυξάνεται λόγω της ταχείας αύξησης του ανθρώπινου πληθυσμού και την αύξηση της βιομηχανικής ευημερίας στις αναπτυσσόμενες χώρες. Η μεγάλη ενεργειακή ζήτηση εξακολουθεί να παρέχεται από τα συμβατικά ορυκτά καύσιμα όπως το πετρέλαιο, ο άνθρακας και το φυσικό αέριο. Η αξιοποίηση των ορυκτών καυσίμων κατά τη διάρκεια του περασμένου αιώνα και έπειτα έχει αυξήσει δραματικά το επίπεδο των "αερίων του θερμοκηπίου" στην ατμόσφαιρα [35]. Αυτά τα γεγονότα μαζί με την αναπόφευκτη μείωση του παγκόσμιου ενεργειακού εφοδιασμού, και την ασταθή αγορά πετρελαίου έχουν ενεργοποιήσει το ενδιαφέρον της κοινωνίας για αναζήτηση εναλλακτικών καυσίμων, όπως αναφέραμε. Η αιθανόλη θεωρείται ως κατάλληλη εναλλακτική λύση στα ορυκτά καύσιμα, είτε ως αποκλειστικό καύσιμο στα αυτοκίνητα με ειδικές μηχανές ή ως πρόσθετο σε μείγματα καυσίμων χωρίς απαίτηση τροποποίησης του κινητήρα (για ανάμειξη μέχρι 30%). Σήμερα, η βιοαιθανόλη είναι το κυρίαρχο βιοκαύσιμο και η παγκόσμια παραγωγή της εμφάνισε ανοδική τάση τα τελευταία 25 χρόνια με απότομη αύξηση από το 2000 [36].

Η ζάχαρη και το άμυλο προερχόμενα από υλικά όπως το ζαχαροκάλαμο και οι σπόροι είναι δύο ομάδες πρώτων υλών που χρησιμοποιούνται σήμερα ως βασικοί πόροι για την παραγωγή αιθανόλης. Η τρίτη ομάδα είναι τα λιγνοκυτταρινούχα υλικά που συνιστούν την πλέον βιώσιμη επιλογή για την παραγωγή αιθανόλης. Η αυξανόμενη ζήτηση για τρόφιμα, όπως και για ενέργεια, (λαμβάνοντας υπόψη την προτεραιότητα της ανάγκης για τρόφιμα ορισμένων υποανάπτυκτων κοινωνιών) θα μπορούσε να κάνει τις πρώτες δύο ομάδες των πρώτων υλών

ενδεχομένως λιγότερο ανταγωνιστικές σε σύγκριση με τα λιγνοκυτταρινούχα υλικά [37]. Τα λιγνοκυτταρινούχα υλικά που προέρχονται από ενεργειακές καλλιέργειες, γεωργικά υπολείμματα και υπολείμματα ξύλου, αποτελούν την πιο «πλούσια» παγκόσμια ανανεώσιμη πηγή βιομάζας [38]. Μεταξύ των γεωργικών υπολειμμάτων, το άχυρο σίτου είναι η μεγαλύτερη πρώτη ύλη βιομάζας στην Ευρώπη και η δεύτερη μεγαλύτερη στον κόσμο μετά από το άχυρο ρυζιού [39]. Περίπου το 21% των τροφίμων στον κόσμο εξαρτάται από την καλλιέργεια σιταριού και η παγκόσμια παραγωγή της πρέπει να αυξηθεί για να ικανοποιήσει την αυξανόμενη ζήτηση της ανθρώπινης κατανάλωσης [40]. Ως εκ τούτου, το άχυρο σίτου θα χρησιμεύσει ως ένα μεγάλο δυναμικό πρώτης ύλης για την παραγωγή αιθανόλης στην Ευρώπη του 21ου αιώνα.

2.2 Άχυρο Σιταριού: Παραγωγή

Το **σιτάρι** ή **στάρι** ή **σίτος** (*Triticum* spp), είναι ένα φυτό που καλλιεργείται σε όλο τον κόσμο. Είναι το δεύτερο παγκοσμίως σε συγκομιδή δημητριακό, μετά τον αραβόσιτο, με τρίτο το ρύζι. Ο καρπός του σίτου είναι μια βασική τροφή, που χρησιμοποιείται στην παρασκευή αλευριού, ζωοτροφών και ως πρώτη ύλη στην παρασκευή αλκοολούχων ποτών και καυσίμων. Ο φλοιός του μπορεί να αποσπαστεί από τον καρπό και να αλεστεί, δίνοντας το λεγόμενο πίτουρο. Ο σίτος καλλιεργείται επίσης για τη βοσκή των ζώων, καθώς και για το άχυρο, τον κορμό του φυτού, που χρησιμοποιείται ως ζωοτροφή ή υλικό κατασκευών. Το σιτάρι, όπως και τα άλλα δημητριακά, η βρώμη, η σίκαλη, το κριθάρι, περιέχουν μία πρωτεΐνη, τη γλουτένη, στην οποία πολλοί άνθρωποι είναι αλλεργικοί. Το σιτάρι (*Triticum aestivum* L.) είναι η πιο ευρέως αναπτυσσόμενη καλλιέργεια, που παράγεται σε πάνω από 115 έθνη κάτω από ένα ευρύ φάσμα περιβαλλοντικών συνθηκών. Κατά τα τελευταία 100 χρόνια, οι αποδόσεις του σιταριού έχουν αυξηθεί και η ετήσια παγκόσμια παραγωγή σιταριού το 2008 εκτιμήθηκε σε πάνω από 650 Tg [41]. Υποθέτοντας ότι το υπόλειμμα / καλλιέργεια ετησίως παράγεται σε ποσοστό 1,3 περίπου για 850 Tg καταλοίπων σίτου [42],[43].



Εικόνα 1: *Triticum aestivum* Μαλακό σιτάρι [44]

Η παγκόσμια μέση απόδοση του σίτου είναι περίπου $2,4 \text{ Mg ha}^{-1}$ και ως εκ τούτου, περίπου 430 Tg από άχυρο σίτου ετησίως είναι διαθέσιμα για παραγωγή περίπου 120 GL

βιοαιθανόλης. Αυτός ο όγκος της αιθανόλης μπορεί να αντικαταστήσει περίπου 93 (\pm 3) GL της βενζίνης, όταν λαμβάνονται υπόψη οι διαφορές τους σε ογκομετρικό ενεργειακό περιεχόμενο και ο αριθμός οκτανίων [45]. Πολλές έρευνες έχουν δείξει ότι κάτω από σωστή μικρορύθμιση των παραμέτρων του κινητήρα, τα μίγματα αιθανόλης-βενζίνης θα οδηγήσουν σε βελτιωμένη απόδοση του κινητήρα και σε μείωση των εκπομπών διοξειδίου του άνθρακα [46]. Έτσι, η μετατροπή από την καύση του άχυρο σίτου σε αιθανόλη λόγω πλεονάσματος άχυρου σίτου φαίνεται να είναι μια πολλά υποσχόμενη προσέγγιση για την απόκτηση ενέργειας από υπολείμματα βιομάζας και εν μέρει μειώνει την εξάρτηση από ορυκτά καύσιμα, ενώ παράλληλα συμβάλλει στο φαινόμενο του θερμοκηπίου και τη βελτίωση της ποιότητας των αερίων της ατμόσφαιρας.



Εικόνες 2 & 3: Άχυρο Σίτου [47],[48]

2.3 Το άχυρο σιταριού ως πιθανή πρώτη ύλη για 2^{ης} γενιάς βιοκαύσιμα

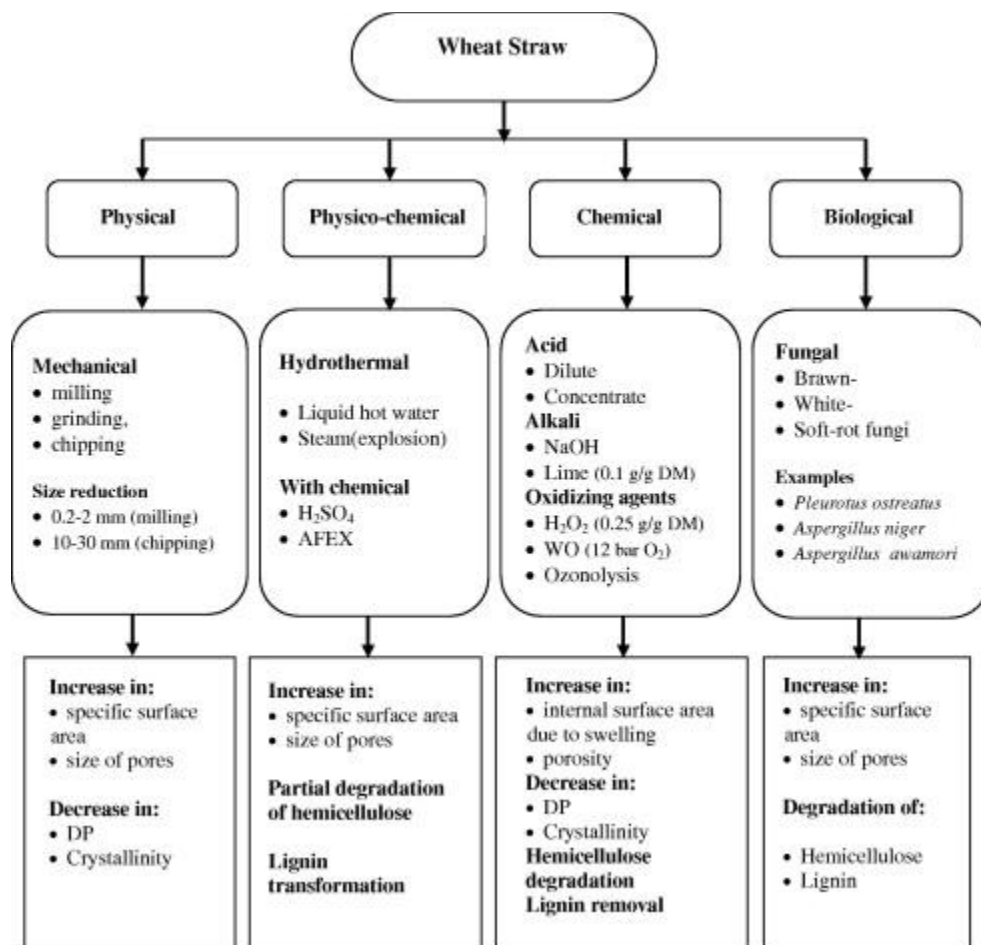
Το άχυρο σίτου, όπως οποιαδήποτε άλλη βιομάζα λιγνοκυτταρινούχας σύνθεσης είναι ένα πολύπλοκο μίγμα από κυτταρίνη, ημικυτταρίνη και λιγνίνη, σαν τρία βασικά συστατικά μιας μικρής ποσότητας από διαλυτά υποστρώματα (γνωστά ως εκχυλίσματα) και τέφρα. Η συνολική χημική σύνθεση του σιταριού διαφέρει ελαφρώς ανάλογα με είδος του σιταριού, το έδαφος, και τις κλιματικές συνθήκες που καλλιεργείται. Το περιεχόμενο της κυτταρίνης, της ημικυτταρίνης και της λιγνίνης στο άχυρο σίτου είναι της τάξης του 33-40, 20-25, και 15-20 (% w / w) αντίστοιχα [49]. Τα στελέχη της κυτταρίνης ομαδοποιούνται και συνδέονται 'σφικτά' με τέτοιο τρόπο ώστε ούτε νερό ούτε ένζυμο να διεισδύσει μέσα στη δομή [50]. Η ημικυτταρίνη εξυπηρετεί στη σύνδεση μεταξύ λιγνίνης και ινών κυτταρίνης και εύκολα υδρολύεται από αραιό οξύ ή βάση και ένζυμα. Η λιγνίνη ομοιοπολικά συνδέεται με την κυτταρίνη και την ξυλάνη (κυρίαρχο πολυμερές υδατανθράκων στο άχυρο σίτου), έτσι ώστε οι αλληλεπιδράσεις μεταξύ λιγνίνης-κυτταρίνης-εξάνης να ασκούν μεγάλη επιρροή στην πεπτικότητα των λιγνοκυτταρινούχων υλικών [50]. Λόγω αυτής της πολυπλοκότητας της δομής των λιγνοκυτταρινούχων, η παραγωγή αιθανόλης από άχυρο σίτου απαιτεί τουλάχιστον τέσσερις φάσεις επεξεργασίας :

- ✓ την προεπεξεργασία,
- ✓ την υδρόλυση,
- ✓ την ζύμωση,

✓ την απόσταξη

Σε αντίθεση με την σακχαρόζη ή το άμυλο, η λιγνοκυτταρινούχα βιομάζα όπως το άχυρο σίτου πρέπει να είναι προεπεξεργασμένη για να «γίνει προσβάσιμη» η κυτταρίνη για τον αποτελεσματικό ενζυμικό αποπολυμερισμό.

2.4 Προεπεξεργασία αχύρου σιταριού



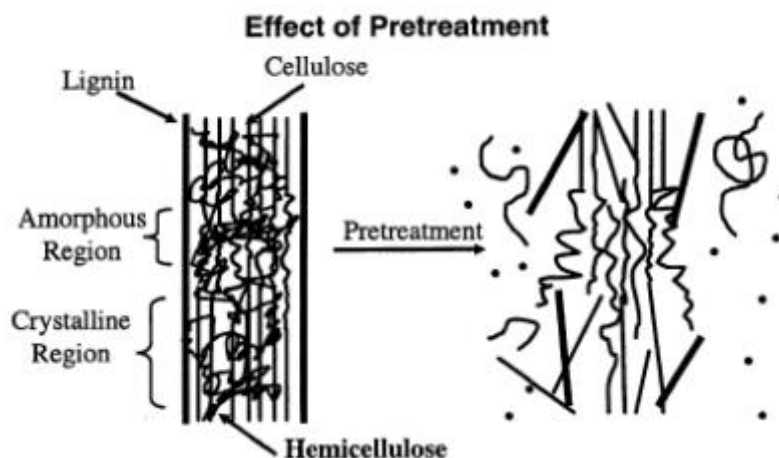
Πίνακας 2: Κοινές μέθοδοι προεπεξεργασίας αχύρου σίτου (PWS)

2.4.1 Στόχοι της προεπεξεργασίας του αχύρου σίτου

Η προεπεξεργασία είναι μια σημαντική διαδικασία για βιοχημική μετατροπή λιγνινοκυτταρινούχας βιομάζας σε πχ. Αιθανόλη. Απαιτείται για να αλλάξει την δομή της κυτταρινούχας βιομάζας προκειμένου να κάνει την κυτταρίνη πιο προσιτή στα ένζυμα, τα οποία μετατρέπουν τα πολυμερή των υδρογονανθράκων σε σάκχαρα προκειμένου να υποστούν ζύμωση [52]. Η προκατεργασία αποτελεί μια από τις πιο ακριβές διεργασίες στην μετατροπή της κυτταρινούχας βιομάζας σε σάκχαρα. [53]

Έχουν αναπτυχθεί πολυάριθμες μέθοδοι προεπεξεργασίας με σκοπό να αυξήσουν την δραστηριότητα της κυτταρίνης και την απόδοση των σακχάρων που πρόκειται να ζυμωθούν. Οι τυπικοί στόχοι της προκατεργασίας συμπεριλαμβάνουν:

- 1) Την παραγωγή υψηλής πεπτικότητας υποστρωμάτων, ώστε να εμπλουτίσουν την απόδοση των σακχάρων κατά την ενζυμική υδρόλυση. Αυτό επιτυγχάνεται με αύξηση της επιφάνειας επαφής και του πορώδους.
- 2) Αποφυγή της υποβάθμισης των σακχάρων (κυρίως των πεντοζών) συμπεριλαμβανομένων και αυτών που προέρχονται από την ημικυτταρίνη.
- 3) Ελαχιστοποίηση της παραγωγής τοξικών ουσιών που λειτουργούν ως παρεμποδιστές σε μεταγενέστερα στάδια της ζύμωσης.
- 4) Ανάκτηση της λιγνίνης για μετατροπή της σε χρήσιμα παραπροϊόντα.
- 5) Μείωση της κρυσταλλικότητας της κυτταρίνης
- 6) Χαμηλή κατανάλωση ενέργειας έτσι ώστε να είναι οικονομικά εφικτή και να μπορεί να πραγματοποιείται σε αντιδραστήρες συμβατού μεγέθους.



Εικόνα 4: Σχηματική απεικόνιση των αποτελεσμάτων της προεπεξεργασίας στην λιγνινοκυτταρινούχα βιομάζα [54]

Οι προ-επεξεργασίες κατατάσσονται κατά προσέγγιση σε φυσικές, φυσικοχημικές, χημικές και βιολογικές διεργασίες.

2.4.2 Φυσική Επεξεργασία

Το πρώτο βήμα για τη χρήση του άχυρου σίτου στην παραγωγή αιθανόλης είναι η μείωση του μεγέθους του μέσω του αλέσματος ή του ξεφλουδίσματος, βελτιώνεται έτσι η αποτελεσματικότητα της μεταγενέστερης επεξεργασίας. Ωστόσο, η χρήση πολύ μικρών σωματιδίων μπορεί να μην είναι επιθυμητή λόγω της υψηλής κατανάλωσης σε ενέργεια στο στάδιο άλεσης, καθώς υπάρχουν και αρνητικές επιδράσεις στην ακόλουθη μέθοδο προκατεργασίας. Το αρχικό και τελικό μέγεθος των σωματιδίων, η υγρασία και ιδιότητες υλικών είναι μεταξύ των μεταβλητών που επηρεάζουν τόσο την ενεργειακή κατανάλωση αλλά και την

αποτελεσματικότητα της μετέπειτα επεξεργασίας. Όσο μικρότερο είναι το μέγεθος των σωματιδίων και τόσο υψηλότερη είναι η υγρασία και η περιεκτικότητα σε άχυρο τόσο υψηλότερη είναι και η κατανάλωση ενέργειας. Η μείωση του μεγέθους έχει αποδειχθεί ότι ενισχύει την ευαισθησία των ακατέργαστων υποστρωμάτων στην ενζυμική υδρόλυση. Η απελευθέρωση της γλυκόζης και της ξυλόζης από τα μικρότερα τεμάχια του άχυρου μπορούν να αυξηθούν μέχρι και 39% των θεωρητικών μέγιστων τιμών μετά από 24 ώρες υδρολύσεως σε σύγκριση με τα δείγματα αναφοράς. Η υγρή στη οξείδωση έδειξε την εντονότερη επίδραση στα μεγαλύτερα σωματίδια από στα μικρότερα σωματίδια. [55]

2.4.3 Φυσικοχημική Επεξεργασία

Η διαλυτοποίηση των συστατικών της λιγνοκυτταρίνης εξαρτάται από την θερμοκρασία, το pH και την υγρασία. Σε λιγνοκυτταρινούχα υλικά όπως το άχυρο σίτου, η ημικυτταρίνη είναι το πιο θερμικά και χημικά ευαίσθητο κλάσμα. Ενώσεις όπως η ημικυτταρίνη αρχίζουν να διαλύονται στο νερό με θερμοκρασία μεγαλύτερη από 150 βαθμών κελσίου και με τη βοήθεια διαφόρων εξαρτημάτων, σε αντίθεση με τη ξυλάνη που μπορεί να εξαχθεί το πιο εύκολα. [56]

2.4.4 Χημική Επεξεργασία

Η χημική προεπεξεργασία του άχυρου σίτου χρησιμοποιεί διάφορες χημικές ουσίες όπως οξέα, αλκάλια και οξειδωτικά π.χ. υπεροξειδίο και όζον. Μεταξύ αυτών των μεθόδων, η αραιή όξινη προεπεξεργασία χρησιμοποιεί H_2SO_4 και είναι η πιο ευρέως χρησιμοποιούμενη μέθοδος. Ανάλογα με το είδος των χρησιμοποιούμενων χημικών, η προεπεξεργασία θα μπορούσε να έχει διαφορετικά αποτελέσματα στα δομικά στοιχεία λιγνίνης. Η αλκαλική προεπεξεργασία, η οζονόλυση, το υπεροξειδίο και η υγρή οξειδωτική προεπεξεργασία είναι περισσότερο αποτελεσματικές στην αφαίρεση λιγνίνης, ενώ η αραιή όξινη προεπεξεργασία είναι πιο αποτελεσματική στην διαλυτοποίηση ημικυτταρίνης [57].

Ιδιαίτερη κατηγορία προεπεξεργασίας άχυρου σίτου αποτελεί η **βιολογική προεπεξεργασία**.

2.4.5 Βιολογική Επεξεργασία

Η βιολογική προεπεξεργασία αποτελείται από τη χρήση μικροοργανισμών όπως οι μύκητες για επιλεκτική υποβάθμιση της λιγνίνης και της ημικυτταρίνης. Η υποβάθμιση της λιγνίνης συμβαίνει μέσω της δράσης των αντίστοιχων ενζύμων, όπως υπεροξειδάσες και λακάσες [58]. Οι κατάλληλοι μύκητες για τη βιολογική προεπεξεργασία θα πρέπει να έχουν άμεση σχέση με τη λιγνίνη και να την υποβαθμίζουν πιο γρήγορα από ό, τι τα συστατικά υδατανθράκων. Η βιολογική προεπεξεργασία είναι ασφαλής και φιλική προς το περιβάλλον σε σύγκριση με άλλες

μεθόδους προεπεξεργασίας. Ωστόσο, η ταχύτητα της αντίδρασης υδρόλυσης είναι πολύ χαμηλή και χρειάζεται μια μεγάλη βελτίωση για να είναι εμπορικά εφαρμόσιμη. Ο Hatakka (1983) διερεύνησε την προεπεξεργασία του άχυρου σίτου με 19 μύκητες και διαπίστωσε ότι το 35% του άχυρο σίτου μετατράπηκε σε αναγωγικά σάκχαρα μετά από πέντε εβδομάδες προκατεργασίας με *Pleurotus ostreatus* (σε σύγκριση με το μόλις 12% της μετατροπής μη επεξεργασμένου άχυρο).

| Pretreatment method | Advantages | Disadvantages |
|---------------------|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| Alkali | (i) Efficient removal of lignin (ii) Low inhibitor formation | (i) High cost of alkaline catalyst (ii) Alteration of lignin structure |
| Acid | (i) High glucose yield (ii) Solubilizes hemicellulose | (i) High costs of acids and need for recovery (ii) High costs of corrosive resistant equipment (iii) Formation of inhibitors |
| Green solvents | (i) Lignin and hemicellulose hydrolysis (ii) Ability to dissolve high loadings of different biomass types (iii) Mild processing conditions (low temperatures) | (i) High solvent costs (ii) Need for solvent recovery and recycle |
| Steam | (i) Cost effective (ii) Lignin transformation and hemicellulose solubilization (iii) High yield of glucose and hemicellulose in two-step process | (i) Partial hemicellulose degradation (ii) Acid catalyst needed to make process efficient with high lignin content material (iii) Toxic compound generation |
| LHW | (i) Separation of nearly pure hemicellulose from rest of feedstock (ii) No need for catalyst (iii) Hydrolysis of hemicellulose | (i) High energy/water input (ii) Solid mass left over will need to be dealt with (cellulose/lignin) |
| AFEX | (i) High effectiveness for herbaceous material and low lignin content biomass (ii) Cellulose becomes more accessible (iii) Causes inactivity between lignin and enzymes (iv) Low formation of inhibitors | (i) Recycling of ammonia is needed (ii) Less effective process with increasing lignin content (iii) Alters lignin structure (iv) High cost of ammonia |
| ARP | (i) Removes majority of lignin (ii) High cellulose content after pretreatment (iii) Herbaceous materials are most affected | (i) High energy costs and liquid loading |
| Supercritical fluid | (i) Low degradation of sugars (ii) Cost effective (iii) Increases cellulose accessible area | (i) High pressure requirements (ii) Lignin and hemicelluloses unaffected |

Πίνακας 3: Πλεονεκτήματα και Μειονεκτήματα από διαφόρων ειδών προεπεξεργασία σε λιγνινοκυτταρινούχα βιομάζα [59]

2.5 Υδρόλυση

Η υδρόλυση, χρησιμοποιώντας τα κατάλληλα ένζυμα αποτελεί την πιο αποτελεσματική μέθοδο για να απελευθερωθούν απλά σάκχαρα από κυτταρινούχες ύλες. Η υδρόλυση κυτταρίνης καταλύεται από μια κατηγορία ενζύμων, που είναι γνωστά ως κυτταρινάσες. Τα ένζυμα αυτά μπορούν να παραχθούν από μύκητες, όπως ο *Trichoderma reesei* και ο *A. niger* ή βακτήρια, όπως το *Clostridium cellulovorans* [60]. Οι περισσότερες έρευνες για τις εμπορική παραγωγή κυτταρινάσης έχουν επικεντρωθεί σε μύκητες, όπου η πλειοψηφία των σχετικών βακτηρίων είναι αναερόβια με πολύ χαμηλούς ρυθμούς ανάπτυξης. Τουλάχιστον τρεις μεγάλες ομάδες ενζύμων ονόματι ενδο-γλυκανάσες, εξω-γλυκανάσες και β-γλυκοζιδάσες εμπλέκονται στην υδρόλυση της κυτταρίνης σε γλυκόζη και η δράση τους είναι συνεργιστική. Η ενδο-γλυκανάση

επιτίθεται σε περιοχές χαμηλής κρυσταλλικότητας ινών κυτταρίνης και δημιουργεί ελεύθερα άκρα αλυσίδας. Η έξω-γλυκανάση υποβαθμίζει περαιτέρω το μόριο αφαιρώντας κομμάτια κελλοβιόζης από τις ελεύθερες άκρες της αλυσίδας, το οποίο στη συνέχεια διασπάται σε γλυκόζη από τη δράση της β-γλυκοσιδάση. Η ενζυματική υδρόλυση μπορεί να επηρεαστεί από τις συγκεντρώσεις του υποστρώματος και του τελικού προϊόντος, την ενζυμική δραστηριότητα και τις συνθήκες αντίδρασης. Η β-γλυκοσιδάση διαδραματίζει σημαντικό ρόλο στη διαδικασία της υδρόλυσης, καθώς η κελλοβιόζη είναι ένα τελικό προϊόν αναστολέας πολλών κυτταρινασών συμπεριλαμβανομένων τόσο των εξω- όσο και των ενδο-[61],[62]. Η β-γλυκοζιδάση, με τη σειρά της, αναστέλλεται από την γλυκόζη και η ενζυμική υδρόλυση είναι έτσι ευαίσθητη στην συγκέντρωση του υποστρώματος. Επιπλέον, η προεπεξεργασία των κυτταρινούχων υλικών και οι συνθήκες υδρόλυσης όπως η θερμοκρασία και το pH είναι μεταξύ των παραγόντων που επηρεάζουν την αποτελεσματικότητα της ενζυμικής υδρόλυσης. Οι περισσότερες κυτταρινάσες παρουσιάζουν βέλτιστη δραστηριότητα σε θερμοκρασίες και pH εύρους των 45-55° C και 4-5, αντίστοιχα [61].

Η δράση των κυτταρινολυτικών ενζύμων συμβαίνει μέσω των τριών βημάτων της προσρόφησης, της βιοαποικοδόμησης και της εκρόφησης. Η δραστηριότητα των κυτταρινουσών μειώνεται κατά την υδρόλυση και πιστεύεται ότι η μη αναστρέψιμη προσρόφηση του ενζύμου στην κυτταρίνη είναι εν μέρει υπεύθυνη για αυτή την απενεργοποίηση. Η προσθήκη των επιφανειοδραστικών ουσιών μπορεί να βελτιώσει την ενζυμική μετατροπή κυτταρίνης σε σάκχαρα μονομερών [63]. Διάφοροι μηχανισμοί έχουν προταθεί για το θετικό αποτέλεσμα του επιφανειοδραστικού στην ενζυμική υδρόλυση. Το επιφανειοδραστικό θα μπορούσε να αλλάξει ή να τροποποιήσει τη φύση των ιδιοτήτων της επιφάνειας της κυτταρίνης, να μειώσει την μη αναστρέψιμη δέσμευση της κυτταρινάσης στην κυτταρίνη, να εμποδίσει την ενζυμική μετουσίωση. Οι μη ιονικές επιφανειοδραστικές ουσίες, όπως η Tween 20 φαίνεται να είναι οι πιο αποτελεσματικές για την ενίσχυση της ενζυμικής υδρόλυσης [64]. Ο Kristensen (2007) ερεύνησε τις επιπτώσεις των διαφόρων μη ιονικών επιφανειοδραστικών στην ενζυμική υδρόλυση σε πέντε διαφορετικούς τύπους προεπεξεργασίας άχυρου σιταριού. Όλα τα προεπεξεργασμένα δείγματα έδειξαν αυξημένη μετατροπή κυτταρίνης με την προσθήκη διαφορετικών τασιενεργών. Η μεγαλύτερη αύξηση στη μετατροπή της κυτταρίνης κατά την ενζυμική υδρόλυση ήταν 70% που λαμβάνεται με επεξεργασμένο με θειικό οξύ άχυρο και με το Beroi 08 ως τασιενεργό. Η βέλτιστη συγκέντρωση επιφανειοδραστικών ήταν περίπου 0,05 g / g ξηρής μάζας και διαπιστώθηκε ότι ήταν παρόμοια, ανεξάρτητα από τον τύπο προεπεξεργασίας.

Η χρήση του ενζύμου κυτταρινάση συμπληρώνεται με άλλα ένζυμα που μπορούν να αυξήσουν το ποσοστό της ενζυματικής υδρόλυσης. Είναι γνωστό ότι η συζευγμένη δράση των κυτταρινασών και των ημικυτταρινασών οδηγεί σε υψηλότερη τελική παραγωγή σακχάρων. Το κυρίαρχο πολυμερές ημικυτταρίνης σε άχυρο σίτου είναι η ξυλάνη που αποτελείται από τη δομή D-ξυλόζης με διαφορετικές ομάδες συμπεριλαμβανομένης της L-αραβινόζης, D-γαλακτόζη, ακετυλο, feruloyl, p-coumaroyl και γλυκουρονικό οξύ [65].

Συνοψίζοντας τα καλύτερα αποτελέσματα όσον αφορά την απόδοση γλυκόζης, ελήφθησαν αυτά με το μίγμα από κυτταρίνη, ξυλανάση και FAE σε 50°C ανακτώντας το 81% του μέγιστου ποσού

της γλυκόζης. Η ενζυμική σακχαροποίηση του προεπεξεργασμένου άχυρου σίτου που χρησιμοποιεί διαφορετικές μεθόδους ήταν ικανοποιητική όσον αφορά την απόδοση των σακχάρων. Ένα μίγμα από μύκητες και ένζυμα κυτταρινάσης και β-γλυκοσιδάσης φαίνεται να είναι αρκετό για την αποτελεσματική σακχαροποίηση του άχυρου σίτου μετά από προεπεξεργασία σε χαμηλό pH. Η προσθήκη ενζύμου ημικυτταρινάσων (ξυλανάση) θα μπορούσε να βελτιώσει τις τελικές αποδόσεις των σακχάρων, όπου σημαντικό μέρος της ημικυτταρίνης παραμένει σε στερεό υπόλειμμα ή με τη μορφή των διαλυτών ολιγομερών μετά από προεπεξεργασία σε υψηλές τιμές pH .

2.6 Ζύμωση

Ένας σημαντικός παράγοντας που αποτρέπει τη βιομηχανική χρήση λιγνίνης για την παραγωγή βιοαιθανόλης είναι η αδυναμία των μικροοργανισμών να ζυμώσουν αποτελεσματικά (με υψηλή απόδοση και υψηλό ποσοστό) το σύνολο των σακχάρων που απελευθερώνονται κατά τη διάρκεια της προεπεξεργασίας και της υδρόλυσης. Όσον αφορά την εμπορική παραγωγή αιθανόλης, ο ιδανικός μικροοργανισμός πρέπει να έχει ευρεία χρήση υποστρώματος, υψηλή απόδοση και παραγωγικότητα αιθανόλης, την ανοχή στους αναστολείς, την κυτταρινολυτική δραστηριότητα και την ικανότητα για τη ζύμωση των σακχάρων σε υψηλές θερμοκρασίες [66]. Οι πιο γνωστοί μικροοργανισμοί για την παραγωγή αιθανόλης από εξόζες είναι ο σακχαρομύκητας *S. cerevisiae* και το βακτήριο *Zymomonas mobilis* [67] προσφέροντας υψηλές αποδόσεις αιθανόλης (90 - 97% της θεωρητικής) και υψηλής ανοχής σε αιθανόλη μέχρι περίπου 10% (w / v) σε μέσο ζύμωσης. Η απόδοση αιθανόλης του 99% με βάση την αρχική συγκέντρωση της γλυκόζης, λήφθηκε πρόσφατα με το μητρικό στέλεχος *S. cerevisiae*. [68]. Κύριο μειονέκτημα των γηγενών στελεχών του *S. cerevisiae* και *Z. Mobilis* είναι η αδυναμία τους να χρησιμοποιήσουν την ξυλόζη, το κύριο C5 σάκχαρο που προέρχεται από την ημικυτταρίνη. Άλλοι γνωστοί μικροοργανισμοί που ζυμώνουν ξυλόζη σε αιθανόλη, όπως τα εντερικά βακτήρια και οι *Pichia stipitis*, *Candida shehatae*, and *Pachysolen tannophilus* [69] χαρακτηρίζονται από χαμηλές αποδόσεις αιθανόλης και την τάση τους να αφομοιώσουν εκ νέου την παραγωγή αιθανόλης [70] Για να ξεπεραστεί αυτό το μειονέκτημα, έχουν αναπτυχθεί τα γενετικά τροποποιημένα στελέχη του *S. cerevisiae* που μπορούν να ζυμώσουν και τα δύο, εξόζες και πεντόζες [71]. Ωστόσο, τα στελέχη, έδειξαν χαμηλή παραγωγικότητα σε σχέση με τη μετατροπή ξυλόζης σε αιθανόλη [72]. Λαμβάνοντας υπόψη τα οφέλη από τη διαδικασία ζύμωσης σε υψηλές θερμοκρασίες συμπεριλαμβανομένων και υψηλών ρυθμών παραγωγής, την ευκολότερη ανάκτηση των προϊόντων, τη χρήση ενός ευρέος φάσματος υποστρωμάτων και του χαμηλού κινδύνου μόλυνσης έχει προταθεί η ζύμωση αιθανόλης με διάφορα αυστηρά αναερόβια θερμοφιλά βακτήρια, όπως το *Clostridium sp.* και *Thermoanaerobacter sp.* Η ζύμωση αιθανόλης από υδρολυμένο άχυρο σίτου ως πρώτη ύλη έχει μελετηθεί ευρέως με διαφορετικούς μικροοργανισμούς, όπως ζύμες, βακτήρια και μύκητες, *P. stipitis*, της *Kluyveromyces marxianus* [73] και ανασυνδυασμένα στελέχη της *S. cerevisiae* [74]. Μέχρι στιγμής τα καλύτερα αποτελέσματα σε σχέση με την απόδοση αιθανόλης είναι με τους μη προσαρμοσμένους ζυμομύκητες. Τέλος, έχουν επίσης υπόψη για την παραγωγή αιθανόλης, τα ανασυνδυασμένα βακτήρια με διαγραφές των γονιδίων που ευθύνονται για την παραγωγή των υποπροϊόντων [75].

2.6.1 Μέθοδοι ζύμωσης

Η βυθισμένη (Submerged) ζύμωση θεωρείται ο πιο οικονομικός τρόπος για την παραγωγή εξωκυτταρικών ενζύμων, και ίσως για αυτό το λόγο, το 90% περίπου της βιομηχανικής παραγωγής πραγματοποιείται με αυτό τον τρόπο. Μια άλλη μέθοδος είναι η ζύμωση στερεάς κατάστασης (Solid State Fermentation), στην οποία η ζύμωση ενός στερεού υποστρώματος πραγματοποιείται σε χαμηλά επίπεδα υγρασίας ή δραστηριότητας νερού [76], σε αντίθεση με την βυθισμένη ζύμωση, συνθήκες που ευνοούν ιδιαίτερα την ανάπτυξη των μυκήτων [77]. Η μέθοδος αυτή αν και έχει πολλά πλεονεκτήματα οικονομικής και οικολογικής σημασίας συγκριτικά με την βυθισμένη ζύμωση, έχει χρησιμοποιηθεί σε πολύ μικρό βαθμό μέχρι τώρα, λόγω κάποιων προβλημάτων που προκύπτουν κατά τη διάρκεια της διεργασίας, όπως η σταδιακή ανάπτυξη βαθμίδων θερμοκρασίας, pH, υγρασίας, συγκέντρωσης υποστρώματος ή pO_2 , που είναι δύσκολο να ρυθμιστούν υπό συνθήκες περιορισμένης διαθεσιμότητας νερού.

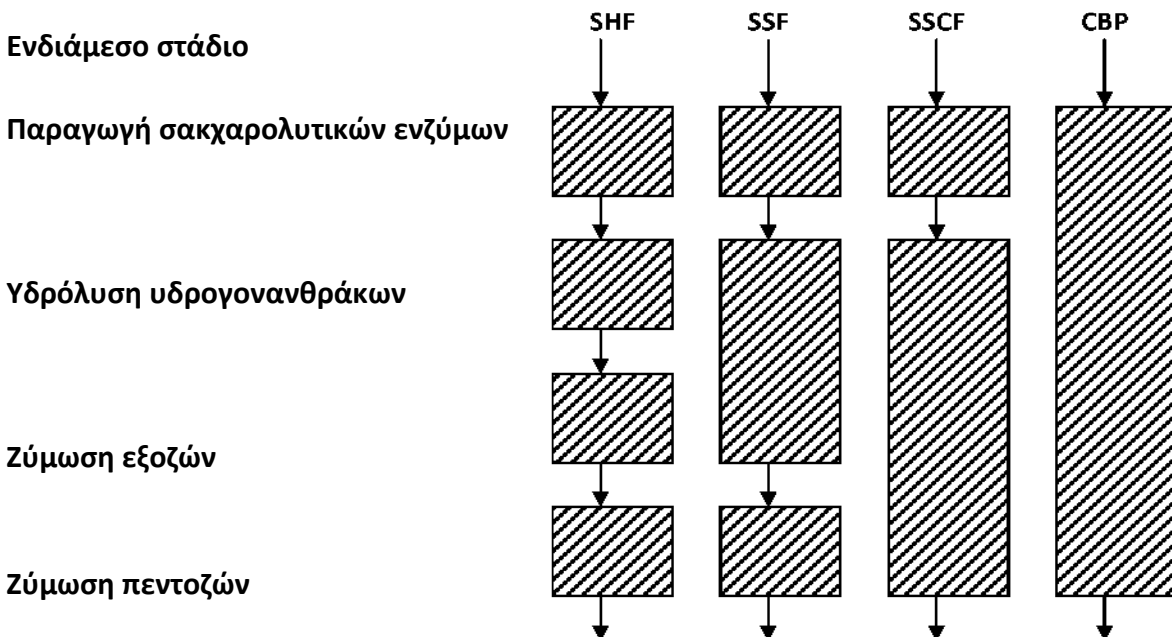
Ένα σημαντικό πλεονέκτημα της βυθισμένης ζύμωσης για την παραγωγή ενζύμων σε βιομηχανική κλίμακα είναι η χρήση γενετικά τροποποιημένων μικροοργανισμών, ειδικά προσαρμοσμένων σε τέτοιου είδους συνθήκες. Βέβαια, σχεδόν όλα από αυτά τα ένζυμα θα μπορούσαν να παραχθούν σε ζύμωση στερεάς κατάστασης, χρησιμοποιώντας φυσικούς μικροοργανισμούς. Ιδιαίτερο ενδιαφέρον έχει το γεγονός ότι μύκητες, ζύμες και βακτήρια που έχουν εξεταστεί σε ζυμώσεις στερεάς κατάστασης, παρουσίασαν διαφορετικές στρατηγικές μεταβολισμού υπό συνθήκες βυθισμένης ζύμωσης [78]. Για παράδειγμα, η καλλιέργεια των νηματοειδών μυκήτων σε στερεά υποστρώματα (οι οποίοι έχουν χρησιμοποιηθεί περισσότερο λόγω της ικανότητας τους αφενός να παράγουν ένα μεγάλο εύρος εξωκυτταρικών ενζύμων και αφετέρου να αναπτύσσονται σε περίπλοκα στερεά υποστρώματα) διαφέρει από την ανάπτυξη σε υγρή καλλιέργεια ως προς την εξωκυτταρική εντόπιση των εκκρινόμενων πρωτεϊνών.

Αν και μια άμεση σύγκριση μεταξύ της βυθισμένης και της στερεάς κατάστασης ζύμωσης είναι πολύ δύσκολο να γίνει λόγω της διαφορετικής συνύπαρξης των μικροβιακών καλλιεργειών που χρησιμοποιούνται στις δύο τεχνολογίες, οι μικροοργανισμοί που σχετίζονται με τη ζύμωση στερεάς καλλιέργειας πλεονεκτούν διότι αναπτύσσονται σε ένα σχεδόν φυσικό περιβάλλον, δηλαδή σε χαμηλά επίπεδα δραστηριότητας νερού και με στερεή υποστήριξη για ανάπτυξη [78]. Η μέθοδος αυτή λειτουργεί όπως μια ημιδιαλείποντος έργου καλλιέργεια με γρήγορη οξυγόνωση αλλά με χαμηλή παροχή σακχάρων, και επιπλέον έχει το πρόσθετο πλεονέκτημα ότι είναι μια στατική διεργασία χωρίς έξοδα παραγωγής μηχανικής ενέργειας. Ωστόσο, προκειμένου αυτό το σύστημα να χρησιμοποιηθεί σε μεγάλης κλίμακας διεργασίες θα πρέπει να ξεπεραστούν τα προβλήματα ετερογένειας [78]. Η βυθισμένη ζύμωση από την άλλη, πλεονεκτεί όσον αφορά τον έλεγχο της διεργασίας και την εύκολη ανάκτηση των εξωκυτταρικών ενζύμων και των μυκηλίων, τα οποία όμως είναι λιγότερο σταθερά από αυτά της ζύμωσης στερεάς κατάστασης. Η βυθισμένη ζύμωση λειτουργεί όπως ένα ομοιογενές σύστημα με σημαντικές δαπάνες σε ενέργεια προκειμένου να καλύψει όσο το δυνατό γρηγορότερα τις μεγάλες απαιτήσεις σε οξυγόνο. Σε τέτοιου είδους διεργασίες, πρέπει να χρησιμοποιείται αυτοματοποιημένη ημιδιαλείποντος

έργου παροχή των υποστρωμάτων, για να αποφεύγεται η καταβολική καταστολή.

2.6.2 Τεχνολογίες Παραγωγής Αιθανόλης

Η διεργασία βιομετατροπής της λιγνοκυτταρινούχου βιομάζας σε αιθανόλη περιλαμβάνει τέσσερα διαφορετικά στάδια: **την παραγωγή σακχαρολυτικών ενζύμων** (κυτταρινάσες και ημικυτταρινάσες), **την υδρόλυση των υδρογονανθράκων που περιέχονται στη βιομάζα σε απλούστερα σάκχαρα**, **τη ζύμωση των εξοζών** (γλυκόζη, μαννόζη και γαλακτόζη) και **τη ζύμωση των πεντοζών** (ξυλόζη και αραβινόζη) [78]. Ανάλογα με το βαθμό που αυτά τα στάδια αλληλοσυνδέονται, διακρίνονται οι παρακάτω τεχνολογίες παραγωγής αιθανόλης:



Εικόνα 5: Τεχνολογίες παραγωγής αιθανόλης [79]

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

Η διεργασία αυτή, όπως προκύπτει και από την παραπάνω εικόνα, περιλαμβάνει τέσσερα ξεχωριστά στάδια και τέσσερις διαφορετικούς βιοκαταλύτες [79]. Το βασικό πλεονέκτημα αυτής της διεργασίας είναι ότι το κάθε στάδιο μπορεί να διεξαχθεί στις βέλτιστες συνθήκες θερμοκρασίας και pH [80]. Ωστόσο, η συσσώρευση των τελικών προϊόντων της υδρόλυσης (γλυκόζη και κελλοβιόζη) παρεμποδίζει τη δράση των κυτταρινασών, ιδιαίτερα τη β-γλυκοζιδάση που καταλύει την υδρόλυση της κελλοβιόζης σε γλυκόζη. Το αποτέλεσμα είναι η μείωση του ρυθμού σακχαροποίησης και της τελικής συγκέντρωσης των σακχάρων, που οδηγούν σε μικρότερη απόδοση αιθανόλης [80].

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

Η ταυτόχρονη σακχαροποίηση και ζύμωση συγχωνεύει την υδρόλυση της κυτταρίνης και τη ζύμωση των εξοζών σε ένα στάδιο, ενώ η παραγωγή σακχαρολυτικών ενζύμων και η ζύμωση των πεντοζών που προκύπτουν από την υδρόλυση της ημικυτταρίνης πραγματοποιούνται σε δύο επιπρόσθετα ξεχωριστά στάδια. Με τη ταυτόχρονη σακχαροποίηση και τον συμμεταβολισμό, πραγματοποιείται η παραγωγή σακχαρολυτικών ενζύμων, και σε ένα δεύτερο στάδιο διεξάγεται η υδρόλυση της κυτταρίνης και της ημικυτταρίνης και η ζύμωση των προϊόντων τους για την παραγωγή αιθανόλης [79].

Συγκριτικά με την ξεχωριστή υδρόλυση και ζύμωση (SHF), η ταυτόχρονη σακχαροποίηση και ζύμωση έχει τα ακόλουθα πλεονεκτήματα: (1) αύξηση του ρυθμού υδρόλυσης, λόγω μετατροπής των σακχάρων που παρεμποδίζουν την δράση των κυτταρινάσων (2) μικρότερες απαιτήσεις σε ένζυμα (3) μεγαλύτερη παραγωγή προϊόντος (4) μείωση της χρονικής διάρκειας της διεργασίας (5) μικρότερος κίνδυνος μόλυνσης του μέσου καλλιέργειας από ανεπιθύμητους μικροοργανισμούς λόγω της παρουσίας της αιθανόλης (6) μείωση στο κόστος επένδυσης λόγω χρήσης μικρότερου αριθμού αντιδραστήρων [80],[81]. Ωστόσο, είναι απαραίτητος ένας συμβιβασμός όσον αφορά τη θερμοκρασία που θα διεξαχθεί η σακχαροποίηση και η ζύμωση της κυτταρίνης [81].

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

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

Η βασική διαφορά της άμεσης μικροβιακής μετατροπής από τις προηγούμενες μεθόδους είναι η απουσία ξεχωριστού σταδίου για την παραγωγή σακχαρολυτικών ενζύμων, γεγονός που έχει σαν αποτέλεσμα την απαλοιφή του κόστους που σχετίζεται με αυτό το στάδιο. Σε αντίθεση με τις άλλες μεθόδους, ολόκληρη η ποσότητα της πρώτης ύλης είναι διαθέσιμη για την παραγωγή υδρολυτικών ενζύμων. Υπάρχει ακόμα η δυνατότητα χρήσης κυτταρινάσων με μεγάλη ειδική ενεργότητα και είναι εφικτή η συνέργια ενζύμου-μικροοργανισμού. Το αποτέλεσμα είναι η αύξηση του ρυθμού υδρόλυσης και η περαιτέρω μείωση του κόστους επένδυσης λόγω μείωσης του όγκου του αντιδραστήρα. Επιπλέον, με τη μέθοδο αυτή μπορεί να επιτευχθεί μεγαλύτερη παραγωγή του επιθυμητού προϊόντος, καθώς και βελτίωση της σταθερότητας των καλλιεργειών και των στελεχών που χρησιμοποιούνται [79].

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

Γενικά, οι πρώτες ύλες για την παραγωγή βιοαιθανόλης μπορούν να ταξινομηθούν σε τρεις τύπους: (i) σακχαρούχα υλικά, (ii) αμυλούχα υλικά και (iii) λιγνινοκυτταρινούχα υλικά. Διαφορετικά υλικά που μπορούν να χρησιμοποιηθούν για την παραγωγή βιοαιθανόλης και η συγκριτική τους παραγωγική δυνατότητα δίνεται στον πίνακα 4.

| Υλικό | Παραγωγή βιοαιθανόλης (1/ton) |
|--------------------------------------------------------------|-------------------------------|
| Ζαχαροκάλαμο | 70 |
| Ζαχαρότευτλο | 110 |
| Γλυκιά πατάτα | 125 |
| Πατάτα | 110 |
| Μανιόκα (Cassava) | 180 |
| Καλαμπόκι | 360 |
| Ρύζι | 430 |
| Κριθάρι | 250 |
| Σιτάρι | 340 |
| Γλυκό σόργο | 60 |
| Υπολείμματα εκχύλισης σακχάρου και άλλη κυτταρική βιομάζα | 280 |

Πίνακας 4: Διαφορετικά υλικά για την παραγωγή βιοαιθανόλης και η συγκριτική τους παραγωγική δυνατότητα

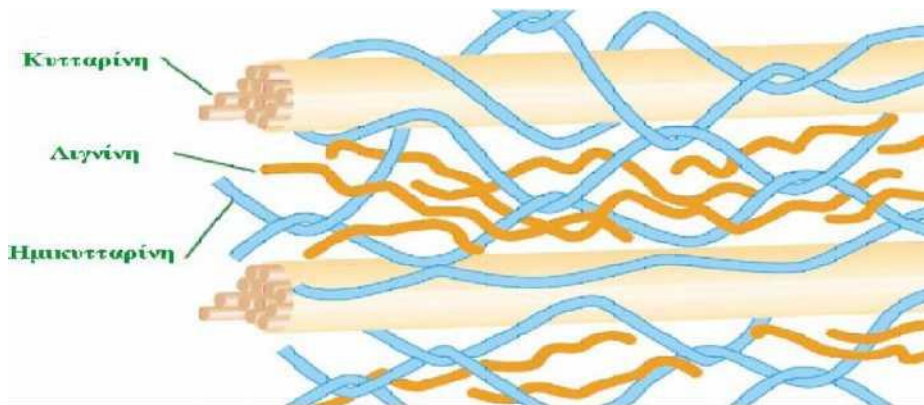
Πηγή: Kumar et al., 2006

3.2 Λιγνινοκυτταρινούχα υλικά

Τα λιγνινοκυτταρινούχα υλικά, όπως τα γεωργικά υπολείμματα (άχυρο σίτου, στελέχη, κλαδιά, φύλλα), τα υπολείμματα επεξεργασίας γεωργικών προϊόντων (υπολείμματα εκκοκκισμού βαμβακιού, πυρηνόξυλο, πυρήνες φρούτων κ.λ.π.) το ξύλο και οι ενεργειακές συγκομιδές, αποτελούν ένα ελκυστικό υλικό για την παραγωγή καυσίμων βιοαιθανόλης δεδομένου ότι διαθέτουν μεγάλο ποσοστό σε ζυμώσιμους υδρογονάνθρακες και είναι ο αφθονότερος αναπαραγωγίσιμος πόρος στη γη. Η λιγνινοκυτταρινούχος βιομάζα θα μπορούσε να παραγάγει μέχρι 442 δισεκατομμύρια λίτρα βιοαιθανόλης το χρόνο. Το άχυρο ρυζιού είναι ένα από τα

άφθονα λιγνινοκυτταρινούχα απόβλητα στον κόσμο. Παράγονται ετησίως περίπου 731 εκατομμύρια τόνοι, το οποίο διανέμεται στην Αφρική (20.9 εκατομμύρια τόνοι), την Ασία (667.6 εκατομμύρια τόνοι), την Ευρώπη (3.9 εκατομμύρια τόνοι), την Αμερική (37.2 εκατομμύρια τόνοι) και την Ωκεανία (1.7 εκατομμύρια τόνοι). Αυτό το ποσό αχύρου ρυζιού μπορεί ενδεχομένως να παραγάγει 205 δισεκατομμύρια λίτρα βιοαιθανόλης το χρόνο, το οποίο είναι το μεγαλύτερο ποσό από ένα ενιαίο απόθεμα βιομάζας. Οι λιγνινοκυτταρινούχες συγκομιδές αποτελούν ένα σημαντικό απόθεμα, λόγω της υψηλής παραγωγής τους, του χαμηλού κόστους τους, της καταλληλότητας τους για το χαμηλής ποιότητας έδαφος καθώς και για τις χαμηλές περιβαλλοντικές επιδράσεις [84].

Η σύσταση των λιγνινοκυτταρινούχων υλικών διαφοροποιείται ανάλογα με τη προέλευση τους. Σε γενικές γραμμές όμως, αποτελούνται κυρίως από κυτταρίνη (~45% του ξηρού βάρους), ημικυτταρίνη (~30% ξηρού βάρους) και λιγνίνη (~25% ξηρού βάρους) [80].

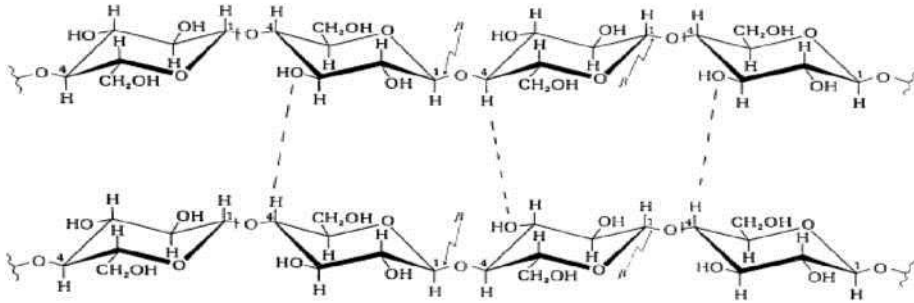


Εικόνα 7 :Απεικόνιση του δευτερογενούς κυτταρικού τοιχώματος [82].

Κυτταρίνη

Η κυτταρίνη είναι η πιο διαδεδομένη οργανική ένωση στη βιόσφαιρα και συμπεριλαμβάνει περισσότερο από τον μισό οργανικό άνθρακα. Περίπου 10^{15} Kg κυτταρίνης συντίθενται και αποικοδομούνται στη γη κάθε χρόνο. Η κυτταρίνη είναι ένα μη διακλαδισμένο πολυμερές καταλοίπων γλυκόζης, ενωμένων με β-1,4 γλυκοζιτικούς δεσμούς, με επαναλαμβανόμενη δομική μονάδα την κελλοβιόζη, με μοριακό βάρος περίπου 400000, το οποίο και αντιστοιχεί σε 2800 μονάδες γλυκόζης. Η σύζευξη των γειτονικών μορίων κυτταρίνης με δεσμούς υδρογόνου, καθώς και η επίδραση των δυνάμεων van der Waals, έχουν σαν αποτέλεσμα την παράλληλη ευθυγράμμιση της και το σχηματισμό κρυσταλλικής δομής [85]. Η δομή αυτή, καθώς και το γεγονός ότι περιβάλλεται από λιγνίνη, ημικυτταρίνη, άμυλο, πηκτίνη και μεταλλικά στοιχεία έχουν σαν αποτέλεσμα το σχηματισμό ενός εξαιρετικά σταθερού πολυσακχαρίτη, με μεγάλη αντοχή σε εφελκυσμό και ιδιαίτερα ανθεκτικό στην υδρόλυση. Η κυτταρίνη μπορεί να υδρολυθεί

είτε χημικά με αραιό ή πυκνό οξύ, είτε ενζυμικά [80].

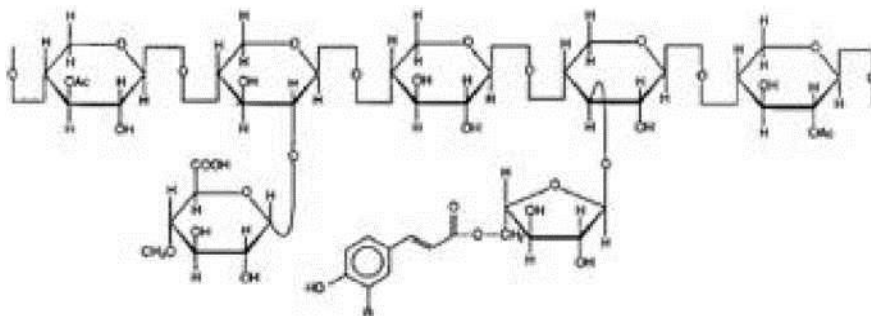


Εικόνα 8: Σχεδιάγραμμα της στερεοδιάταξης της κυτταρίνης. Η δομή σταθεροποιείται με δεσμούς υδρογόνου μεταξύ γειτονικών μονάδων γλυκόζης της ίδιας αλυσίδας αλλά και μεταξύ παράλληλων αλυσίδων [80].

Ημικυτταρίνη

Η ημικυτταρίνη είναι ένα ιδιαίτερα διακλαδισμένο ετεροπολυμερές αποτελούμενο από σάκχαρα όπως οι εξόζες (D-γαλακτόζη, L-γαλακτόζη, D-μαννόζη, L-ραμνόζη, L-φουκόζη), οι πεντόζες (D-ξυλόζη, L-αραβινόζη) και τα ουρονικά οξέα (D-γλυκουρινικό οξύ). Η σύσταση της ημικυτταρίνης εξαρτάται από την πηγή της πρώτης ύλης [83].

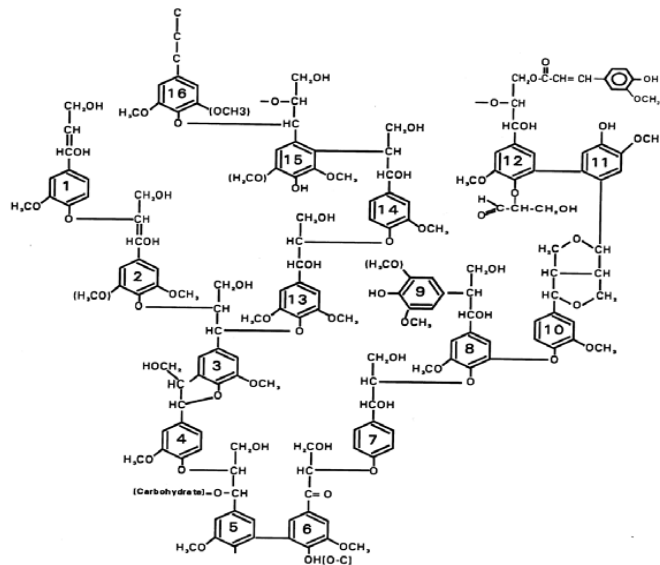
Σε αντίθεση με την κυτταρίνη, που είναι κρυσταλλική και ανθεκτική στην υδρόλυση, η ημικυτταρίνη έχει μια τυχαία και άμορφη δομή, γεγονός που οδηγεί στην ευκολότερη υδρόλυση της [86]. Οι αραβινοξυλάνες, από τους πλέον σημαντικούς πολυσακχαρίτες αυτής της κατηγορίας, διαδραματίζουν βασικό ρόλο στο φυτικό κυτταρικό τοίχωμα. Βρίσκονται κυρίως στο δευτερογενές κυτταρικό τοίχωμα και λειτουργούν σαν κόλλα, σχηματίζοντας ομοιοπολικούς και μη δεσμούς με τη λιγνίνη, τη κυτταρίνη και τα άλλα πολυμερή [87]. Οι αραβινοξυλάνες αποτελούνται από μια αλυσίδα μονάδων ξυλόζης, ενωμένων με β -1,4 γλυκοζιτικούς δεσμούς, με υποκαταστάτη κυρίως κατάλοιπα α -L-αραβινοφουρανόζης στις θέσεις C(O)-2, C(O)-3 ή και στις δύο.



Εικόνα 9: Σχηματική απεικόνιση της δομής της ημικυτταρίνης [88].

Λιγνίνη

Η λιγνίνη είναι το πιο διαδεδομένο αρωματικό πολυμερές στη φύση [80]. Αποτελείται από μονάδες *p*-υδροξυφαινυλοπροπανίου, που προκύπτουν από την αφυδάτωση τριών αλκοολών, *trans*-*p*-κουμαρική αλκοόλη, *trans*-*p*-κονιφερυλική αλκοόλη και *trans*-*p*-σιναπυλική αλκοόλη, ενωμένες με C-C ή C-O-C δεσμούς [88].



Εικόνα 10: Σχηματική απεικόνιση της δομής της λιγνίνης [89].

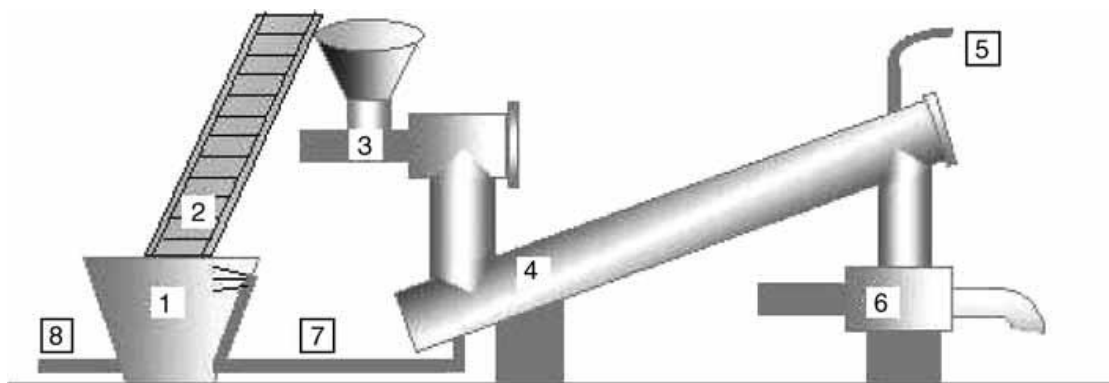
Στο φυτικό κυτταρικό τοίχωμα η λιγνίνη σχηματίζει ένα προστατευτικό περίβλημα γύρω από τις ίνες κυτταρίνης και ενώνεται ομοιοπολικά με την ημικυτταρίνη. Αναγκαία προϋπόθεση για την υδρόλυση αυτών των πολυσακχαριτών είναι η αποικοδόμηση της λιγνίνης. Ωστόσο, η υδροφοβικότητα που τη χαρακτηρίζει, καθώς και η περίπλοκη, ευμετάβλητη δομή που διαθέτει, την καθιστούν εξαιρετικά ανθεκτική στη χημική και ενζυμική αποικοδόμηση [89]. Βιολογικά, διασπάται από πολύ λίγους μικροοργανισμούς, κυρίως μύκητες, παρέχοντας μεγαλύτερης αξίας προϊόντα όπως οργανικά οξέα, αρωματικές αλδεΐδες, κετόνες και βανιλίνη [90],[91].

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

Η παραγωγή υδροθερμικά προκατεργασμένου άχυρου σίτου εντάσσεται στο πρόγραμμα IBUS (Integrated Biomass Utilization System) της ΕΕ, που στόχο έχει την ανάπτυξη οικονομικών διαδικασιών για τη συμπαραγωγή βιοαιθανόλης και ηλεκτρισμού, οι οποίες βασίζονται στη συνδυαστική αξιοποίηση βιομάζας [92]. Η επιλογή της υδροθερμικής κατεργασίας έγινε με βάση το δεδομένο ότι η συγκεκριμένη κατεργασία μπορεί να πραγματοποιηθεί χωρίς την προσθήκη χημικών και οξυγόνου, γεγονός που την καθιστά δυνατή λύση για προκατεργασία μεγάλων ποσοτήτων άχυρου [92].

3.3.1 Παραγωγή

Η πιλοτική μονάδα που χρησιμοποιείται (Εικόνα 11) έχει δυναμικότητα 100 kg/h [92]. Το άχυρο τροφοδοτείται σε ένα δοχείο όπου διαβρέχεται με νερό σε θερμοκρασία 80 °C για 6 min [93]. Στη συνέχεια, οδηγείται στην είσοδο του αντιδραστήρα μέσω ενός ταινιόδρομου, ο οποίος στραγγίζει αρκετό από το ελεύθερο νερό του άχυρου, εξασφαλίζοντας έτσι, την αντίθετης φοράς ροή νερού μέσα στον αντιδραστήρα. Η εισαγωγή της βιομάζας στον αντιδραστήρα πραγματοποιείται με μια ειδικά σχεδιασμένη αντλία. Ο εν λόγω αντιδραστήρας περιλαμβάνει κοχλιόδρομο με τον οποίο το άχυρο μεταφέρεται ανοδικά, ενώ νερό που εισάγεται από την κορυφή του, κινούμενο με αντίθετη φορά, αποσκοπεί στην εκχύλιση [92]. Το άχυρο παραμένει στον αντιδραστήρα στους 195 °C για 12 min, ενώ η ροή νερού μέσα από αυτόν είναι 250 L/h [93]. Η κατεργασμένη, πλέον, βιομάζα απομακρύνεται από το αντιδραστήρα με τη βοήθεια αντλίας [92].



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

Εικόνα 11: Σχηματική παράσταση της πιλοτικής μονάδας που χρησιμοποιείται για την κατεργασία του WS [92].

3.3.2 Σύσταση

Το στερεό υλικό, που προκύπτει από την παραπάνω διαδικασία, είναι πλούσιο σε κυτταρίνη και δίνει μεγάλες αποδόσεις σε γλυκόζη μετά από ενζυμική υδρόλυσή του. Αντίθετα, η περιεκτικότητά του σε ημικυτταρίνη είναι σε χαμηλά επίπεδα λόγω της θερμικής της διάσπασης. Τέλος, το περιεχόμενό του σε λιγνίνη παρουσιάζει αύξηση, σε σχέση με το ακατέργαστο υλικό, λόγω της μη απομάκρυνσης της ήδη υπάρχουσας, καθώς και λόγω των ενώσεων που σχηματίστηκαν από τη διάσπαση της ημικυτταρίνης. Η λιγνίνη, μάλιστα, έδειξε να μην εμποδίζει τη δράση των κυτταρινολυτικών ενζύμων κατά την ενζυμική υδρόλυση [92]. Μειονέκτημα αποτελεί ο σχηματισμός παρεμποδιστών, όπως καρβοξυλικά οξέα και φουρφουράλες, που σε κάποιες περιπτώσεις δυσκολεύουν, ή ακόμα και αποκλείουν τη δυνατότητα ζύμωσης [92].

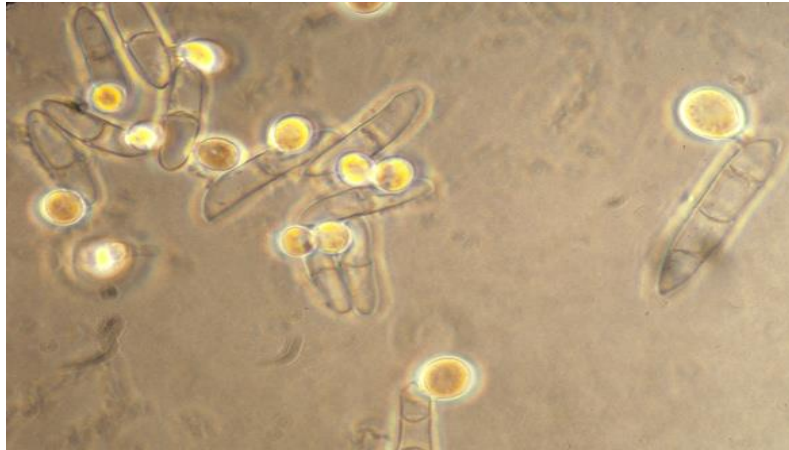
3.3.3 Χρήσεις

Όπως προαναφέρθηκε, το κατεργασμένο στερεό που λαμβάνεται από τη διαδικασία μπορεί να χρησιμοποιηθεί για την παραγωγή αιθανόλης με Ταυτόχρονη Σακχαροποίηση και Ζύμωση (Simultaneous Saccharification and Fermentation - SSF). Το πλούσιο σε λιγνίνη υπόλειμμα της ζύμωσης - το οποίο έχει επίσης απαλλαγεί και από τα άλατα του καλίου που προκαλούν διάβρωση στον εξοπλισμό των εργοστασίων παραγωγής ενέργειας - χρησιμοποιείται για παραγωγή ενέργειας μέσω της καύσης του. Επίσης, το υγρό που λαμβάνεται από την κατεργασία (εκχύλισμα που περιέχει ημικυτταρίνη) χρησιμεύει και αυτό για την παραγωγή αιθανόλης με ζύμωση. Τέλος, παραπροϊόντα της ζύμωσης συμπυκνώνονται και χρησιμοποιούνται ως ζωοτροφή και λίπασμα [92].

3.4 Ο μύκητας *F. 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 *F. oxysporum* έχουν την ικανότητα να ζυμώνουν την κυτταρίνη απευθείας σε αιθανόλη [94].

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



Εικόνα 12: *Fusarium oxysporum*

Το στέλεχος *F. 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 [95],[96],[97].

Διάφοροι φυσικοί παράγοντες όπως το pH, η θερμοκρασία και οι συνθήκες αερισμού επηρεάζουν σημαντικά την παραγωγή αιθανόλης από τον *F. 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 [94].

Μειονεκτήματα της χρήσης του *F.oxysporum* στην παραγωγή αιθανόλης είναι ο χαμηλός ρυθμός μετατροπής της κυτταρίνης, καθώς και ο σχηματισμός σημαντικών ποσοτήτων οξικού οξέος σαν παραπροϊόν [96].

Πειραματικό Μέρος

Κεφάλαιο 4: Υλικά και μέθοδοι

4.1 Μικροοργανισμοί

A) Ο μύκητας που χρησιμοποιήθηκε είναι ο *Fusarium oxysporum* F3 που απομονώθηκε από κύμινο [94]. Ο μύκητας αναπτύχθηκε σε potato-dextrose-agar PDA σε slants σε θερμοκρασία 30 °C για 5 ημέρες. Μετέπειτα διατηρήθηκε στους 4 °C.

B) Η ζύμη *S. cerevisiae* που χρησιμοποιήθηκε είναι η μαγειρική μαγιά εμπορίου.

4.2 Πηγές Άνθρακα

Το προκατεργασμένο άχυρο σίτου (PWS) προέρχεται από το πανεπιστήμιο της Κοπεγχάγης. Η προκατεργασία έγινε στις πιλοτικές εγκαταστάσεις της IBUS στη Δανία [92]. Το υλικό διατηρήθηκε στους -18 °C. Πριν τη χρήση του υλικού έγινε ξήρανση στους 65 °C μέχρι σταθερού βάρους και τεμαχίστηκε σε κομμάτια μικρότερα των 3 χιλιοστών.

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

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

4.3 Χημικά και διαλύματα

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

4.4 Ενζυμικά Συστήματα

4.4.1 Ένζυμα *F. oxysporum*

Το στάδιο της παραγωγής των ενζύμων διεξάγεται σε βιοαντιδραστήρα κάτω από συγκεκριμένες συνθήκες. Η πηγή άνθρακα που χρησιμοποιείται είναι μίγμα BG και CC σε αναλογία 2/1. Στο τελικό στάδιο παραγωγής του ενζύμου το υπερκείμενο της καλλιέργειας φυγοκεντρείται (14000 rpm, 20 min) και συμπυκνώνεται με τη χρήση μεμβρανών υπερ διήθησης.

Η δραστηριότητα της ενδογλυκανάσης αυξήθηκε σημαντικά μετά από 45h καλλιέργειας σε βιοαντιδραστήρα και έφτασε τα μέγιστα επίπεδα σε 108h (5,7 U / mL). Οι άλλες δραστηριότητες κυτταρινολυτικών ενζύμων επιτυγχάνονται μέγιστες τιμές μετά από 70h καλλιέργειας (0,85,

0.77 and 0,35 U / mL για FPA, β-Γλυκοσιδάση και κελλοβιοϋδρολάσης αντίστοιχα). Το υπερκείμενο της καλλιέργειας χρησιμοποιείται ως πηγή ενζύμων σε υδρολυτικές αντιδράσεις. Το κυτταρινολυτικό προφίλ δραστηριότητες του συμπυκνωμένου εκχυλίσματος ήταν για 1FPU/g DM: 12,5U ενδογλυκανάσης, 1,5 U κελλοβιοϋδρολάσης, 2,5 U β-Γλυκοσιδάση. Αυτό το ενζυματικό προφίλ είναι παρόμοιο με το προφίλ του κυτταρινολυτικού και ευρέως χρησιμοποιούμενου μίγματος των εμπορικών παρασκευασμάτων Celluclast 1,5 L και Novozyme 188 (Novozymes) σε αναλογία 5:1, με την εξαίρεση της δραστηριότητας β-Γλυκοσιδάση που στην παρούσα περίπτωση είναι περίπου δύο ή τρεις φορές υψηλότερη.

4.4.2 Celluclast 1,5L – Novozyme 188

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

4.5 Μετρήσεις ενζυμικών ενεργοτήτων

Κυτταρινάσες (Filter paper activity)

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

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

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

Ενδογλουκανάσες

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

β-Γλυκοζιδάσες

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

β-Ξυλοζιδάσες

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

Ξυλανάσες

Για τον προσδιορισμό της δραστικότητας των ενδο-β-1,4-ξυλανασών χρησιμοποιήθηκε ως υπόστρωμα εμπορική ξυλάνη από ξύλο σημύδας (Birchwood xylan από τη Sigma), συγκέντρωσης 1% w/v σε ρυθμιστικό διάλυμα κιτρικού οξέος – όξινου φωσφορικού νατρίου 100 mM, pH 6. Το αντιδρών μίγμα που περιείχε 225 μl διαλύματος ξυλάνης και 25 μl ενζυμικού διαλύματος επώαστηκε στους 50 °C σε υδατόλουτρο για 10min. Η ξυλόζη που απελευθερώνεται μετράται με τη μέθοδο του δινιτροσαλικιλικού οξέος (DNS) : Σε 250 μl της αντίδρασης προστίθενται 250 μl διαλύματος δινιτροσαλικιλικού οξέος και ακολουθεί βρασμός για 5 min. Ακολούθως στα δείγματα προστίθενται 2 ml νερού και μετράται η απορρόφηση σε μήκος κύματος 540 nm χρησιμοποιώντας ένα σπεκτροφωτόμετρο U-2000 της HITACHI. Οι ενεργότητες εκφράζονται σαν International Units (ή mU), που σημαίνει ότι 1 U καθορίζεται ως το ποσό του ενζύμου που απαιτείται για την απελευθέρωση 1 μmol ξυλόζης ανά λεπτό.

4.6 Μέτρησεις αιθανόλης

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



Εικόνα 13:Υγρός χρωματογράφος υψηλής πίεσης (HPLC) Shimadzu

4.7 Μετρήσεις Σακχάρων

Ο ποσοτικός προσδιορισμός των σακχάρων έγινε με τη χρήση χρωματογράφου ιοντικής εναλλαγής, υψηλού (pH high pH anion exchange chromatography (HPAEC)) (Dionex Corporation, USA). Η κινητή φάση του χρωματογράφου περιείχε $NaOH$ (17.5 mM) και είχε ροή 1 mL/λεπτό. Η στήλη καθαρίζεται μετά από κάθε ανάλυση με 200 mM $NaOH$. Όλες οι αραιώσεις των δειγμάτων έγιναν με απιονισμένο νερό υψηλής καθαρότητας (Millipore, Γαλλία). Επιπροσθέτως πριν από τις αναλύσεις τα δείγματα φιλτράρονταν (0,20 mm, Macherey - Nagel).

4.8 Παραγωγή κυττάρων

4.8.1 Αποστείρωση

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

4.8.2 Εμβόλιο βιοαντιδραστήρα

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

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

4.8.3 Βιοαντιδραστήρας

Για την παραγωγή των ενζύμων χρησιμοποιήθηκε κυλινδρικός αντιδραστήρας 20 λίτρων της εταιρίας MBR. Ο λειτουργικός όγκος του βιοαντιδραστήρα ήταν 16 L. Η ταχύτητα ανάδευσης ρυθμιζόταν ανάλογα με τις συνθήκες του πειράματος. Η παροχή αέρα στον αντιδραστήρα προσαρμοζόταν έτσι ώστε το διαλυμένο οξυγόνο της καλλιέργειας να είναι πάντα σε τιμές μεγαλύτερες του 20%. Η μέτρηση του οξυγόνου γίνεται με ηλεκτρόδιο οξυγόνου Ingold O₂ (Ingold, Steinbach, Germany). Οι συνθήκες καλλιέργειας ήταν: T=30°C, pH=5 και RPM=200 σε αερόβιο περιβάλλον.

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

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

χρησιμοποιήθηκε στις υδρολύσεις. Ο βιοαντιδραστήρας που χρησιμοποιήθηκε κατά τη διάρκεια του πειράματος φαίνεται στην παρακάτω εικόνα:



Εικόνα 14: Βιοαντιδραστήρας MBR 20L

4.8.4 Παραλαβή κυττάρων

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

4.9 Προκατεργασία Αχύρου

Η προεπεξεργασία πραγματοποιήθηκε στην πιλοτική μονάδα IBUS στο Fynsværket της Odense, στη Δανία [92]. Τρεις παρτίδες του προεπεξεργασμένου αχύρου παρήχθησαν (άχυρο Α, Β, και Γ), ως μέρος του ελέγχου της μονάδας προεπεξεργασίας. Οι συνθήκες προεπεξεργασίας ήταν: ο ρυθμός τροφοδοσίας ήταν 75 kg άχυρο ανά ώρα ($\frac{1}{4}$ 67,5 kg DM / h) για το άχυρο Α και 50 kg άχυρο ανά ώρα (45 κιλά $\frac{1}{4}$ DM / h) για το άχυρο Β και C. Το άχυρο εμποτίζεται στο νερό στους 808 °C για 6 λεπτά και στη συνέχεια μεταφέρεται στον αντιδραστήρα. Για άχυρο Α ο χρόνος παραμονής στον αντιδραστήρα ήταν κατά μέσο όρο 6 λεπτά και τον αντιδραστήρα θερμοκρασία διατηρήθηκε σε 1958 °C με την έγχυση ατμού. Για άχυρο Β η θερμοκρασία ήταν 1958 °C και ο χρόνος παραμονής στα 12 λεπτά. Για το άχυρο C η θερμοκρασία ήταν 2058 °C και ο χρόνος παραμονής 6 λεπτά. Για όλα τα πειράματα η αντιρροή ροή του νερού ήταν 250 L / h.

Χημικές ουσίες δεν προστέθηκαν στο νερό ή μαζί με τον ατμό. Το προεπεξεργασμένο άχυρο έξω από τον αντιδραστήρα είχε μεταξύ 23% και 28% (w/w) DM. Το προεπεξεργασμένο άχυρο συλλέχθηκε σε μεγάλες πλαστικές σακούλες ζυγίζοντας περίπου 30-50 κιλά και φυλάχθηκαν στους 4 °C για 1-5 μήνες πριν χρησιμοποιηθεί. Το προεπεξεργασμένο άχυρο ήταν για χρήση για την ενζυματική υγροποίηση, τη σακχαροποίηση, και τη ζύμωση [93].

4.10 Υγροποίηση, Σακχαροποίηση, και Ζύμωση και παρουσίαση του Mixer

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

4.11 Υγροποίηση και Σακχαροποίηση σε αντιδραστήρα υγροποίησης (Mixer)

Ένας αντιδραστήρας υγροποίησης σχεδιάστηκε για την υγροποίηση και την σακχαροποίηση σε στερεές συγκεντρώσεις άνω του 20% (w / w) DM.

Ο αντιδραστήρας αποτελείται από ένα τοποθετημένο οριζόντιο σφαιρικό τμήμα. Ένας περιστρεφόμενος οριζόντιος άξονας τοποθετείται με τρία πτερύγια για να χρησιμεύσουν στην ανάμιξη (Εικ.12). Το μοτέρ 1,1 kW, που χρησιμοποιήθηκε για να δώσει κίνηση και περιστροφή στο σύστημα μετρήθηκε στις 2,5 με 16,5 rpm (Εικ.13). Ο κατεύθυνση της περιστροφής ήταν προγραμματισμένη να περιστρέφεται κατά τη φορά του δείκτη του ρολογιού και αντίθετα. Το γεμάτο με λάδι θερμαντικό μέσο στο εξωτερικό του συστήματος επέτρεψε τον έλεγχο της θερμοκρασίας μέχρι 80 °C. Σύστημα ψύξης δεν έχει εγκατασταθεί. Η σακχαροποίηση πραγματοποιήθηκε για 6 ώρες σε θερμοκρασία $T=50^{\circ}\text{C}$.



Εικόνα 15: mixer



Εικόνα 16 : Το μοτέρ

4.12 Ζύμωση με ταυτόχρονη υδρόλυση (SSF)

Για την μελέτη της επίδρασης του *F. oxysporum* στη ζύμωση του αχύρου πραγματοποιήθηκαν πειράματα σε άχυρο με διαφορετικά ποσοστά ξηρής μάζας. Πιο συγκεκριμένα, μελετήθηκαν συστήματα με 10%, 15%, 20% και 25% επί της ξηρής μάζας του αχύρου. Για τις πρώτες 3 συνθήκες χρησιμοποιήθηκε προϋδρολυμένο άχυρο 23% DM το οποίο στην συνέχεια αραιώθηκε, ενώ για την τελευταία συνθήκη χρησιμοποιήθηκε προϋδρολυμένο άχυρο 30% DM το οποίο, επίσης, αραιώθηκε καταλλήλως.

Κατά την πραγματοποίηση των πειραμάτων μελετήθηκαν 3 παράμετροι:

Η αποδοτικότητα του *F. oxysporum* στην ζύμωση (SSF) και σύγκριση αυτής με την αντίστοιχη απόδοση του *S. cerevisiae*.

Η αποδοτικότητα των ενζύμων του *F. oxysporum* στην παράλληλη υδρόλυση των εναπομεινάντων ολιγοσακχαριτών κατά την διάρκεια της ζύμωσης και σύγκριση αυτής με την αντίστοιχη απόδοση εμπορικών ενζύμων Celluclast –Novozyme.

Η επίδραση του ποσοστού ξηρής μάζας και του ενζυμικού φορτίου.

Και οι 3 μελέτες έγιναν με σύγκριση των τελικών ποσοτήτων αιθανόλης που παράχθηκαν, οι οποίες μετρήθηκαν με αναλυτικό όργανο υγρής χρωματογραφίας (HPLC).

Οι ποσότητες των μικροοργανισμών που χρησιμοποιήθηκαν ήταν:

a) 15mg DCW/g DM *F.oxysporum* cells

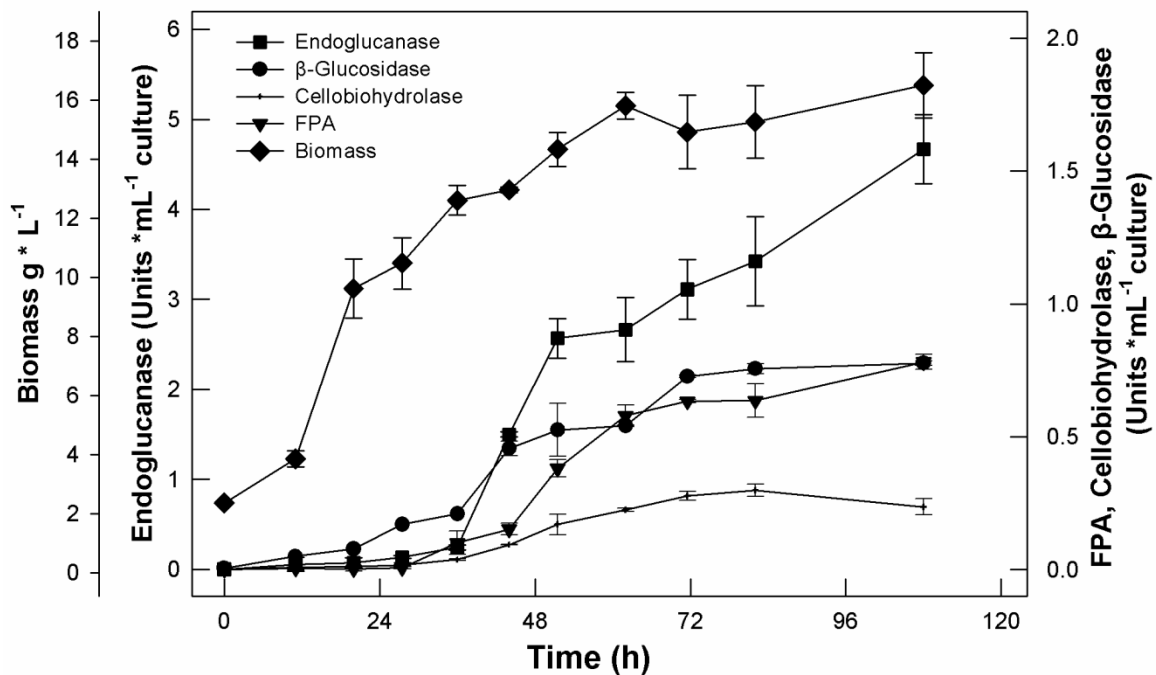
b) 5mg DCW/g DM *S. cerevisiae* cells

Οι ποσότητες των ενζύμων που χρησιμοποιήθηκαν ήταν 3 και 5 FPU/ g DM.

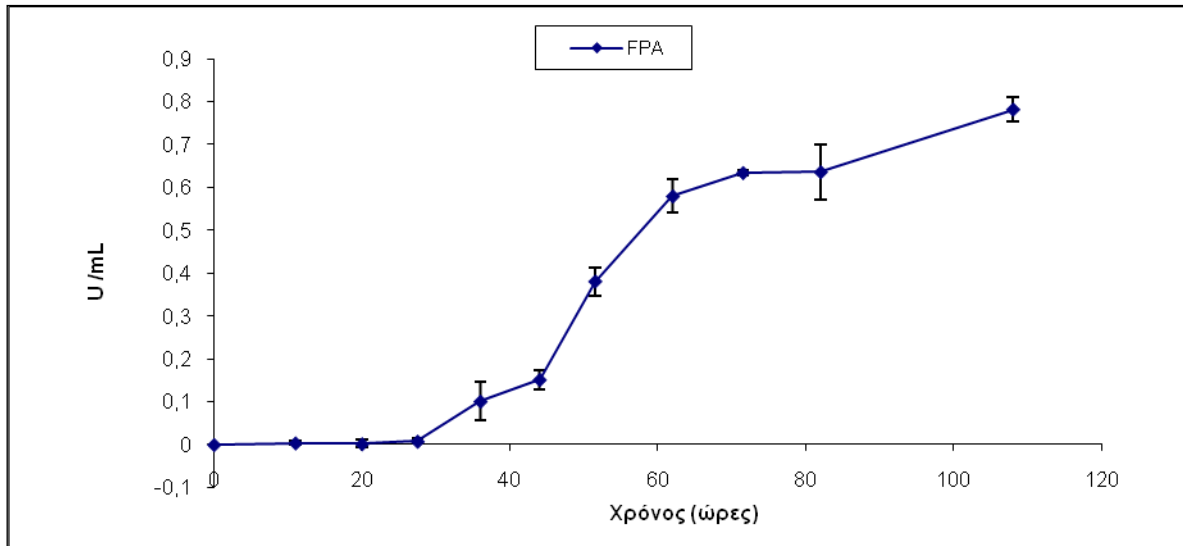
Κεφάλαιο 5: Αποτελέσματα - Σχολιασμός

5.1 Παραγωγή Ενζύμων από μύκητα *F. Oxysporum* σε βιοαντιδραστήρα βυθισμένης καλλιέργειας

Η συγκέντρωση των παραγόμενων εξωκυτταρικών ενζυμικών ενεργοτήτων σε συνάρτηση με το χρόνο φαίνεται, συνολικά, στο παρακάτω διάγραμμα. Η ανάπτυξη έγινε σε βιοαντιδραστήρα βυθισμένης καλλιέργειας όγκου 20 λίτρων (λειτουργικός όγκος 16 L).



Διάγραμμα 1: Παραγωγή εξωκυτταρικών ενζύμων του μύκητα *F. oxysporum* σε αντιδραστήρα βυθισμένης καλλιέργειας λειτουργικού όγκου 16 λίτρων.



Διάγραμμα 2: Παραγωγή κυτταρινασών σε αντιδραστήρα βυθισμένης καλλιέργειας, υπό ανάδευση 200 rpm. Ως υπόστρωμα χρησιμοποιήθηκε BG-CC 2-1.

Η FPA αποτελεί ένα μέτρο της συνδυαστικής ενεργότητας των κυτταρινολυτικών ενζύμων που παράγονται στην καλλιέργεια. Έτσι η μέτρηση της FPA κατά τη διάρκεια της καλλιέργειας χρησιμοποιείται σαν μέτρο αξιολόγησης της κυτταρινολυτικής ικανότητας του παραγόμενου ενζυμικού συστήματος. Παρατηρείται έντονη αύξηση της ενεργότητας μετά τις 30 ώρες και σταθεροποίηση της μετά τις 80 ώρες. Η μέγιστη τιμή της (0,7 Units/mL) παρατηρείται περίπου στις 70 ώρες.

Παρακάτω παρατίθεται συγκεντρωτικός πίνακας των ενεργοτήτων των ενζύμων:

| ENZYMATA | Ειδική ΕΝΕΡΓΟΤΗΤΑ (Units/FPU/G DM/G DM) |
|-------------------------------|--------------------------------------------|
| Ξυλανάση | 66,9375 |
| Σελοβιοϋδρολάση | 0,4375 |
| Β-Γλυκοζιδάση | 1,75 |
| α-L-Αραινοφουρανοζιδάση | 0,09375 |
| Β-Ξυλοζιδάση | 0,125 |
| Ενδογλουκανάση | 8,375 |
| Filter Paper Activity | 1 |
| Εστεράση του Φερουλικού Οξέος | 0,065625 |

Πίνακας 5: Συγκεντρωτικός πίνακας ενεργοτήτων εξωκυτταρικών ενζύμων μύκητα *F. oxysporum*

5.2 Ρευστοποίηση αχύρου σίτου

Τα πειράματα πραγματοποιήθηκαν σε δυο διαφορετικές συγκεντρώσεις αχύρου. Πιο συγκεκριμένα παρασκευάστηκαν μίγματα 23% και 30% επί της ξηρής μάζας του αχύρου. Για την παρασκευή των μιγμάτων χρησιμοποιήθηκε ρυθμιστικό διάλυμα Citrate/Phosphate (Citric Acid – Sodium Phosphate Dibasic) με $\text{pH}=5,5$. Τέλος, για την υδρόλυση των πολυσακχαριτών χρησιμοποιήθηκαν εμπορικά ένζυμα Celluclast – Novozyme 5FPU/g DM. Μετά από 15-30 λεπτά ισορροπίας η θερμοκρασία φθάσει το $50 \pm 1 \text{ }^\circ\text{C}$. Ο συνολικός χρόνος παραμονής είναι 6 h. Η θερμοκρασία κατά τη διάρκεια της υγροποίησης και σακχαροποίησης μετράται στους $50 \pm 1 \text{ }^\circ\text{C}$ [93]. Παρακάτω παρατίθεται φωτογραφίες από τις δυο διαφορετικές συνθήκες Dry Matter που πραγματοποιήθηκαν:



a)

b)



c)

Εικόνα 17: a) και b) Μίγμα αχύρου σίτου 30% DM και c) μίγμα αχύρου σίτου με 23% DM πριν την ρευστοποίηση.



a)

b)

Εικόνα 18: α) μίγμα αχύρου σίτου 30% DM και β) μίγμα αχύρου σίτου 23% DM **μετά** τη ρευστοποίηση

Τα συνολικά σάκχαρα που παράχθηκαν κατά την διεξαγωγή των 2 πειραμάτων παρουσιάζονται στον ακόλουθο πίνακα:

| Σάκχαρα (g/L)\ Πείραμα | 23% DM | 30% DM |
|----------------------------|---------------|---------------|
| Ολικά Σάκχαρα (g/L) | 27 (\pm 3) | 35 (\pm 3) |
| Glucose (g/L) | 10 (\pm 2) | 14(\pm 2) |
| Xylose (g/L) | 7 (\pm 2) | 9(\pm 2) |

Πίνακας 6: Παραγωγή σακχάρων κατά την προϋδρόλυση του αχύρου σίτου

Κατά τη διαδικασία της ρευστοποίησης η κυτταρίνη και η ημικυτταρίνη (πολυσακχαρίτης) που βρίσκονται στο άχυρο διασπώνται σε ολιγοσακχαρίτες (π.χ κελλοβιόζη) με τη βοήθεια των ενζύμων που προσθέσαμε .

Η προϋδρόλυση είναι μια διεργασία που έχει καθοριστικό ρόλο στην συνολική διαδικασία παραγωγής αιθανόλης από άχυρο σίτου. Με την προϋδρόλυση «προετοιμάζεται το έδαφος» για την ζύμωση με ταυτόχρονη υδρόλυση (SSF) κατά την οποία ο *S. cerevisiae* και ο *F. oxysporum* θα μεταβολίσουν τα ελεύθερα σάκχαρα ενώ παράλληλα τα ένζυμα που θα έχουν προστεθεί θα συνεχίζουν να υδρολύουν τους πολυσακχαρίτες που έχουν απομείνει στο σύστημα. Επειδή τα ένζυμα στην ποσότητα που είναι δεν μπορούν από μόνα τους να υδρολύσουν ολή την απαιτούμενη ποσότητα DM, με την προϋδρόλυση έχουμε συνεισφέρει σε ένα μεγάλο κομμάτι στη διάσπαση της δομής της κυτταρίνης και της ημικυτταρίνης και την παραγωγή ολιγοσακχαριτών.

5.3 Μελέτη της επίδρασης του μύκητα *F. oxysporum* στη ζύμωση με ταυτόχρονη υδρόλυση (SSF) του προκατεργασμένου αχύρου (PWS) με την χρήση ενζύμων

Για την μελέτη της επίδρασης του *F. oxysporum* στη ζύμωση του αχύρου πραγματοποιήθηκαν πειράματα σε άχυρο με διαφορετικά ποσοστά ξηρής μάζας. Πιο συγκεκριμένα, μελετήθηκαν συστήματα με 10%, 15%, 20% και 25% επί της ξηρής μάζας του αχύρου. Για τις πρώτες 3 συνθήκες χρησιμοποιήθηκε προϋδρολυμένο άχυρο 23% DM το οποίο στην συνέχεια αραιώθηκε, ενώ για την τελευταία συνθήκη χρησιμοποιήθηκε προϋδρολυμένο άχυρο 30% DM το οποίο, επίσης, αραιώθηκε καταλλήλως.

Κατά την πραγματοποίηση των πειραμάτων μελετήθηκαν 3 παράμετροι:

Η αποδοτικότητα του *F. oxysporum* στην ζύμωση (SSF) και σύγκριση αυτής με την αντίστοιχη απόδοση του *S. cerevisiae*.

Η αποδοτικότητα των ενζύμων του *F. oxysporum* στην παράλληλη υδρόλυση των εναπομεινάντων ολιγοσακχαριτών κατά την διάρκεια της ζύμωσης και σύγκριση αυτής με την αντίστοιχη απόδοση εμπορικών ενζύμων Celluclast –Novozyme.

Η επίδραση του ποσοστού της ξηρής μάζας και του ενζυμικού φορτίου στην παραγωγή αιθανόλης.

Και οι 3 μελέτες έγιναν με σύγκριση των τελικών ποσοτήτων αιθανόλης που παράχθηκε. Συνοψίζοντας, πραγματοποιήθηκαν πειράματα με τις εξής συνθήκες:

| DM | 10% | | | 15% | | | 20% | | | 25% | |
|-----------------|------|----|-----|------|----|-----|------|----|-----|-----------|----|
| Μικροοργανισμός | F.Ox | | S.C | F.Ox | | S.C | F.Ox | | S.C | F.Ox, S.C | |
| Ένζυμα | F.Ox | CN | CN | F.Ox | CN | CN | F.Ox | CN | CN | F.Ox | CN |
| FPU/G DM/G DM | 3 | 3 | - | 3 | 3 | - | 3 | 3 | - | - | - |
| | 5 | 5 | 5 | 5 | 5 | 5 | 5 | 5 | 5 | 5 | 5 |

Πίνακας 7: Συγκεντρωτικός Πίνακας παρουσίασης των συνθηκών των πειραμάτων που πραγματοποιήθηκαν

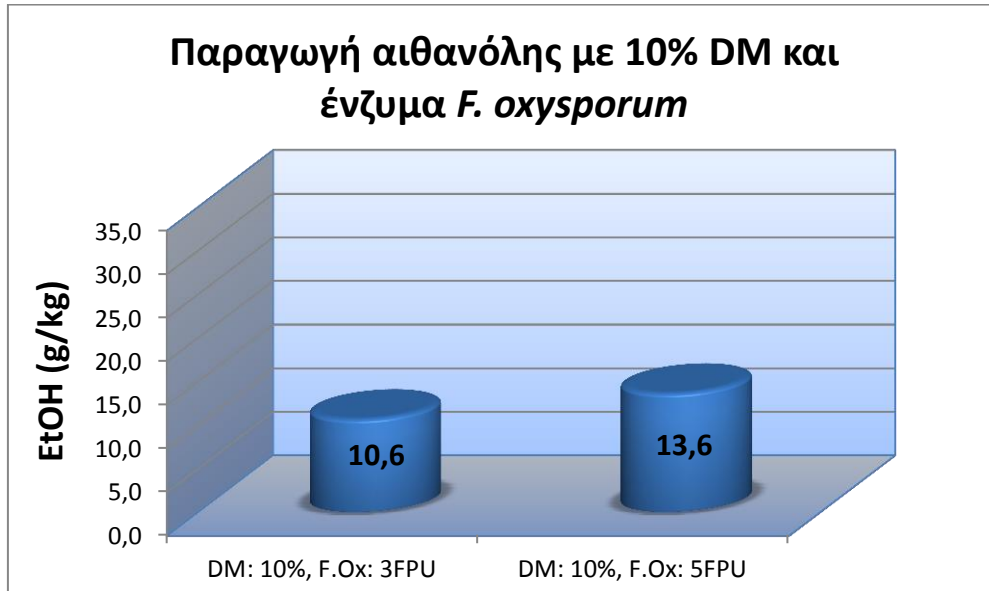
Όπου **F.Ox:** *F. oxysporum*, **S.C:** *Saccharomyces Cerevisiae*, **CN:** Celluclast-Novozyme

Κάθε συνθήκη πραγματοποιήθηκε με επαναληψιμότητα 2 για πιο αξιόπιστα και ακριβή αποτελέσματα.

5.2.1 Αποτελέσματα

Παρακάτω παρατίθενται γραφήματα με τις τελικές συγκεντρώσεις αιθανόλης που παράχθηκε μετρημένες σε $\text{g αιθανόλης/kg ρευστού}$.

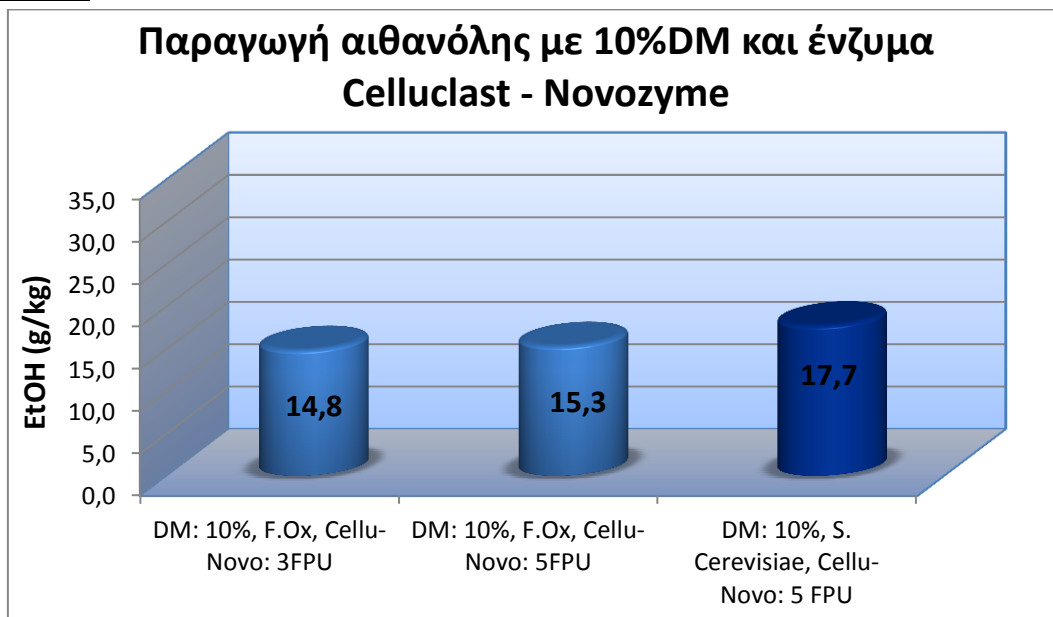
1. Ζύμωση σε 10% DM με μικροοργανισμό και ένζυμα *F. oxysporum*



Γράφημα 1: Ζύμωση σε 10% DM με κύτταρα και ένζυμα *F. oxysporum*

Όπως παρουσιάζεται στο ανωτέρω γράφημα, η παραγωγή αιθανόλης σε 10% ξηρής μάζας και παρουσία κυττάρων *F. Oxysporum*, με 3FPU/g DM ενζύμων *F. oxysporum* βρέθηκε ίση με 10,607g/kg ρευστού ενώ για 5 FPU/g DM ενζυμικό φορτίο είναι ίση με 13,572 g/kg.

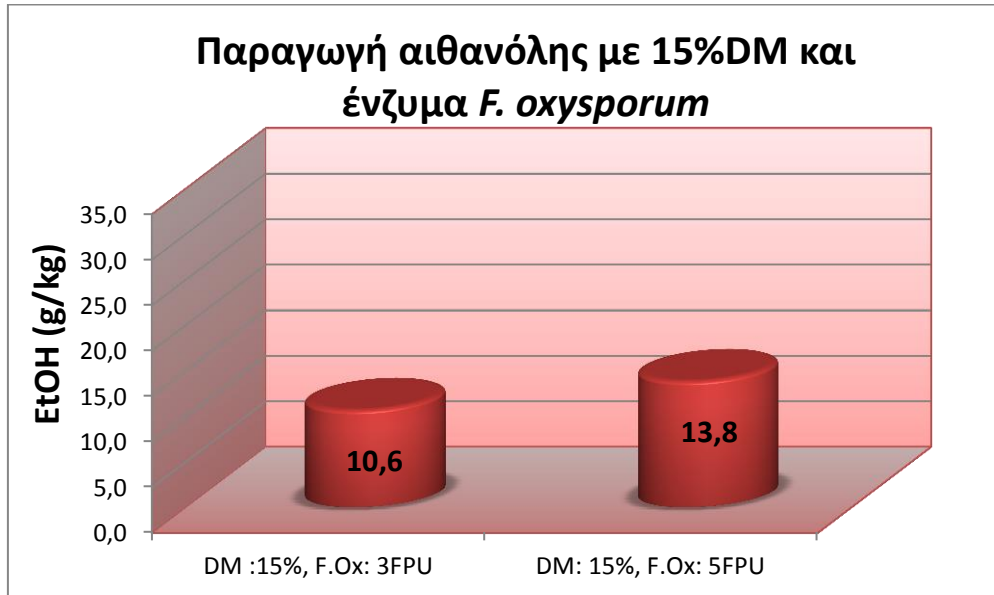
2. Ζύμωση σε 10% DM με μικροοργανισμό *F. oxysporum* και εμπορικά ένζυμα Celluclast - Novozyme



Γράφημα 2: Ζύμωση σε 10% DM με κύτταρα *F. oxysporum*, και εμπορικά ένζυμα Celluclast – Novozyme

Όπως παρουσιάζεται στο γράφημα, η παραγωγή αιθανόλης σε 10% ξηρής μάζας και παρουσία κυττάρων *F. oxysporum* με 3FPU/g DM ενζύμων Celluclast-Novozyme βρέθηκε ίση με 14,8 g/kg ρευστού ενώ για 5 FPU/g DM ενζυμικό φορτίο είναι ίση με 15,3 g/kg. Παρουσία του μικροοργανισμού *S. cerevisiae* (σκούρο μπλε χρώμα) η ποσότητα της αιθανόλης που παρήχθει είναι ίση με 11,2 g/kg. Παρατηρείται ότι η απόδοση του μύκητα *F. oxysporum* είναι αρκετά ικανοποιητική συγκριτικά με εκείνη της ζύμης.

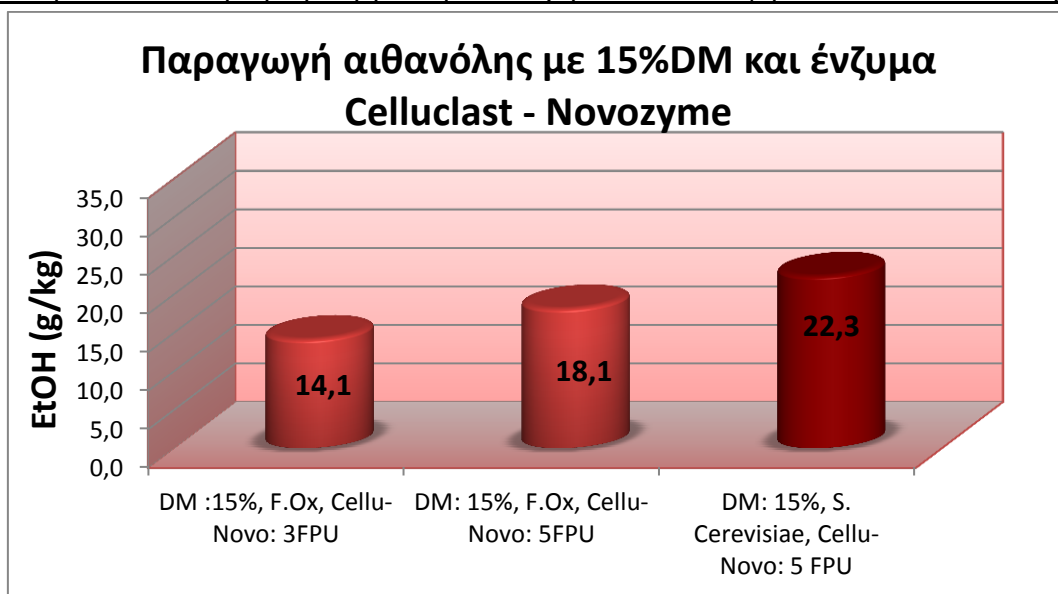
3. Ζύμωση σε 15% DM με μικροοργανισμό και ένζυμα *F. oxysporum*



Γράφημα 3: Παραγωγή αιθανόλης σε 15% DM με κύτταρα και ένζυμα *F. oxysporum*

Σύμφωνα με το παραπάνω γράφημα, η παραγωγή αιθανόλης σε 15% ξηρής μάζας και παρουσία κυττάρων *F. oxysporum* με 3 FPU/g DM ενζύμων *F. oxysporum* βρέθηκε ίση με 10,6 g/kg ρευστού ενώ για 5 FPU/g DM ενζυμικό φορτίο είναι ίση με 13,8 g/kg.

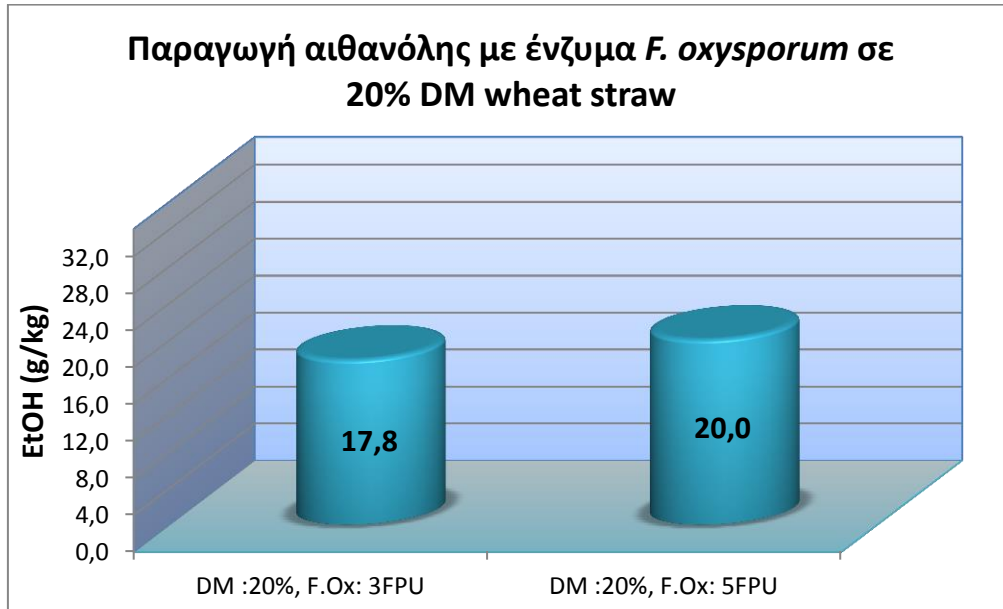
4. Ζύμωση σε 15% DM με μικροοργανισμό *F. oxysporum* και ένζυμα Celluclast – Novozyme



Γράφημα 4: Παραγωγή αιθανόλης σε 15% DM με κύτταρα *F. oxysporum*, και ένζυμα Celluclast - Novozyme

Σύμφωνα με το γράφημα 4, η παραγωγή αιθανόλης σε 15% ξηρής μάζας και παρουσία κυττάρων *F. oxysporum* με 3 FPU/g DM ενζύμων Celluclast - Novozyme βρέθηκε ίση με 14,1 g/kg ρευστού ενώ για 5 FPU/g DM ενζυμικό φορτίο είναι ίση με 18,1 g/kg. Η παραγωγή αιθανόλης παρουσία του *S. cerevisiae* (σκούρο κόκκινο χρώμα) είναι ίση με 13,3 g/kg.

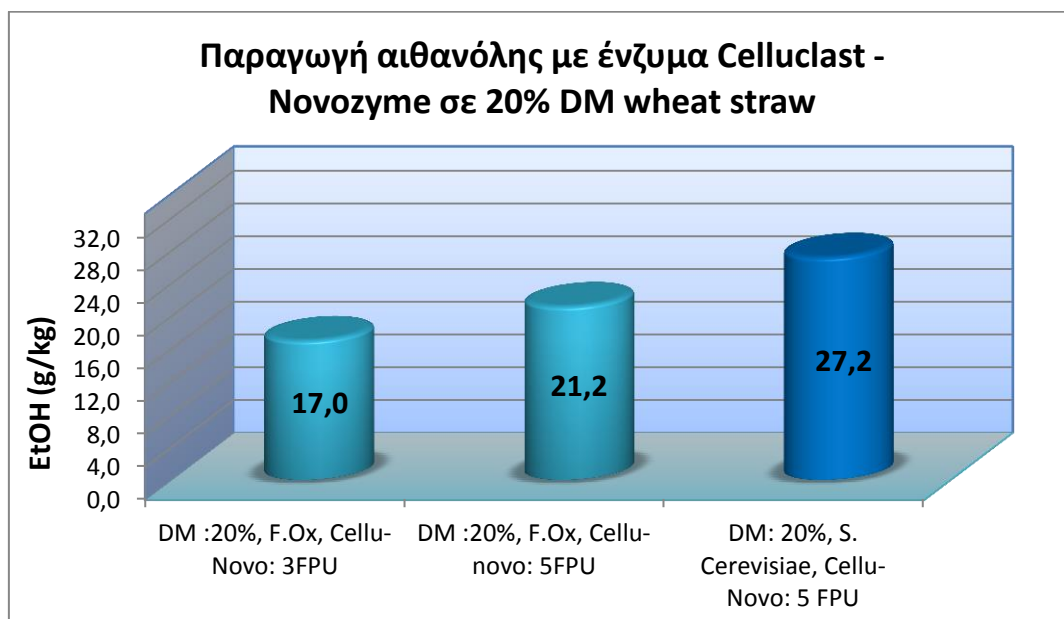
5. Ζύμωση σε 20% DM με μικροοργανισμό και ένζυμα *F. oxysporum*



Γράφημα 5: Παραγωγή αιθανόλης σε 20% DM με κύτταρα και ένζυμα *F. oxysporum*

Σύμφωνα με το παραπάνω γράφημα, η παραγωγή αιθανόλης σε 20% ξηρής μάζας και παρουσία κυττάρων *F. oxysporum* με 3FPU/g DM ενζύμων *F. oxysporum* βρέθηκε ίση με 17,8 g/kg ρευστού ενώ για 5FPU/g DM ενζυμικό φορτίο είναι ίση με 20,0 g/kg.

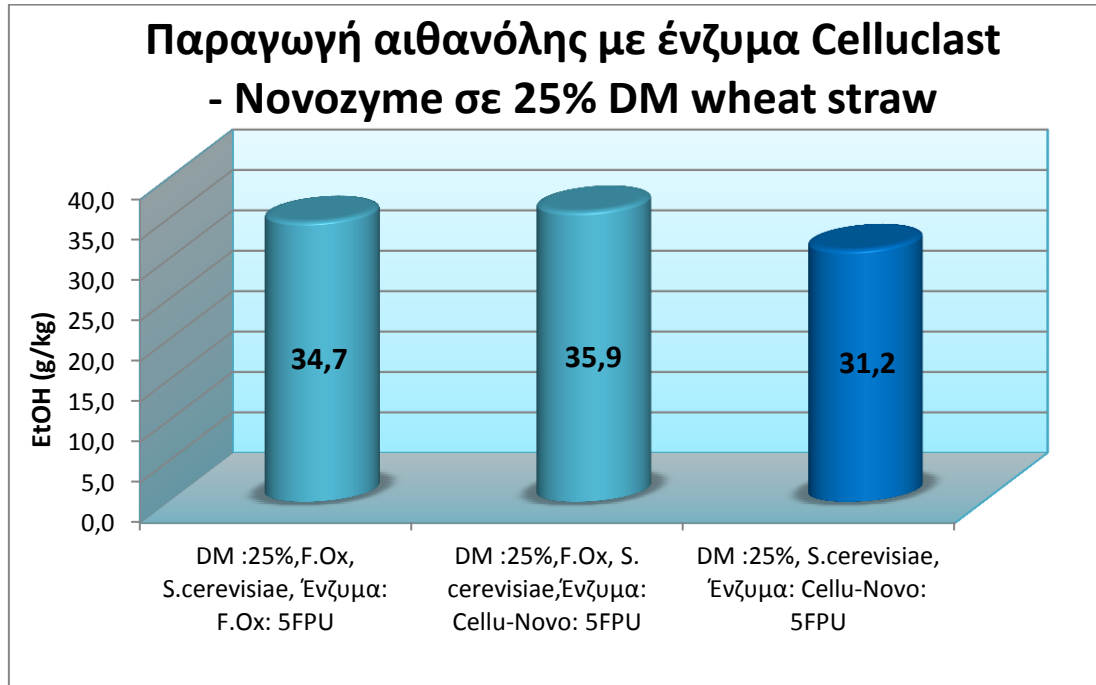
6. Ζύμωση σε 20% DM με μικροοργανισμό *F. oxysporum* και ένζυμα Celluclast – Novozyme



Γράφημα 6: Παραγωγή αιθανόλης σε 20% DM με κύτταρα *F. oxysporum* και ένζυμα Celluclast - Novozyme

Όπως φαίνεται στο γράφημα 6, η παραγωγή αιθανόλης σε 20% ξηρής μάζας και παρουσία κυττάρων *F. oxysporum* με 3FPU/g DM ενζύμων Celluclast - Novozyme βρέθηκε ίση με 17 g/kg ρευστού ενώ για 5 FPU/g DM ενζυμικό φορτίο είναι ίση με 21,2 g/kg. Παρουσία της ζύμης *S. cerevisiae* παράχθηκε ποσότητα αιθανόλης ίση με 16,2 g/kg.

7. Ζύμωση σε 25% DM με μικροοργανισμούς *F. oxysporum* και *S. cerevisiae*



Γράφημα 7: Παραγωγή αιθανόλης σε 25% DM με κύτταρα *F. oxysporum*, *S. cerevisiae* και ένζυμα Celluclast - Novozyme

Για 25% DM πραγματοποιήθηκε πείραμα μόνο με το **μέγιστο εξεταζόμενο ενζυμικό φορτίο** (5 FPU/G DM/G DM) παρουσία 2 μικροοργανισμών, του μύκητα *F. oxysporum* και της ζύμης *S. cerevisiae*. Έτσι η παραγωγή αιθανόλης σε 25% ξηρής μάζας με 5 FPU/g DM ενζύμων *F. oxysporum* βρέθηκε ίση με 34,7 g/kg ρευστού. Στο δεύτερο πείραμα που πραγματοποιήθηκε σε 25% DM μελετήθηκε η δράση των εμπορικών ενζύμων Celluclast - Novozyme. Έτσι η παραγωγή αιθανόλης σε 25% ξηρής μάζας με 5 FPU/g DM ενζύμων Celluclast - Novozyme βρέθηκε ίση με 35,945 g/kg ρευστού.

Για σύγκριση της αποδοτικότητας των συνθηκών αυτών πραγματοποιήθηκε πείραμα παρουσία μόνο της ζύμης *S. cerevisiae* με το ίδιο ενζυμικό φορτίο ενζύμων Celluclast - Novozyme (μπλε σκούρο χρώμα). Η παραγωγή της αιθανόλης βρέθηκε ίση με 31,2 γραμμάρια ανά χιλιόγραμμο ρευστού.

5.3.2 Σχολιασμός

A. Σύγκριση ενζυμικών φορτίων 3 FPU/g DM – 5 FPU/g DM:

Μελετώντας προσεκτικά τα διαγράμματα της ενότητας 5.3.1 εύκολα παρατηρεί κανείς ότι σε κάθε πείραμα με ενζυμικό φορτίο των 5 FPU/g DM παράχθηκε μεγαλύτερη ποσότητα αιθανόλης συγκριτικά με το ενζυμικό φορτίο των 3 FPU/g DM. Η διαπίστωση αυτή είναι κοινή για όλα τα διαφορετικά ποσοστά Dry Matter και για όλους τους τύπους ενζύμων που χρησιμοποιήθηκαν (*F. oxysporum* και Celluclast – Novozyme). Όπως ήταν αναμενόμενο, μεγαλύτερο ενζυμικό φορτίο έχει ως αποτέλεσμα μεγαλύτερη παραγωγή αιθανόλης. Η αύξηση αυτή οφείλεται στο γεγονός ότι η παρουσία περισσότερων ενζύμων στο σύστημα αυξάνει τον βαθμό της υδρόλυσης των εναπομειναντων ολιγοσακχαριτών. Πιο συγκεκριμένα, με την βοήθεια των ενζύμων υδρολύονται οι γλυκοζιτικοί δεσμοί στους πιθανούς δισακχαρίτες κελλοβιοζών, οι οποίοι προέρχονται από την κυτταρίνη του αχύρου με αποτέλεσμα να ελευθερώνονται περισσότερα μόρια γλυκόζης. Όσον αφορά την ημι-κυτταρίνη υπάρχει μια μεγαλύτερη ποικιλία πολυσακχαριτών και μονοσακχαριτών. Ειδικότερα, πιθανοί πολυσακχαρίτες προερχόμενοι από την ημι-κυτταρίνη του αχύρου, όπως γλυκουρονοξυλάνες, αραβινογαλακτάνες, αραβινογλυκουρονοξυλάνες, ξυλογλυκάνες και γαλακτογλυκομαννάνες υδρολύονται λόγω της δράσης των ενζύμων που υπάρχουν στο σύστημα και έτσι παράγονται σάκχαρα όπως ξυλόζες, αραβινόζες, ραμνόζες, φουκόζες, μαννόζες, γαλακτόζες κ.α. Κατά συνέπεια, παράλληλα με την ζύμωση, απελευθερώνονται, εκ νέου, ελεύθερα σάκχαρα, τα οποία είναι διαθέσιμα για ζύμωση. Με αύξηση του αριθμού των ελεύθερων σακχάρων στο σύστημα συνεπάγεται αύξηση στην ποσότητα της παραγόμενης αιθανόλης.

B. Σύγκριση διαφορετικών ποσοστών ξηρής μάζας (% DM):

Συγκρίνοντας τα αποτελέσματα για τις 4 διαφορετικές συνθήκες ξηρής μάζας που μελετήθηκαν (10% - 15% - 20% - 25%) παρατηρείται ότι με αύξηση της ξηρής μάζας συνεπάγεται αύξηση της παραγόμενης αιθανόλης. Η αύξηση αυτή οφείλεται στο γεγονός ότι όσο αυξάνεται το ποσοστό του Dry Matter το σύστημα γίνεται πιο «πλούσιο» στους πολυσακχαρίτες κυτταρίνης, ημι-κυτταρίνης και λιγνίνης. Εφόσον υπάρχει περισσότερη πρώτη ύλη είναι αναμενόμενη η αυξημένη παραγωγή αιθανόλης.

C. Σύγκριση της δράσης των ενζύμων *F. oxysporum* – Celluclast Novozyme:

Τα πειράματα σε 10%,15%,20% και 25% DM πραγματοποιήθηκαν τόσο με την χρήση εμπορικών ενζύμων Celluclast – Novozyme όσο και με την χρήση ενζύμων *F. oxysporum* που παράχθηκαν εργαστηριακά. Η σύγκριση των αποτελεσμάτων οδηγεί στο συμπέρασμα ότι παρόλο που η δράση των εμπορικών ενζύμων είναι σαφώς καλύτερη, όπως άλλωστε αναμενόταν, η δράση των ενζύμων του *F. oxysporum* είναι αρκετά καλή και μάλιστα σε κάποια πειράματα προσεγγίζει κατά πολύ τα αποτελέσματα των εμπορικών ενζύμων. Χαρακτηριστικά αναφέρεται ότι για 20% DM η παραγωγή αιθανόλης με 5 FPU/G DM/G DM ενζύμων *F. oxysporum* βρέθηκε ίση με 20g μόλις 1 γραμμάριο χαμηλότερη από την ποσότητα που παράχθηκε με την χρήση εμπορικών ενζύμων. Εξίσου καλή ήταν και η απόδοση των ενζύμων του μύκητα *F. oxysporum* σε 25% DM όπου η αποτελεσματικότητα της δράσης τους στην παραγωγή αιθανόλης πλησιάζει κατά πολύ εκείνη των

εμπορικών ενζύμων. Συνεπώς, εύκολα προκύπτει το συμπέρασμα ότι σε υψηλό dry matter, αυξάνεται η αποτελεσματικότητα των ενζύμων του *F. oxysporum*. Αυτό οφείλεται στο γεγονός ότι το σύστημα σε υψηλότερα dry matter είναι πιο πλούσιο σε ημικυτταρίνη, συνεπώς τα ένζυμα του *F. oxysporum* έχουν περισσότερη «τροφή».

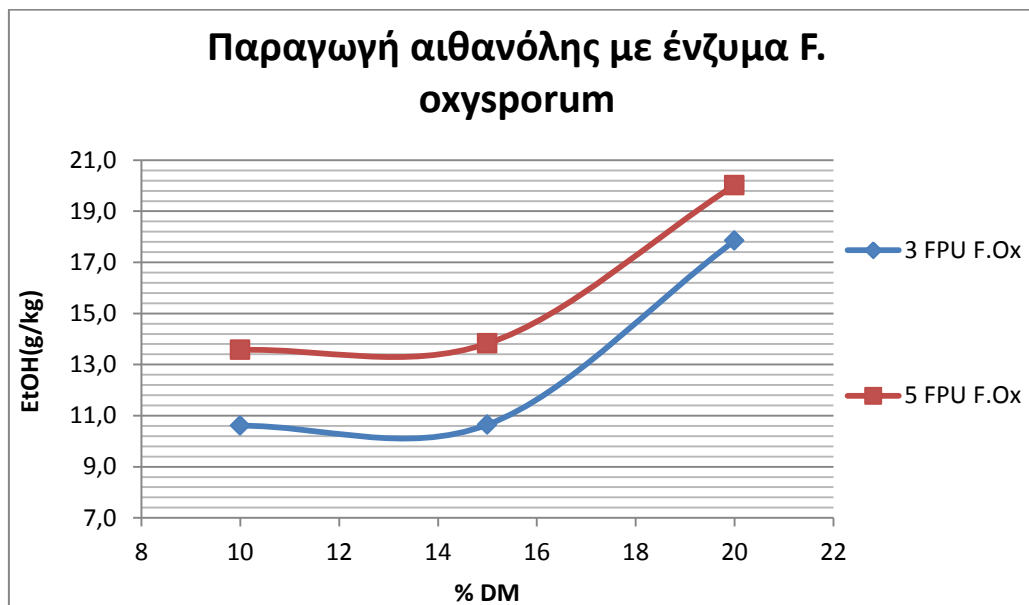
D. Σύγκριση της δράσης των μικροοργανισμών *F. oxysporum* – *S. cerevisiae*:

Συγκρίνοντας τα γραφήματα 2,4,6 παρατηρούμε ότι σε όλες τις περιπτώσεις η αιθανόλη που παράχθηκε στο σύστημα με μικροοργανισμό τον *S. cerevisiae* ήταν μεγαλύτερη συγκριτικά με την αιθανόλη που παράχθηκε χρησιμοποιώντας κύτταρα του μύκητα *F. oxysporum*. Παρόλα αυτά, η απόδοση του συστήματος με *F. oxysporum* ως μικροοργανισμό για την ζύμωση του προϋδρολυμένου αχύρου κρίνεται αρκετά αποδοτικό παρά τους παρεμποδιστές που υπάρχουν στο άχυρο έπειτα από την προκατεργασία του αχύρου. Από τα πειράματα που πραγματοποιήθηκαν σε 25% DM παρουσία και των δυο μικροοργανισμών μαζί εξάγεται το συμπέρασμα ότι η συνεργιστική δράση της ζύμης μαζί με τον μύκητα οδηγεί σε υψηλότερα ποσά παραγόμενης αιθανόλης. Πιο συγκεκριμένα, από τα γράφημα 7 προκύπτει ότι η ποσότητα της αιθανόλης που παράγεται, παρουσία σκέτης ζύμης είναι ίση με 31 g/Kg, ενώ με συνδυασμό *F. oxysporum* και *S. cerevisiae* στη ζύμωση τα αποτελέσματα είναι κατά 3 και 4 γραμμάρια υψηλότερα.

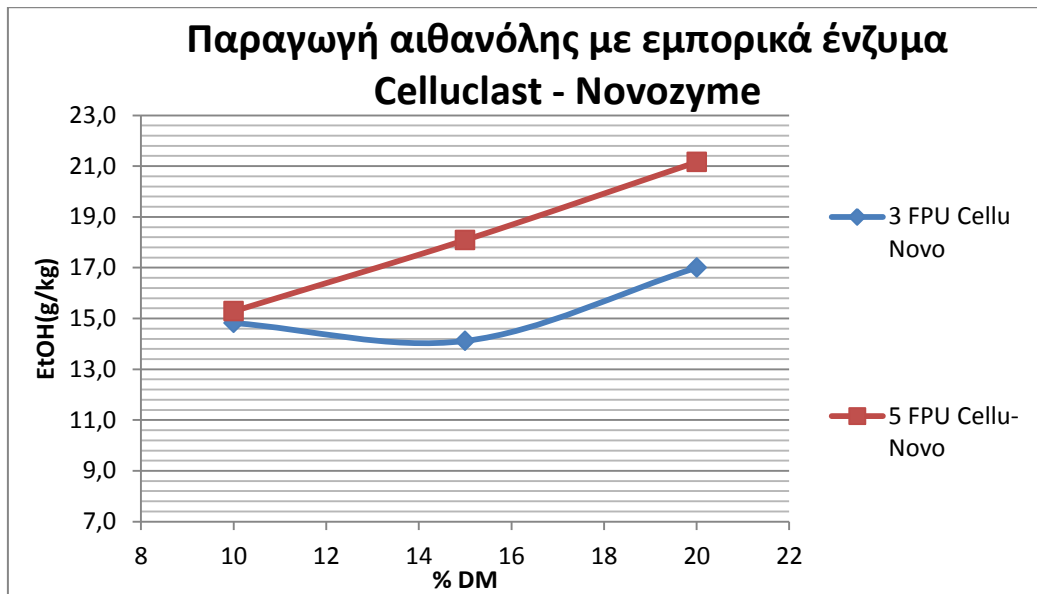
E. Συνοψίζοντας:

Παρακάτω παρατίθεται σύνοψη των παραπάνω συμπερασμάτων σε δυο συνολικά διαγράμματα που δείχνουν πως μεταβάλλεται η απόδοση της ζύμωσης συναρτήσει:

- α) του ποσοστού ξηρής μάζας,
- β) του ενζυμικού φορτίου
- γ) του είδους του ενζύμου



α)



b)

Διάγραμμα 3: α) Παραγωγή αιθανόλης με ένζυμα *F. oxysporum* και β) παραγωγή αιθανόλης με εμπορικά ένζυμα Celluclast – Novozyme

Παρατήρηση: Τα πειράματα που πραγματοποιήθηκαν με χρήση 3 και 5 FPU/G DM/G DM ενζύμων Celluclast – Novozyme παρουσιάζουν μια σχετική γραμμική αύξηση των παραγόμενων γραμμαρίων αιθανόλης συναρτήσει του ποσοστού ξηρής μάζας. Επιπλέον, και στα 2 διαγράμματα φαίνεται ξεκάθαρα πως η παραγωγή αιθανόλης αυξάνεται με την αύξηση του ενζυμικού φορτίου αφού και στις δυο περιπτώσεις η κόκκινη γραμμή βρίσκεται πιο πάνω από την μπλε.

Κεφάλαιο 6: Συμπεράσματα – Προτάσεις

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

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

- ✓ Το ενζυμικό εκχύλισμα που παράγεται έχει ικανοποιητικές τιμές ενεργότητας σε όλα τα απαραίτητα για τη σακχαροποίηση των κυτταρινούχων υποστρωμάτων, ένζυμα.
- ✓ Η προϋδρόλυση έχει βασικό ρόλο το να επιτευχθεί όσο το δυνατόν καλύτερο αποτέλεσμα, συνεισφέροντας στη δουλειά των ενζύμων (την υδρόλυση της κυτταρίνης) και παρέχοντας άμεσα σάκχαρα που θα μεταβολίσει ο μύκητας και η ζύμη.
- ✓ Τα ένζυμα του *F. oxysporum* υδρολύουν ικανοποιητικά τον πολυσακχαρίτη της ημικυτταρίνης (συγκριτικά με τα εμπορικά ένζυμα) συνεπώς προτιμώνται σε άχυρο με μεγάλο ποσοστό ημικυτταρίνης όπως αυτό που χρησιμοποιήθηκε στο πείραμα (38% κυτταρίνη – 22% ημικυτταρίνη). Αποτέλεσμα της δράσης των ενζύμων, κατά την διάρκεια της ζύμωσης, είναι η ταυτόχρονη απελευθέρωση ελεύθερων μονοσακχαριτών οι οποίοι χρησιμοποιούνται εκ νέου στη ζύμωση, παράγοντας έτσι μεγαλύτερη ποσότητα αιθανόλης. Την πρόταση αυτή δικαιολογούν τα αποτελέσματα των πειραμάτων που πραγματοποιήθηκαν σε 25% DM παρουσία ενζύμων *F. oxysporum* αφού η παραγωγή αιθανόλης με τη χρήση ενζύμων του μύκητα (34,7 g/kg) προσεγγίζει κατά πολύ την ποσότητα που παράχθηκε με τη χρήση εμπορικών ενζύμων Celluclast – Novozyme (35,9 g/kg). Ωστόσο, τα ένζυμα του *F.oxysporum* θεωρούνται αρκετά ευαίσθητα στις συνθήκες της ζύμωσης όπως πχ. η θερμοκρασία καθώς επίσης και η ύπαρξη παρεμποδιστών στο σύστημα.
- ✓ Η αύξηση στο ποσοστό της ξηρής μάζας οδηγεί σε αυξημένη παραγωγή αιθανόλης.
- ✓ Η αύξηση του ενζυμικού φορτίου αυξάνει την απόδοση της ζύμωσης με παράλληλη υδρόλυση οδηγώντας σε αυξημένη παραγωγή αιθανόλης.
- ✓ Η ταυτόχρονη προσθήκη ζύμης *S. cerevisiae* και μύκητα *F. Oxysporum* οδηγεί σε καλύτερα αποτελέσματα. Το συμπέρασμα αυτό, προκύπτει λόγω των αποτελεσμάτων που έδωσε το σύστημα με 25% DM. Πιο συγκεκριμένα, παρουσία μόνο ζύμης παράχθηκαν 31,2 γραμμάρια αιθανόλης ενώ η παραγωγή αιθανόλης σε σύστημα παρουσία και των δυο μικροοργανισμών *F. oxysporum* και *S. cerevisiae* ήταν σαφώς μεγαλύτερη. Τα αποτελέσματα αυτά αποδεικνύουν πως η προσθήκη του μύκητα στη ζύμωση του αχύρου αυξάνει την αποτελεσματικότητα της διεργασίας.

Προτάσεις

Λαμβάνοντας υπ' όψιν τα παραπάνω προτείνεται η χρήση του ενζυμικού συστήματος του *F. oxysporum* σε διεργασίες ταυτόχρονης σακχαροποίησης και ζύμωσης. Παράλληλα, προτείνονται ορισμένες αλλαγές στον τρόπο διεξαγωγής των παραπάνω πειραμάτων για να έχουμε πιο επιθυμητά αποτελέσματα. Προτείνεται η περαιτέρω βελτίωση της προϋδρόλυσης:

1. Αύξηση της ξηρής μάζας (DM) και του ενζυμικού φορτίου για μεγαλύτερη παραγωγή αιθανόλης, όπως αποδείχθηκε παραπάνω από τα γραφήματα και τα διαγράμματα.
2. Προσθήκη ενζύμων *F. oxysporum* σε υψηλά dry matter, αντί για τα εμπορικά Celluclast – Novozyme.
3. Αφαίρεση της αιθανόλης κατά την διάρκεια της ζύμωσης, επιτυγχάνοντας συνεχή διεργασία. Έχει αποδειχθεί ότι ο μύκητας *F. oxysporum* σε υψηλές συγκεντρώσεις αιθανόλης (περίπου 3-3,5% w/w) χάνει την αποτελεσματικότητά του.
4. Ταυτόχρονη προσθήκη ζύμης και μύκητα για μεγαλύτερη απόδοση της διεργασίας. Ειδικότερα, προτείνεται η προσθήκη του μύκητα στο πρώτο στάδιο της ζύμωσης ώστε να του δοθεί ο απαιτούμενος χρόνος προσαρμογής προκειμένου να μεταβολίσει «στοχευμένα» την διαθέσιμη ημικυτταρίνη και στην συνέχεια να γίνει η προσθήκη της ζύμης για περαιτέρω ζύμωση της κυτταρίνης.

Βιβλιογραφία

- [1] Demirbas A. Ethanol from cellulosic biomass resources. *Int J Green Ener* 1, pp. 79–87, 2004.
- [2] Wildenborg T., Lokhorst A. Introduction on CO₂ Geological storage-classification of storage options. *Oil Gas Sci Technol Rev IFP* 60, pp. 513–5, 2005.
- [3] Demirbas A. Ethanol from cellulosic biomass resources. *Int J Green Ener* 1, pp. 79–87, 2004.
- [4] Κοδοσάκης Ε. Δημήτρης, *Διαχείριση φυσικών πόρων και ενέργεια*, σελ. 233-240, εκδ. Α.Σταμούλη, Αθήνα, 1994.
- [5] Κέντρο Ανανεώσιμων Πηγών Ενέργειας (ΚΑΠΕ), <http://www.cres.gr>
- [6] Demirbas, A. 2003. "Biodiesel fuels from vegetable oils via catalytic and noncatalytic supercritical alcohol transesterifications and other methods: A survey." *Energy Conversion and Management*. 44:2093–2109.
- [7] Τουλούμης Α. Γεώργιος, 2010, Βιοκαύσιμα στον Τομέα των Μεταφορών, 125 σελίδες Εθνικό Μετσόβιο Πολυτεχνείο, Αθήνα.
- [8] IEA, 2004. *Biofuels for Transport: An International Perspective*. International Energy Agency, Paris. Available at <http://www.iea.org/textbase/nppdf/free/2004/biofuels2004.pdf>.
- [9] FAO, 2009. *Small-Scale Bioenergy Initiatives: Brief Description and Preliminary Lessons on Livelihood Impacts from Case Studies in Asia, Latin America and Africa*. Food and Agricultural Organization, Rome. Available at <http://www.fao.org/docrep/011/aj991e/aj991e00.html>.
- [10] Alexandros Gasparatos, Per Stromberg, Kazuhiko Takeuchi, *Biofuels, ecosystem services and human wellbeing: Putting biofuels in the ecosystem services narrative*, pp.111-112,114-128,2011
- [11] Abramovay, R., 2008. *A Political-cultural Approach to the Biofuel Market in Brazil*. Department of Economics and Administration, University of Sao Paulo, Sao Paulo. Available at http://www.abramovay.pro.br/artigos_jornal/2008/Abramovay_Ethanol_biodiesel_Brazil_political_cultural_approach.pdf.
- [12] IEA, 2010a. *Sustainable Production of Second-generation Biofuels: Potential and Perspectives in Major Economies and Developing Countries*. International Energy Agency, Paris. Available at http://www.iea.org/papers/2010/second_generation_biofuels.pdf.
- [13] Youngquist, W. *Geodesinies*, National Book company, Portland, OR, 499p.
- [14] "The dirty truth about biofuels". *Oilcrash.com*. 14 March 2005. Retrieved 27 August 2011.
- [15] Klein, Donald W.; Lansing M.; Harley, John (2006). *Microbiology* (6th ed.). New York:McGraw-Hill. ISBN 978-0-07-255678-0.

- [16] AP Biology. Anestis, Mark. 2nd Edition. McGraw-Hill Professional. 2006. ISBN 978-0-07-147630-0.
- [17] [meti.go.jp file g30819b40j](#)" (PDF). Retrieved 27 August 2011.
- [18] "(grainscouncil.com, Biofuels_study 268 kB pdf, footnote, p 6)". Web.archive.org. 18 July 2008. Archived from the original on 18 July 2008. Retrieved 27 August 2011.
- [19] Martin LaMonica (12 June 2008). "Algae farm in Mexico to produce ethanol in '09". Retrieved 27 August 2011.
- [20] "Towards Sustainable Production and Use of Resources: Assessing Biofuels". United Nations Environment Programme. 16 October 2009. Retrieved 24 October 2009.
- [21] Renewable Fuels Association (6 March 2012). "Accelerating Industry Innovation – 2012 Ethanol Industry Outlook". Renewable Fuels Association. Retrieved 18 March 2012. *See pp. 3, 8, 10 22 and 23.*
- [22] "Gasoline Gallon Equivalent (GGE) Definition". energy.gov. Retrieved 12 October 2011.
- [23] Worldwatch Institute and Center for American Progress (2006). *American energy: The renewable path to energy security*
- [24] O. R. Inderwildi, D. A. King (2009). "Quo Vadis Biofuels". *Energy & Environmental Science* **2** (4): 343.
- [25] Biotechnology Industry Organization (2007). *Industrial Biotechnology Is Revolutionizing the Production of Ethanol Transportation Fuel* pp. 3–4.
- [26] "Produção Motocicletas 2011" [2011 Motorcycle Production. Retrieved 21 January 2012.
- [27] [www.eia.doe.gov DOE FAQ](#)
- [28] [www.afdc.energy.gov Energy.gov site](#)
- [29] [www.eia.doe.gov Alternative Fuel Efficiencies in Miles per Gallon](#)
- [30] "EPA Info". US EPA. 7 March 2011. Retrieved 27 August 2011.
- [31] J. Goettemoeller, A. Goettemoeller (2007). *Sustainable Ethanol: Biofuels, Biorefineries, Cellulosic Biomass, Flex-Fuel Vehicles, and Sustainable Farming for Energy Independence*. Prairie Oak Publishing, Maryville, Missouri. p. 42. ISBN 978-0-9786293-0-4.
- [32] "Changes in Gasoline IV, sponsored by Renewable Fuels Foundation" (PDF). Retrieved 27 August 2011.
- [33] *Green Dreams* J.K. Bourne JR, R. Clark National Geographic Magazine October 2007 p. 41 Article.

- [34] Farid Talebnia, Dimitar Karakashev, Irini Angelidaki, Production of bioethanol from wheat straw: An overview on pretreatment, hydrolysis and fermentation, pp.4744-4753, 2009.
- [35] Ballesteros, I., Negro, M.J., Oliva, J.M., Cabanas, A., Manzanares, P., Ballesteros, M., 2006. Ethanol production from steam-explosion pretreated wheat straw. *Applied Biochemistry and Biotechnology* 130, 496–508.
- [36] Licht, F.O., 2006. *World Ethanol Market: The Outlook to 2015*, Tunbridge Wells, Agra Europe Special Report, UK.
- [37] Taherzadeh, M.J., Karimi, K., 2007. Acid-based hydrolysis processes for ethanol from lignocellulosic materials: a review. *Bioresources* 2, 472–499.
- [38] Lin, Y., Tanaka, S., 2006. Ethanol fermentation from biomass resources: current state and prospects. *Applied Microbiology and Biotechnology* 69, 627–642.
- [39] Kim, S., Dale, B.E., 2004. Global potential bioethanol production from wasted crops and crop residues. *Biomass and Bioenergy* 26, 361–375.
- [40] Ortiz, R., Sayre, K.D., Govaerts, B., Gupta, R., Subbarao, G.V., Ban, T., Hodson, D., Dixon, J.M., Ivan Ortiz-Monasterio, J., Reynolds, M., 2008. Climate change: can wheat beat the heat? *Agriculture, Ecosystems and Environment* 126, 46–58.
- [41] Atwell, W.A., 2001. An overview of wheat development, cultivation, and production. *Cereal Foods World* 46, 59–62.
- [42] Καραμάνος Α., (1992), «Τα σιτηρά των Εύκρατων Κλιμάτων», Ανωτάτη Γεωπονική Σχολή Αθηνών, Αθήνα.
- [43] Σφήκας Α., (1995), «Ειδική Γεωργία Ι. Σιτηρά, Ψυχανθή και Χορτοδοτικά Φυτά», Α.Π.Θ., Εκδόσεις: Υπηρεσία Δημοσιευμάτων, Θεσσαλονίκη.
- [44] Franz Eugen Köhler, *Köhler's Medizinal-Pflanzen*, 1897
- [45] Otero, J., Panagiotou, G., Olsson, L., 2007. Fueling industrial biotechnology growth with bioethanol. *Biofuels*, 1–40.
- [46] Bayraktar, H., 2005. Experimental and theoretical investigation of using gasoline–ethanol blends in spark-ignition engines. *Renewable Energy* 30, 1733–1747.
- [47] <http://www.adenbrook.com/hay-straw/straw/wheat-straw-big-bales-ff-close/>
- [48] <http://www.innovativeindustry.net/biofuel-investments-of-major-oil-companies-part3>
- [49] Prasad, S., Singh, A., Joshi, H.C., 2007. Ethanol as an alternative fuel from agricultural, industrial and urban residues. *Resources Conservation and Recycling* 50, 1–39.

- [50] Laureano-Perez, L., Teymouri, F., Alizadeh, H., Dale, B.E., 2005. Understanding Factors that Limit Enzymatic Hydrolysis of Biomass. In: Twenty-Sixth Symposium on Biotechnology for Fuels and Chemicals, pp. 1081–1099.
- [51] Hendriks, A., Zeeman, G., 2009. Pretreatments to enhance the digestibility of lignocellulosic biomass. *Bioresource Technology* 100, 10–18.
- [52] Mosier, N., C. Wyman, et al. (2005). "Features of promising technologies for pretreatment of lignocellulosic biomass." *Bioresource Technology* 96(6): 673-686.
- [53] Alvira, P., E. Tomas-Pejo, et al. (2009). "Pretreatment technologies for an efficient bioethanol production process based on enzymatic hydrolysis: A review." *Bioresource Technology* Article in press.
- [54] Hsu, T. A., M. R. Ladisch, et al. (1980). "Alcohol from Cellulose." *Chemtech*. 10: 315-319.
- [55] Sudhagar, M., Tabil, L.G., Sokhansanj, S., 2004. Grinding performance and physical properties of wheat and barley straws, corn stover and switchgrass. *Biomass and Bioenergy* 27, 339–352.
- [56] Farid Talebnia, Dimitar Karakashev, Irini Angelidaki (2009), Production of bioethanol from wheat straw: An overview on pretreatment, hydrolysis and fermentation.
- [57] Galbe, M., Zacchi, G., 2002. A review of the production of ethanol from softwood. *Applied Microbiology and Biotechnology* 59, 618–628.
- [58] Okano, K., Kitagawa, M., Sasaki, Y., Watanabe, T., 2005. Conversion of Japanese redcedar (*Cryptomeria japonica*) into a feed for ruminants by white-rot basidiomycetes. *Animal Feed Science and Technology* 120, 235–243.
- [59] Ó. J. Sánchez and C. A. Cardona, "Trends in biotechnological production of fuel ethanol from different feedstocks," *Bioresource Technology*, vol. 99, no. 13, pp. 5270–5295, 2008.
- [60] Arai, T., Kosugi, A., Chan, H., Koukiekolo, R., Yukawa, H., Inui, M., Doi, H., 2006. Properties of cellulosomal family 9 cellulases from *Clostridium cellulovorans*. *Applied Microbiology and Biotechnology* 71, 654–660.
- [61] Galbe, M., Zacchi, G., 2002. A review of the production of ethanol from softwood. *Applied Microbiology and Biotechnology* 59, 618–628.
- [62] Rabinovich, M.L., Melnik, M.S., Boloboba, A.V., 2002. Microbial cellulases (review). *Applied Biochemistry and Microbiology* 38, 305–321.
- [63] Eriksson, T., Børjesson, J., Tjerneld, F., 2002. Mechanism of surfactant effect in enzymatic hydrolysis of lignocellulose. *Enzyme and Microbial Technology* 31, 353–364.
- [64] Kristensen, J.B., Borjesson, J., Bruun, M.H., Tjerneld, F., Jørgensen, H., 2007. Use of surface active additives in enzymatic hydrolysis of wheat straw lignocellulose. *Enzyme and Microbial Technology* 40, 888–895.

- [65] Mazeau, K., Moine, C., Krausz, P., Gloaguen, V., 2005. Conformational analysis of xylan chains. *Carbohydrate Research* 340, 2752–2760.
- [66] Hahn-Hagerdal, B., Karhumaa, K., Fonseca, C., Spencer-Martins, I., Gorwa-Grauslund, M., 2007. Towards industrial pentose-fermenting yeast strains. *Applied Microbiology and Biotechnology* 74, 937–953.
- [67] Jorgensen, H., 2009. Effect of nutrients on fermentation of pretreated wheat straw at very high dry matter content by *S. cerevisiae*. *Applied Biochemistry and Biotechnology* 153, 44–57.
- [68] Claassen, P.A.M., Lopez Contreras, A.M., Sijtsma, L., Weusthuis, R.A., Van Lier, J.B., Van Niel, E.W.J., Stams, A.J.M., De Vries, S.S., 1999. Utilisation of biomass for the supply of energy carriers. *Applied Microbiology and Biotechnology* 52, 741–755.
- [69] Lin, Y., Tanaka, S., 2006. Ethanol fermentation from biomass resources: current state and prospects. *Applied Microbiology and Biotechnology* 69, 627–642.
- [70] Karakashev, D., Thomsen, A.B., Angelidaki, I., 2007. Anaerobic biotechnological approaches for production of liquid energy carriers from biomass. *Biotechnology Letters* 29, 1005–1012.
- [71] Karhumaa, K., Sanchez, R.G., Hahn-Hagerdal, B., Gorwa-Grauslund, M.F., 2007. Comparison of the xylose reductase-xylitol dehydrogenase and the xylose isomerase pathways for xylose fermentation by recombinant *S. cerevisiae*. *Microbial Cell Factories* 6.
- [72] Watanabe, S., Abu Saleh, A., Pack, S.P., Annaluru, N., Kodaki, T., Makino, K., 2007. Ethanol production from xylose by recombinant *S. cerevisiae* expressing protein engineered NADP(+)-dependent xylitol dehydrogenase. *Journal of Biotechnology* 130, 316–319.
- [73] Tomas-Pejo, E., Oliva, J.M., Ballesteros, M., 2008. Realistic approach for full-scale bioethanol production from lignocellulose: a review. *Journal of Scientific & Industrial Research* 67, 874–884.
- [74] Otero, J., Panagiotou, G., Olsson, L., 2007. Fueling industrial biotechnology growth with bioethanol. *Biofuels*, 1–40.
- [75] Farid Talebnia, Dimitar Karakashev, Iirini Angelidaki, Production of bioethanol from wheat straw: An overview on pretreatment, hydrolysis and fermentation, pp.4744-4753, 2009.
- [76] Shuler M.L., Kargi F. (2005). *Μηχανική Βιοδιεργασιών (Βασικές έννοιες)*. ΑΘΗΝΑ, ΕΜΠ: 365-366, 695-700.
- [77] Lee J. Biological conversion of lignocellulosic biomass to ethanol. *J of Biotechnology* 56, pp. 1-24, 1997.
- [78] Hölker, F., C. Wolter, E. K. Perkin, and K. Tockner. 2010. Light pollution as a biodiversity threat. *Trends in Ecology and Evolution* 25:681-682.
- [79] Lynd L.R., van Zyl W.H., McBride J.E., Laser M. Consolidated bioprocessing of cellulosic biomass: an update. *Current Opinion in biotechnology* 16, pp. 577-583, 2005.

- [80] Zaldivar J, Nielsen J, Olsson L (2001) Fuel ethanol production from lignocellulose: a challenge for metabolic engineering and process integration. *Applied Microbiology Biotechnology* 56:17–34
- [81] Ballesteros, I., Negro, M.J., Oliva, J.M., Cabanas, A., Manzanares, P., Ballesteros, M., 2006. Ethanol production from steam-explosion pretreated wheat straw. *Applied Biochemistry and Biotechnology* 130, 496–508.
- [82] Boudet A.M., Kajita S., Grima-Pettenati J., Goffner D. Lignins and lignocellulosics: a better control of synthesis for new and improved uses. *Trends in Plant Science* 8, pp. 576-581, 2003.
- [83] Brigham T, Chihongo A, Chidumayo E (1996) Trade in woodland products from the miombo region. In: Campbell B (ed.), *The Miombo in Transition: Woodland and Welfare in Africa*. Centre for International Forestry Research (CIFOR), Bogor, pp. 136-174.
- [84] Taherzadeh, M.J., Karimi, K., 2007. Acid-based hydrolysis processes for ethanol from lignocellulosic materials: a review. *Bioresources* 2, 472–499.
- [85] Zhang Y., Lynd. 2004., Toward an aggregated understanding of enzymatic hydrolysis of cellulose: Non-complexed cellulase systems. *Biotechnology and Bioengineering* 88: 797-824.
- [86] Aristidou A., Penttilä M. (2000). Metabolic engineering applications to renewable resource utilization. *Current Opinion in Biotechnology* 11:187-198.
- [87] Polizeli, M. L. T. M., Rizzatti, A. C. S., Monti, R., Terenzi, H. F., Jorge, J. A. and Amorim, D. S. 2005. Xylanases from fungi: properties and industrial applications. *Applied Microbiology and Biotechnology*. 67 (5): 577-91.
- [88] Puls, J., Schuseil J 1993. Chemistry of hemicelluloses: relationship between hemicellulose structure and enzymes required for hydrolysis. In *Hemicellulose and Hemicellulases* Eds. M.P. Coughlan and G.P.
- [89] Lee J. Biological conversion of lignocellulosic biomass to ethanol. *J of Biotechnology* 56, pp. 1-24, 1997.
- [90] Hamelinck C.N., Hooijdonk G.V., Faaij A.P.C. Prospects for ethanol from lignocellulosic biomass: techno-economic performance as development progresses. Copernicus Institute, Report NWS-E-2003-55, ISBN 90-393-2583-4, 2003.
- [91] Boudet A.M., Kajita S., Grima-Pettenati J., Goffner D. Lignins and lignocellulosics: a better control of synthesis for new and improved uses. *Trends in Plant Science* 8, pp. 576-581, 2003.
- [92] Mette Hedegaard Thomsen, Anders Thygesen *, Anne Belinda Thomsen. (2007) Hydrothermal treatment of wheat straw at pilot plant scale using a three-step reactor system aiming at high hemicellulose recovery, high cellulose digestibility and low lignin hydrolysis. *Bioresource Technology* 99 (2008) 4221–4228.

- [93] Jørgensen H., Vibe Jakob Vibe-Pedersen, Jan Larsen, Claus Felby Liquefaction of Lignocellulose at High-Solids Concentrations, pp. 862-870, 2007.
- [94] Christakopoulos P., Macris B.J., Kekos D. Direct fermentation of cellulose to ethanol by *Fusarium oxysporum*. *Enzyme and Microbial Technology* 11, pp. 236-239, 1989.
- [95] Panagiotou G., Christakopoulos P., Villas-Boas S.G., Olsson L. (2005γ). Fermentation performance and intracellular metabolite profiling of *Fusarium oxysporum* cultivated on a glucose-xylose mixture. *Enzyme and Microbial Technology* 36:100-106.
- [96] Panagiotou G., Villas-Boas S.G., Christakopoulos P., Nielsen J., Olsson L. (2005δ). Intracellular metabolite profiling of *Fusarium oxysporum* converting glucose to ethanol. *Journal of Biotechnology* 115:425-434.
- [97] Panagiotou G., Kekos D., Macris B.J., Christakopoulos P. (2003). Production of cellulolytic and xylanolytic enzymes by *Fusarium oxysporum* grown on corn stover in solid state fermentation. *Industrial Crops and Products* 18:37-45.