



Εθνικό Μετσόβιο Πολυτεχνείο
Σχολή Χημικών Μηχανικών
Τομέας IV : Σύνθεσης και Ανάπτυξης
Βιομηχανικών Διαδικασιών
Εργαστήριο Βιοτεχνολογίας

Διπλωματική Εργασία

Διεργασίες υδρόλυσης και ζύμωσης προκατεργασμένης λιγνινοκυτταρινούχας βιομάζας με χρήση καινοτόμων ενζύμων και υψηλής αρχικής συγκέντρωσης στερεών για την παραγωγή βιοαιθανόλης



Αλεξόπουλος Παναγιώτης

Επιβλέπων : Τόπακας Ευάγγελος (Επίκουρος Καθηγητής)

ΑΘΗΝΑ 2015

ΕΥΧΑΡΙΣΤΙΕΣ

Η παρούσα διπλωματική εργασία εκπονήθηκε στο Εργαστήριο Βιοτεχνολογίας της Σχολής Χημικών Μηχανικών του ΕΜΠ. Θα ήθελα να ευχαριστήσω θερμά τον επιβλέποντα καθηγητή κ. Ευάγγελο Τόπακα για την ανάθεση του συγκεκριμένου θέματος, την καθοδήγηση και τη βοήθεια που μου προσέφερε, και την άριστη συνεργασία που είχα μαζί του καθ' όλη τη διάρκεια εκπόνησης της διπλωματικής μου εργασίας.

Επίσης, θα ήθελα να ευχαριστήσω ιδιαίτερω τον υποψήφιο διδάκτορα Κωνσταντίνο Κατσίμπουρα για τις γνώσεις του, την υποστήριξη, την καθοδήγηση και την ανεκτίμητη βοήθεια που μου προσέφερε όλους αυτούς τους μήνες, αλλά και για την υπομονή του σε όλη τη διάρκεια της εκπόνησης της εργασίας αυτής.

Ευχαριστώ θερμά τους Καθηγητές και όλο το προσωπικό του Εργαστηρίου Βιοτεχνολογίας του ΕΜΠ, για τη συνεργασία και το φιλικό κλίμα καθ' όλη τη διάρκεια εκπόνησης της διπλωματικής μου εργασίας.

Τέλος, θα ήθελα να δώσω ένα πολύ μεγάλο ευχαριστώ στους γονείς μου, Ιωάννα και Θανάση, αλλά και σε όλη την οικογένεια μου, για την αμέριστη υποστήριξη τους σε κάθε βήμα τους ζωής μου, και στους οποίους οφείλω ότι έχω καταφέρει μέχρι σήμερα, όπως επίσης και τους φίλους μου, εντός και εκτός σχολής, που μου προσέφεραν και συνεχίζουν να μου προσφέρουν όμορφες και χαρούμενες στιγμές.

Με εκτίμηση,

Παναγιώτης Αλεξόπουλος

ΠΕΡΙΛΗΨΗ.....	1
ABSTRACT.....	3
1. ΘΕΩΡΗΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ.....	5
1.1. ΒΙΟΚΑΥΣΙΜΑ	5
1.1.1. Ανάπτυξη βιοκαυσίμων	5
1.1.2. Ορισμός - Κατηγορίες - Παραδείγματα	7
1.1.3. Πλεονεκτήματα παραγωγής βιοκαυσίμων	9
1.2. ΦΥΤΙΚΗ ΒΙΟΜΑΖΑ : ΠΡΩΤΗ ΥΛΗ ΓΙΑ ΤΗΝ ΠΑΡΑΓΩΓΗ ΒΙΟΚΑΥΣΙΜΩΝ.....	10
1.2.1. Πηγές βιομάζας για την παραγωγή βιοαιθανόλης	10
1.2.2. Λιγνινοκυτταρινούχες πρώτες ύλες.....	11
1.2.3. Φύση και σύσταση λιγνινοκυτταρινούχας βιομάζας.....	12
1.2.4. Αραβόσιτος.....	14
1.3. ΠΑΡΑΓΩΓΗ ΒΙΟΑΙΘΑΝΟΛΗΣ.....	14
1.3.1. Γενικά.....	14
1.3.2. Παραγωγή βιοαιθανόλης από λιγνινοκυτταρινούχα βιομάζα.....	17
1.3.3. Όξινη υδρόλυση της λιγνινοκυτταρινούχου βιομάζας.....	20
1.3.4. Προκατεργασία της λιγνινοκυτταρινούχου βιομάζας.....	21
1.3.5. Ενζυμική υδρόλυση της λιγνινοκυτταρινούχου βιομάζας.....	25
1.3.6. Θερμοχημική μετατροπή της λιγνινοκυτταρινούχου βιομάζας.....	27
1.4. ΔΙΕΡΓΑΣΙΕΣ ΠΑΡΑΓΩΓΗΣ ΑΙΘΑΝΟΛΗΣ.....	28
1.5. ΑΙΘΑΝΟΛΟΠΑΡΑΓΩΓΟΙ ΜΙΚΡΟΟΡΓΑΝΙΣΜΟΙ.....	29
2. ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ.....	31
2.1. ΥΛΙΚΑ.....	31
2.1.1. Γεωργικό υπόλειμμα στελεχών αραβόσιτου	31
2.1.2. Πριονίδι οξιάς	31
2.1.3. Ένζυμα και Μικροοργανισμοί.....	32
2.1.4. Συσκευές και Όργανα.....	32
2.2. ΜΕΘΟΔΟΙ.....	33
2.2.1. Αναλυτικές τεχνικές.....	33
2.2.2. Υδροθερμική προκατεργασία.....	35
2.2.3. Ενζυμική υδρόλυση.....	37
2.2.4. Ζύμωση.....	39
3. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ	41
3.1. ΜΕΛΕΤΗ ΥΔΡΟΘΕΡΜΙΚΗΣ ΠΡΟΚΑΤΕΡΓΑΣΙΑΣ ΣΕ CORN STOVER	41
3.1.1. Σύσταση υποστρωμάτων λιγνινοκυτταρινούχας βιομάζας.....	41
3.1.2. Επίδραση ενζυμικού φορτίου στην υδρόλυση CS.....	41
3.1.3. Σύγκριση εμπορικών κυτταρινολυτικών ενζύμων.....	45
3.1.4. Ζύμωση ρευστοποιημένου CS σε υψηλή αρχική συγκέντρωση στερεών.....	51
3.2. ΜΕΛΕΤΗ ΠΡΟΚΑΤΕΡΓΑΣΙΑΣ ΑΠΟΛΙΓΝΙΝΩΣΗΣ ΣΕ CORN STOVER.....	55
3.2.1. Σύσταση υλικών A/B.....	55
3.2.2. Επίδραση ενζυμικού φορτίου στην υδρόλυση των A και B	56
3.2.3. Σύγκριση υλικών A και B ως προς την απελευθέρωση ζυμώσιμων σακχάρων.....	59
3.2.4. Σύγκριση υλικών A και B ως προς την παραγωγή βιοαιθανόλης.....	61
3.3. ΜΕΛΕΤΗ ΠΡΟΚΑΤΕΡΓΑΣΙΑΣ ΥΓΡΗΣ ΟΞΕΙΔΩΣΗΣ ΣΕ ΠΡΙΟΝΙΔΙ ΟΞΙΑΣ	64
3.3.1. Σύσταση Lignocel	64
3.3.2. Επίδραση ενζυμικού φορτίου στην υδρόλυση προκατεργασμένου Lignocel.....	67

3.3.3.	<i>Αξιολόγηση των συνθηκών υγρής οξείδωσης ως προς την απελευθέρωση ζυμώσιμων σακχάρων</i>	<i>74</i>
3.3.4.	<i>Αξιολόγηση των συνθηκών υγρής οξείδωσης ως προς την παραγωγή βιοαιθανόλης.....</i>	<i>76</i>
4.	ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ.....	82
5.	ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ.....	85

ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Η παρούσα διπλωματική εργασία εκπονήθηκε στο Εργαστήριο Βιοτεχνολογίας της Σχολής Χημικών Μηχανικών του Εθνικού Μετσόβιου Πολυτεχνείου και περιλαμβάνει μελέτη των διεργασιών υδρόλυσης αγροτικού υπολείμματος λιγνινοκυτταρινούχας βιομάζας με χρήση καινοτόμων ενζύμων για την παραγωγή βιοαιθανόλης.

Αρχικά, πραγματοποιήθηκε μελέτη της υδροθερμικής προκατεργασίας του CS με χρήση τεσσάρων εμπορικών ενζυμικών σκευασμάτων : του ενζυμικού διαλύματος Celluclast[®] 1.5L (κυτταρινάση)- Novozyme[®] 188 (β-γλυκοζιδάση) και των εμπορικών ενζύμων Cellic[®] CTec2, Cmax3[™] και Accellerase[®]1500, για συγκεντρώσεις 3, 6, 9 και 12 mg/g ξηρής βιομάζας (Ξ.Β). Μετά από ενζυμικές υδρολύσεις (με 3% w/v συγκέντρωση στερεών), προέκυψε το βέλτιστο φορτίο των 9 mg/g για κάθε ένζυμο, ενώ το ένζυμο Cellic[®] CTec2 βρέθηκε αποτελεσματικότερο συγκριτικά με τα υπόλοιπα τρία. Ακολούθησε ζύμωση του ρευστοποιημένου CS σε υψηλή αρχική συγκέντρωση στερεών (24% w/v), με προϋδρόλυσή του είτε για 12 είτε για 24 ώρες με 9 mg/g Ξ.Β Cellic[®] CTec2. Παρατηρήθηκε ότι οι 12 ώρες ήταν επαρκείς για τη ρευστοποίηση του υλικού, ενώ η επιπλέον προσθήκη ενζύμου πριν το ξεκίνημα της ζύμωσης ενίσχυσε τη συγκέντρωση της παραγόμενης αιθανόλης (από 35,5 g/L σε 41,5 g/L για τις 12 ώρες) , που έφτασε το απαιτούμενο όριο του 4% w/w στο τελικό προϊόν.

Επιπλέον, μελετήθηκε η προκατεργασία της απολιγνίνωσης (υλικό Α) και ο συνδυασμός προκατεργασιών απολιγνίνωσης και υδροθερμικής (υλικό Β) σε υπόλειμμα αραβοσίτου. Μετά από ενζυμικές υδρολύσεις των δύο υλικών (με 3% w/v συγκέντρωση στερεών), με χρήση του Cellic[®] CTec2 σε συγκεντρώσεις 3, 6, 9 και 12 mg/g Ξ.Β , διαπιστώθηκε πως το βέλτιστο ενζυμικό φορτίο είναι τα 9 mg/g Ξ.Β. Με επακόλουθες ζυμώσεις (με και χωρίς προϋδρόλυση) για κάθε υλικό, συμπεραίνεται πως οι συνθήκες προκατεργασίας του υλικού Β είναι προτιμότερες ως προς την απελευθέρωση ζυμώσιμων σακχάρων (11% περισσότερη γλυκόζη), ενώ υπερτερούν και αναφορικά με την παραγωγή αιθανόλης, ειδικά με εφαρμογή προϋδρόλυσης πριν τη διαδικασία της ζύμωσης.

Τέλος, ερευνάται η προκατεργασία της υγρής οξείδωσης σε υπολείμματα κοπής ξύλου οξιάς. Τα τρία δείγματα με το υψηλότερο ποσοστό σε κυτταρίνη επιλέγονται ως αντιπροσωπευτικά του συνόλου και υδρολύονται ενζυμικά (με συγκέντρωση στερεών 15% w/v) με χρήση του Celllic® CTec2 σε συγκεντρώσεις 6, 9 και 12 mg/g Ξ.Β. Προκύπτει λοιπόν το βέλτιστο ενζυμικό φορτίο των 9 mg/g Ξ.Β, με το οποίο πραγματοποιούνται ενζυμικές υδρολύσεις όλων των υλικών. Ακολουθούν ζυμώσεις των υλικών με συγκέντρωση στερεών 17% w/v. Σύμφωνα με τα αποτελέσματα, οι συνθήκες προκατεργασίας με υγρή οξείδωση, του υλικού ligC_171114_L, σε πίεση 40 bar, θερμοκρασία 175 °C και σε αραιό διάλυμα H₂O με ακετόνη 50-50 %, σε συνθήκες αέρα με 40% O₂ επιφέρουν τα αποδοτικότερα αποτελέσματα τόσο ως προς την απελευθέρωση ζυμώσιμων σακχάρων αλλά και ως προς την παραγωγή βιοαιθανόλης, καθώς επιτυγχάνεται το όριο του 4% w/w αιθανόλης στο τελικό προϊόν.

ABSTRACT

The current thesis, elaborated in the Biotechnology Laboratory at the Chemical Engineering School of the National Technical University of Athens, includes the study of hydrolysis processes, on lignocellulosic biomass of agricultural residue, using innovative enzymes for bioethanol production.

Initially, a study was conducted on the hydrothermal pretreatment of the CS using four commercial enzyme preparations: the enzyme solution Celluclast® 1.5L (cellulase) - Novozyme® 188 (glucosidase) and commercial enzymes Cellic® CTec2, Cmax3™ and Accellerase®1500, at concentrations of 3, 6, 9 and 12 mg/g dry biomass. A number of enzymatic hydrolysis (at 3% w/v solids concentration) showed an optimum load of 9 mg/g for each enzyme, while the enzyme Cellic® CTec2 was found to be more effective compared to the other three. Following, there was a fermentation of the fluidized CS with high initial solids concentration (24% w/v), after a step of hydrolysis of either 12 or 24 hours with 9 mg/g Cellic® CTec2. It was observed that 12 hours were sufficient for the liquidation of the material, while adding additional enzyme before the start of fermentation enhanced the concentration of ethanol produced (from 35,5 g/L to 41,5 g/L for 12 hours of prehydrolysis) that reached the required threshold of 4% w/w in the final product.

Moreover, a study was conducted on the pretreatment of delignification (material A) as well as the combination of delignification and hydrothermal pretreatments (material B) in corn residue. After enzymatic hydrolysis of the two materials (at 3% w/v solids concentration), using Cellic® CTec2 at concentrations of 3, 6, 9 and 12 mg/g, it was found that the optimal enzyme load is 9 mg/g. With subsequent fermentations (with and without prehydrolysis) for each material, it was noted that the pretreatment conditions of the material B are preferable for releasing fermentable sugars (11% more glucose) and producing ethanol, especially by applying a step of hydrolysis before the fermentation process.

Finally, the pretreatment of wet oxidation in beech wood trimmings was researched. The three samples with the highest percentage of cellulose are chosen as representatives and are hydrolyzed enzymatically (at solids concentration of 15% w/v)

using Cellic[®] CTec2 at 6, 9 and 12 mg/g. The result showed that the optimal enzyme load is at 9 mg/g and thus, all the enzymatic hydrolyses were carried at that load. The fermentations that followed were performed at a solids concentration of 17% w/v. According to the results, the conditions of the wet oxidation pretreatment, that lead to the most efficient results, both in release of fermentable sugars and in production of bioethanol, are those of the material ligC_171114_L. In specific, the wet oxidation should be carried at a pressure of 40 bar, a temperature of 175 °C, in a dilute solution of H₂O with acetone 50-50 % and air conditions of 40 % O₂ in order to achieve the limit of 4% w/w of ethanol in the final product.

1. ΘΕΩΡΗΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ

1. ΘΕΩΡΗΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ

1.1. Βιοκαύσιμα

1.1.1. Ανάπτυξη βιοκαυσίμων

Κατά τη διάρκεια του 20ου αιώνα, η ανάπτυξη της βιολογίας, σε συνδυασμό με την ήδη υπάρχουσα ανθρώπινη εμπειρία, επέκτεινε ακόμη περισσότερο τη γνώση που αφορά τα βιολογικά φαινόμενα. Φυσικό επακόλουθο ήταν η εφαρμογή τεχνικών, που παλιότερα είχαν περιορισμένους σκοπούς, σε διαφορετικά πεδία. Χαρακτηριστικό είναι το παράδειγμα των ζυμώνσεων. Εδώ και περίπου πέντε δεκαετίες λοιπόν, έχει ξεκινήσει η έρευνα που στοχεύει στη βιομετατροπή της βιομάζας σε καύσιμο, με τη χρήση βιοτεχνολογικών μεθόδων. Λίγες δεκαετίες αργότερα μάλιστα, κάποιες από τις μεθόδους αυτές, έτυχαν εφαρμογής σε βιομηχανική κλίμακα, με κύριο εκφραστή των προσπαθειών αυτών τη Βραζιλία. Η πορεία, που ξεκίνησε στα μέσα περίπου του προηγούμενου αιώνα, οδήγησε στη σημερινή εποχή, όπου η έρευνα στο συγκεκριμένο κλάδο συνεχίζεται με ακόμα μεγαλύτερη ένταση. Έτσι, η συζήτηση περί βιοκαυσίμων δεν οφείλεται τόσο στην καινοτομία του θέματος, αλλά κυρίως στα οικονομικά και περιβαλλοντικά θέματα, με τα οποία η παραγωγή βιοκαυσίμων είναι άρρηκτα και αναπόφευκτα συνδεδεμένη.

Αναφορικά με το περιβάλλον, διατυπώνονται συγκεκριμένοι προβληματισμοί. Είναι γνωστό πως από το 18ο αιώνα, η ραγδαία ανάπτυξη της τεχνολογίας επηρέασε ριζικά τη σχέση του ανθρώπου με το περιβάλλον γύρω του. Η αλόγιστη χρήση μη ανανεώσιμων πηγών ενέργειας καθώς και τα απόβλητα που συσσωρεύονται από αυτή, είχαν ως συνέπεια το σχηματισμό διαφόρων μορφών ρύπανσης. Παρά τα εμφανή σημάδια της περιβαλλοντικής καταστροφής, κατά τη διάρκεια του 20ου αιώνα, το περιβάλλον συνεχίζει να θεωρείται ανεξάντλητος πόρος για την ικανοποίηση ανθρωπίνων αναγκών, με αποτέλεσμα την εμφάνιση της οικολογικής κρίσης. Κύριες αιτίες της συγκεκριμένης κρίσης είναι (Αθανασάκης και Κουσσούρης, 1999) :

- i. Οι μέθοδοι της βιομηχανικής παραγωγής

- ii. Ο υπερκαταναλωτισμός
- iii. Η συσσώρευση πληθυσμού στα μεγάλα αστικά κέντρα
- iv. Η τεχνοκρατική αντίληψη για την ανάπτυξη στο βαθμό που εξαντλεί βάνουσα και αλόγιστα τους φυσικούς πόρους της γης στο όνομα της βιομηχανικής, οικονομικής και τουριστικής ανάπτυξης.

Ακόμα, τα σημαντικότερα οικολογικά προβλήματα που ερευνώνται και σχολιάζονται είναι (Αθανασάκης και Κουσούρης, 1999) :

- Η τρύπα του όζοντος
- Το φαινόμενο του θερμοκηπίου
- Η όξινη βροχή
- Η καταστροφή στη ζούγκλα του Αμαζονίου
- Η ατμοσφαιρική ρύπανση
- Η ηχορύπανση
- Η καταστροφή του εδάφους
- Τα οικιακά απορρίμματα
- Τα ραδιενεργά κατάλοιπα
- Τα φυτοφάρμακα
- Η ποικιλότητα του οργανικού κόσμου στην ελληνική φύση

Επιπλέον, ο προβληματισμός που διατυπώνεται επί οικονομικών θεμάτων περιλαμβάνει τόσο την ενσωμάτωση των βιοκαυσίμων στην αγορά και τον τρόπο ανάπτυξης της σχετικής επιχειρηματικότητας, όσο και ζητήματα που προκύπτουν σε σχέση με τον κλάδο των τροφίμων για τον προσανατολισμό και την εκμετάλλευση της αγροτικής παραγωγής. Η παραγωγή βιοκαυσίμων σε βιομηχανική κλίμακα, στηρίζεται στην εκμετάλλευση καλλιεργειών μεγάλης οικονομικής και διατροφικής αξίας, όπως τα τεύτλα, το ζαχαροκάλαμο και το καλαμπόκι. Το γεγονός αυτό, δημιούργησε αμφιβολίες για το κατά πόσο είναι εφικτό να εναρμονιστεί η πρόοδος των βιοκαυσίμων με την παγκόσμια οικονομία και με τον τομέα των τροφίμων. Η λύση δόθηκε από τη στροφή της επιστημονικής κοινότητας στη χρήση φυτικών

υπολειμμάτων και παραπροϊόντων διαφόρων διεργασιών σαν πρώτες ύλες για την παραγωγή βιοκαυσίμων (βιοκαύσιμα δεύτερης γενιάς).

Για όλους αυτούς τους λόγους, το ενδιαφέρον των επιστημόνων, των κυβερνήσεων και των ιδιωτών έχει στραφεί στην ανάπτυξη και υιοθέτηση εφαρμογών και καινοτομιών που ενσωματώνουν πιο «φιλικές προς το περιβάλλον» πηγές ενέργειας. Καθώς οι προκλήσεις οι οποίες πρέπει να αντιμετωπιστούν αυξάνονται καθημερινά, έχει διαμορφωθεί ένα πλαίσιο πρωτοβουλιών και πολιτικών θέτοντας συγκεκριμένες προτεραιότητες προκειμένου να διασφαλιστεί η βιωσιμότητα των ενεργειακών πόρων για τους πολίτες όλου του κόσμου (Ress, 1998).

Στο πλαίσιο αυτό, η αξιοποίηση των Ανανεώσιμων και Εναλλακτικών Βιώσιμων Πηγών Ενέργειας (ηλιακή, αιολική, θαλάσσια, υδραυλική, βιομάζα, γεωθερμία) σε συνδυασμό με την προσπάθεια για την εξοικονόμηση ενέργειας, είναι κοινά αποδεκτό, ότι συνδέονται άμεσα με θετικά αποτελέσματα για το περιβάλλον, την οικονομία, τον τουρισμό, τον πολιτισμό και την ποιότητα ζωής των κατοίκων. Οι Ανανεώσιμες Πηγές Ενέργειας και οι πρακτικές Εξοικονόμησης Ενέργειας πρέπει να συμμετέχουν σήμερα περισσότερο από ποτέ στον ενεργειακό σχεδιασμό όλων των χωρών και των αναπτυγμένων και των αναπτυσσόμενων αλλά και του Τρίτου Κόσμου, ενώ η ανάπτυξη Βιώσιμων Ενεργειακών Σχεδίων και Μέτρων πρέπει να αποτελεί βασικό στόχο όλων των εμπλεκόμενων φορέων, σε τοπικό, περιφερειακό, ευρωπαϊκό και παγκόσμιο επίπεδο. Και τα μέτρα αυτά δε μπορεί να είναι άλλα από την απεξάρτηση από τα ορυκτά καύσιμα, τη χρήση ανανεώσιμων μορφών ενέργειας (κυρίως της αιολικής και της ηλιακής) όπως επίσης και την εξοικονόμηση ενέργειας (Φλογαίτη, 1993).

1.1.2. Ορισμός - Κατηγορίες - Παραδείγματα

Τα βιοκαύσιμα είναι καύσιμα των οποίων η πρώτη ύλη, που ονομάζεται βιομάζα, περιλαμβάνει οποιοδήποτε υλικό προέρχεται από ζωντανούς οργανισμούς. Ειδικότερα, η βιομάζα για ενεργειακούς σκοπούς, περιλαμβάνει κάθε τύπο που μπορεί να χρησιμοποιηθεί για την παραγωγή στερεών, υγρών ή/και αέριων καυσίμων (Χριστακόπουλος και Τόπακας, 2013).

Τα βιοκαύσιμα κατηγοριοποιούνται με βάση την πηγή από την οποία προέρχονται. Με τον τρόπο αυτό, προκύπτουν οι παρακάτω τρεις κατηγορίες βιοκαυσίμων (Χριστακόπουλος και Τόπακας, 2013) :

- Τα βιοκαύσιμα πρώτης γενιάς που προέρχονται, για παράδειγμα, από καλλιέργειες όπως σακχαροκάλαμο, καλαμπόκι και σόγια. Τα βιοκαύσιμα αυτής της γενιάς δεν κρίνονται ικανοποιητικά, καθώς συμβάλλουν στη λειψυδρία και στην αποψίλωση των δασών, ενώ μπορεί να αυξήσουν τις τιμές των τροφίμων εξαιτίας του ανταγωνισμού.
- Τα βιοκαύσιμα δεύτερης γενιάς, τα οποία είναι πολλά υποσχόμενα και προέρχονται από λιγνινοκυτταρινούχα βιομάζα αγροτικών και δασικών υπολειμμάτων. Ωστόσο, η αναγκαιότητα εκμετάλλευσης μεγάλων εκτάσεων γης, οι οποίες θα μπορούσαν κάλλιστα να χρησιμοποιηθούν για την παραγωγή τροφίμων, αποτελεί ανασταλτικό παράγοντα για την ανάπτυξή τους.
- Τα βιοκαύσιμα τρίτης γενιάς, προέρχονται από μικροφύκη και θεωρούνται μια εναλλακτική πηγή ενέργειας, δίχως τα μειονεκτήματα της πρώτης και δεύτερης γενιάς βιοκαυσίμων ενώ αποτελούν μια εναλλακτική λύση που μπορεί να διατηρήσει την ανάπτυξη της ανθρώπινης δραστηριότητας σε αρμονία με το περιβάλλον.

Ενδεικτικά παραδείγματα προϊόντων τα οποία θεωρούνται βιοκαύσιμα είναι τα παρακάτω (Ευρωπαϊκή Επιτροπή, 2003) :

- i. «βιοαιθανόλη»: αιθανόλη η οποία παράγεται από βιομάζα ή/και από το βιοαποικοδομήσιμο κλάσμα αποβλήτων, για χρήση ως βιοκαύσιμο.
- ii. «βιοντίζελ βιολογικής προέλευσης»: μεθυλεστέρας ο οποίος παράγεται από φυτικά ή ζωικά έλαια, ποιότητας ντίζελ για χρήση ως βιοκαύσιμο.
- iii. «βιοαέριο»: καύσιμο αέριο το οποίο παράγεται από βιομάζα ή/και από το βιοαποικοδομήσιμο κλάσμα αποβλήτων, το οποίο μπορεί να καθαριστεί φτάνοντας ποιότητα φυσικού αερίου, για χρήση ως βιοκαύσιμο ή ξυλαέριο.

- iv. «βιομεθανόλη»: μεθανόλη η οποία παράγεται από βιομάζα, για χρήση ως βιοκαύσιμο.
- v. «βιοδιμεθυλεστέρας»: διμεθυλεστέρας ο οποίος παράγεται από βιομάζα, για χρήση ως βιοκαύσιμο.
- vi. «βιο-ETBE (αιθυλοτριτοβουτυλαιθέρας)»: ETBE ο οποίος παράγεται από βιοαιθανόλη.
- vii. «βιο-MTBE (μεθυλοτριτοβουτυλαιθέρας)»: καύσιμο το οποίο παράγεται από βιομεθανόλη.
- viii. «συνθετικά βιοκαύσιμα»: συνθετικοί υδρογονάνθρακες ή μείγματα συνθετικών υδρογονανθρακών που έχουν παραχθεί από βιομάζα.
- ix. «βιοϋδρογόνο»: υδρογόνο το οποίο παράγεται από βιομάζα ή/και από το βιοαποικοδομήσιμο κλάσμα αποβλήτων για χρήση ως βιοκαύσιμο.
- x. «καθαρά φυτικά έλαια»: έλαια από ελαιούχα φυτά, παραγόμενα με συμπίεση, έκθλιψη ή ανάλογες μεθόδους, φυσικά ή εξευγενισμένα αλλά μη χημικώς τροποποιημένα, όταν είναι συμβατά με τον τύπο του οικείου κινητήρα και τις αντίστοιχες προϋποθέσεις όσον αφορά τις εκπομπές.

Τα σημαντικότερα από αυτά είναι η βιοαιθανόλη, που αποτελεί αντικείμενο της συγκεκριμένης εργασίας, καθώς και το βιοντίζελ.

1.1.3. Πλεονεκτήματα παραγωγής βιοκαυσίμων

Τα βιοκαύσιμα παρέχουν πολλά πλεονεκτήματα και μπορούν να συμβάλλουν καταρχήν στη μείωση της ρύπανσης του περιβάλλοντος, ενώ επιπλέον μειώνουν την εξάρτηση από το πετρέλαιο. Πιο συγκεκριμένα, η ελάττωση της περιβαλλοντικής ρύπανσης πραγματοποιείται με διάφορους τρόπους. Αρχικά, μειώνονται οι εκπομπές

αερίων του θερμοκηπίου που σχετίζονται με την ενέργεια που χρησιμοποιείται για την παραγωγή του καυσίμου. Ακόμα, παρατηρείται περιστολή της εκπομπής διοξειδίου του άνθρακα με τη χρήση βιοκαυσίμων σαν καύσιμα μεταφοράς καθώς και μείωση των τοξικών καυσαερίων εκπομπής των οχημάτων μεταφοράς. Τέλος, αναφορικά με την εξάρτηση από το πετρέλαιο, με τη χρήση των βιοκαυσίμων, επιτυγχάνεται μείωση της ενεργειακής εξάρτησης, ασφάλεια στον ενεργειακό εφοδιασμό και ταυτόχρονα παρέχεται μια εναλλακτική πηγή εισοδήματος στους αγρότες (Χριστακόπουλος και Τόπακας, 2013).

1.2. Φυτική βιομάζα : Πρώτη ύλη για την παραγωγή βιοκαυσίμων

1.2.1. Πηγές βιομάζας για την παραγωγή βιοαιθανόλης

Σύμφωνα με τα προηγούμενα, η βιομάζα αποτελεί την πρώτη ύλη για την παραγωγή βιοκαυσίμων και περιλαμβάνει οποιοδήποτε υλικό προέρχεται από ζωντανούς οργανισμούς. Η συγκεκριμένη εργασία μελετά την παραγωγή βιοαιθανόλης, η οποία μπορεί να πραγματοποιηθεί με βάση διάφορες πηγές βιομάζας.

Οι πρώτες ύλες για την παραγωγή βιοαιθανόλης κατηγοριοποιούνται ως εξής (Χριστακόπουλος και Τόπακας, 2013) :

- Σακχαρούχες πηγές : Η πρώτη ύλη περιλαμβάνει φυτά σακχαρούχου σύστασης, όπως σακχαροκάλαμο, σακχαρότευτλο και σόργο. Τα φυτά αυτά, μετά από κατάλληλη φυσική επεξεργασία, για παράδειγμα εκχύμωση, υπόκεινται σε άμεση ζύμωση για την παραγωγή βιοαιθανόλης.
- Αμυλούχες πηγές : Η πρώτη ύλη περιλαμβάνει ενεργειακά φυτά αμυλούχου σύστασης, όπως σπόροι αραβοσίτου, σίτου και κριθής. Για τα υλικά αυτά, πριν το στάδιο της ζύμωσης προηγείται ένα στάδιο υδρόλυσης με τη χρήση αμυλασών.
- Λιγνινοκυτταρινούχες πηγές : Στην κατηγορία αυτή, περιλαμβάνεται η λιγνινοκυτταρινούχα βιομάζα, όπως τα αγροτικά παραπροϊόντα, τα υπολείμματα της υλοτομίας, της γεωργίας, της βιομηχανίας τροφίμων, τα

αστικά στερεά λύματα, καθώς και τα λιγνινοκυτταρινούχα ενεργειακά φυτά (κυτταρινούχο σόργο, αγριαγκινάρα κ.λπ.). Για τη συγκεκριμένη κατηγορία, πριν το στάδιο της υδρόλυσης, προηγείται το στάδιο φυσικής ή χημικής προκατεργασίας.

1.2.2. Λιγνινοκυτταρινούχες πρώτες ύλες

Υπάρχει μία ποικιλία φυτικών πηγών που μπορούν να παρέχουν τα σάκχαρα για την παραγωγή βιοαιθανόλης και κατηγοριοποιούνται με βάση τη σύστασή τους σε: (α) σακχαρούχες (όπως σακχαρότευτλο και σακχαροκάλαμο), (β) αμυλούχες (όπως σίτος, αραβόσιτος και κριθάρι) και (γ) λιγνινοκυτταρινούχες (Sánchez & Cardona, 2008; Balat *et al.*, 2008; Tomás-Rejón *et al.*, 2008). Στις τελευταίες κατατάσσονται τα υπολείμματα της υλοτομίας, της γεωργίας, της βιομηχανίας τροφίμων, τα αστικά στερεά λύματα καθώς και οι ενεργειακές καλλιέργειες (Χριστακόπουλος και Τόπακας, 2013). Οι ενεργειακές καλλιέργειες (όπως το σόργο) φαίνεται να αποτελούν τη μεγαλύτερη, πολλά υποσχόμενη, μελλοντική πηγή βιομάζας για παραγωγή βιοκαυσίμων (Tomás-Rejón *et al.*, 2008).

Επειδή στην παραγωγή βιοαιθανόλης το κόστος των πρώτων υλών αποτελεί περισσότερο από το 1/3 του συνολικού κόστους παραγωγής της (Tomás-Rejón *et al.* 2008, Kumar *et al.*, 2008; Balat *et al.* 2008), η χρήση λιγνινοκυτταρινούχων πρώτων υλών οι οποίες αποτελούν φθινό φυσικό πόρο (αποτελούν το 50% της παγκόσμιας βιομάζας) μπορεί να αποτελέσει μια σημαντική λύση (Chandel *et al.*, 2007; Cardona & Sánchez, 2007; Balat *et al.*, 2008; Kumar *et al.*, 2008; Sánchez & Cardona, 2008; Tomás-Rejón *et al.*, 2008). Επιπλέον, η ραγδαία αύξηση της παραγωγής βιοκαυσίμων, από τα φυτά (σακχαρούχα και αμυλούχα), μπορεί να κλονίσει την τροφική ασφάλεια και να αυξήσει τις τιμές των τροφίμων. Λύση για την παραγωγή βιοκαυσίμων αποτελεί και πάλι η στροφή στη λιγνινοκυτταρίνη, που αποτελεί το μη εδώδιμο κλάσμα της φυτικής βιομάζας και η αποφυγή των εδώδιμων κλασμάτων της, όπως είναι το άμυλο και η ζάχαρη (Χριστακόπουλος και Τόπακας, 2013). Ο βασικός παράγοντας που περιορίζει την εκμετάλλευση των λιγνινοκυτταρινούχων υλικών για παραγωγή βιοαιθανόλης σε βιομηχανική κλίμακα είναι ο υψηλός βαθμός πολυπλοκότητας της δομής και επεξεργασίας αυτών των υλικών (Cardona &

Sánchez, 2007; Sánchez & Cardona, 2008; Kumar *et al.*, 2008).

1.2.3. Φύση και σύσταση λιγνινοκυτταρινούχας βιομάζας

Λιγνινοκυτταρίνη, είναι ένας γενικός όρος που περιγράφει σαν σύνολο τα κύρια συστατικά των κυτταρικών τοιχωμάτων των φυτών, που είναι :

- i. Η κυτταρίνη, που αποτελεί το σημαντικότερο συστατικό των πολυσακχαριτών των κυτταρικών τοιχωμάτων. Στην πιο απλή της μορφή, η κυτταρίνη αποτελείται από ένα γραμμικό πολυμερές μονάδων D-γλυκόζης, μήκους 8000-15000 μορίων, συνδεδεμένων μεταξύ τους με β-1,4 γλυκοζιτικό δεσμό. Ο δισακχαρίτης κελλοβιόζη αποτελεί την επαναλαμβανόμενη δομική μονάδα της αλυσίδας της κυτταρίνης. Τα πολυμερή της, συνδέονται μεταξύ τους με δεσμούς υδρογόνου, σχηματίζοντας διατεταγμένες κρυσταλλικές δομές, τα μικροϊνίδια κυτταρίνης. Σε κάθε μικροϊνίδιο, ομάδες από 35-100 μόρια κυτταρίνης, δημιουργούν κρυσταλλικές δομές οι οποίες προσδίδουν αντοχή κατά την επιμήκυνση και εξασφαλίζουν την ακαμψία του κυτταρικού τοιχώματος των φυτών (Χριστακόπουλος και Τόπακας, 2013).
- ii. Η ημικυτταρίνη, που αποτελεί τη δεύτερη σε αφθονία οργανική δομή στο κυτταρικό τοίχωμα των φυτών. Οι ημικυτταρίνες, είναι κυρίως ετερογενείς πολυσακχαρίτες και αποτελούνται βασικά από σάκχαρα, όπως πεντόζες, εξόζες και ουρονικά οξέα. Είναι άμορφες (μη κρυσταλλικές), έχουν χαμηλό βαθμό πολυμερισμού, είναι έντονα υγροσκοπικές και παρουσιάζουν υψηλή χημική δραστηριότητα. Ένα τυπικό πρωτογενές τοίχωμα, περιέχει ημικυτταρίνη σε ποσοστό 15-25% επί του ξηρού του βάρους. Στους περισσότερους κυτταρικούς τύπους, ένα είδος ημικυτταρίνης κυριαρχεί, με τα υπόλοιπα να εντοπίζονται σε μικρότερες ποσότητες. Η κατηγοριοποίηση των ημικυτταρινών συνήθως γίνεται με βάση το κυριότερο μονομερές σάκχαρο, καθώς στη φύση σπάνια οι ημικυτταρίνες αποτελούνται από μόνο ένα τύπο μονοσακχαρίτη. Η ξυλάνη αποτελεί το κυριότερο συστατικό της ημικυτταρίνης. Αποτελείται από μια κεντρική αλυσίδα μορίων D-ξυλοπυρανόζης ενωμένων μεταξύ τους με β-1,4-γλυκοζιτικούς δεσμούς. Η

δομή της ξυλάνης έχει εξαιρετικής ποικιλομορφία και εξαρτάται από την πηγή της προέλευσής της. Η υδρόλυση της ξυλάνης παίζει σημαντικό ρόλο σε πολλές βιοτεχνολογικές εφαρμογές (Χριστακόπουλος και Τόπακας, 2013).

- iii. Η λιγνίνη, ένα πολύπλοκο τρισδιάστατο πολυμερές με βασική δομική μονάδα το φαινυλοπροπάνιο. Είναι ένα μεγαλομοριακό, υδρόφοβο, αρωματικό πολυμερές και αποτελεί το 25-35% της ξηρής μάζας του ξύλου. Ακόμα, είναι άμορφη και έχει πολύ υψηλό βαθμό πολυμερισμού (100.000-300.000). Τα μονομερή της λιγνίνης είναι τρεις αρωματικές ενώσεις, η κονυφερυλική, η συναπυλική και η π-κουμαρυλική αλκοόλη. Επίσης, πρέπει να σημειωθεί ότι είναι έντονα υδρόφοβη ουσία, αδιάλυτη στο νερό, ενώ ενώνεται με χημικούς δεσμούς τόσο με την κυτταρίνη όσο και με τις ημικυτταρίνες (Χριστακόπουλος και Τόπακας, 2013).

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

Πίνακας 1-1 . Σύσταση διαφόρων λιγνινοκυτταρινούχων υλικών (Saha , 2003)

	Σύσταση (% , ξηρής ύλης)		
	Κυτταρίνη	Ημικυτταρίνη	Λιγνίνη
Ίνες αραβοσίτου	15	35	8
Στάχυς αραβοσίτου	45	35	15
Στέλεχος αραβοσίτου	40	25	17
Άχυρο ρυζιού	35	25	12
Άχυρο σίτου	30	50	20
Βαγάσση σακχαροκαλάμου	40	24	25
Switch grass	45	30	12
Αγριόβρομο (Coastal bermuda grass)	25	35	6

1.2.4. Αραβόσιτος

Το μεγαλύτερο ποσό της αιθανόλης που παράγεται στις Η.Π.Α. προέρχεται από αραβόσιτο. Στην Ελλάδα, η συνολική καλλιεργούμενη έκταση είναι περίπου 2 εκ. στρέμματα με ετήσια παραγωγή περίπου 2 εκ. τόνους. Οι ελληνικές μέσες αποδόσεις αραβοσίτου κυμαίνονται από 600-1800 κιλά/στρέμμα. Από ένα στρέμμα αραβοσίτου, παράγονται κατά μέσο όρο 300 λίτρα αιθανόλης. Ο συντελεστής ορυκτής ενέργειας για την παραγωγή της αιθανόλης από αραβόσιτο έχει την τιμή 1,3 δηλαδή η ενέργεια από ορυκτά καύσιμα για την παραγωγή του καυσίμου (εισροή) συγκριτικά με αυτή που αποδίδει (εκροή) είναι 1 προς 1,3. Η χρησιμοποίηση αιθανόλης από καλαμπόκι αντί για βενζίνη ως καύσιμο μεταφοράς μειώνει τις εκπομπές των αερίων του θερμοκηπίου κατά 21%. Η συνεχής αύξηση της ζήτησης του αραβοσίτου για την παραγωγή αιθανόλης όμως διπλασίασε την τιμή του σε διάστημα ενός χρόνου, από το 2006 έως το 2007 (Χριστακόπουλος και Τόπακας, 2013).

1.3. Παραγωγή βιοαιθανόλης

1.3.1. Γενικά

Κατά τις τελευταίες δύο δεκαετίες η τεχνολογία παραγωγής βιοαιθανόλης από γεωργικά και λιγνινοκυτταρινούχα υπολείμματα έχει αναπτυχθεί σε τέτοιο βαθμό ώστε σε μερικά χρόνια να αποτελέσει πραγματικότητα η παραγωγή σε βιομηχανική κλίμακα (Chandel *et al.*, 2007; Balat *et al.*, 2008).

Οι ιδιότητες της αιθανόλης την καθιστούν ένα σημαντικό εναλλακτικό καύσιμο για τον τομέα των μεταφορών. Έχει υψηλότερο βαθμό οκτανίων από τη βενζίνη, αντέχει μεγαλύτερους λόγους συμπίεσης, αποδίδοντας έτσι περισσότερη ισχύ πιο οικονομικά. Η καύση της αιθανόλης είναι πιο καθαρή από αυτή της βενζίνης, με μειωμένες εκπομπές μονοξειδίου του άνθρακα (CO), οξειδίων του αζώτου (NO_x) αλλά και μικροσωματιδίων. Παρόλα αυτά, η αιθανόλη έχει μικρότερη πυκνότητα από τη βενζίνη (περιέχει το 66% της ενέργειας της βενζίνης), χαμηλότερη τάση ατμών και η καύση της οδηγεί σε αυξημένη παραγωγή αλδευδών, οι οποίες συνεισφέρουν στο σχηματισμό του φωτοχημικού νέφους (Balat *et al.*, 2008). Οι σημαντικότερες

ιδιότητες της αιθανόλης παρουσιάζονται στον παρακάτω πίνακα.

Πίνακας 1-2. Ιδιότητες βιοαιθανόλης (Balat., 2007)

Ιδιότητες	Αιθανόλη
Αριθμός εξαδεκανίου	8
Αριθμός οκτανίου	107
Θερμοκρασία αυτανάφλεξης (K)	606
Λανθάνουσα θερμότητα εξάτμισης (MJ / kg)	0,91
Χαμηλή θερμαντική αξία (MJ / kg)	26,7

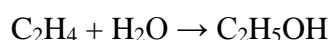
Η αιθανόλη αποδίδει πολύ καλά ως καύσιμο στα αυτοκίνητα, είτε σε καθαρή μορφή είτε ως μίγμα με βενζίνη. Τα μίγματα της βιοαιθανόλης κωδικοποιούνται συνδυάζοντας το γράμμα «E» (Ethanol) με το ποσοστό της βιοαιθανόλης και τα πιο συνηθισμένα είναι τα E85 (85% αιθανόλη-15% βενζίνη) και E10 (10% αιθανόλη-90% βενζίνη). Υπάρχουν επίσης το E100 (100% αιθανόλη) και το oxy-diesel, ένα μίγμα από 80% diesel, 10% αιθανόλη και 10% πρόσθετα και ενώσεις ανάμιξης (Balat *et al.*, 2008).

Η παραγωγή αιθανόλης έχει αυξηθεί μέσω της εφαρμογής ερευνητικών και βιομηχανικών προγραμμάτων σε πολλές χώρες τα τελευταία χρόνια (Πίνακας 1-3). Όλο και σημαντικότερο ποσοστό της αγροτικής παραγωγής στρέφεται στα βιοκαύσιμα στα πλαίσια μιας προσπάθειας μείωσης των εισαγωγών πετρελαίου και μείωσης της ατμοσφαιρικής ρύπανσης. Περίπου το 9% της αιθανόλης παράγεται συνθετικά, και έτσι το υπόλοιπο 91% της παγκόσμιας παραγωγής της αιθανόλης βασίζεται στη ζύμωση (Wheeler *et al.*, 1991). Τέλος, να σημειωθεί ότι το 73% της παραχθείσας αιθανόλης παγκοσμίως αντιστοιχεί στην αιθανόλη καυσίμων, το 17% στην αιθανόλη ποτοποιίας και το 10% στη βιομηχανική αιθανόλη.

Πίνακας 1-3. Χρήση βιοαιθανόλης ως καύσιμο (Murray, 2005; Berg, 2004)

Χώρα	Υλικό	Ποσοστό αιθανόλης στο μίγμα βενζίνης (% v/v)
Βραζιλία	Σακχαροκάλαμο	24
Η.Π.Α.	Καλαμπόκι	10
Καναδάς	Καλαμπόκι, σιτάρι, κριθάρι	7,5 - 10
Κολομβία	Σακχαροκάλαμο	10
Ισπανία	Σιτάρι, κριθάρι	-
Γαλλία	Σακχαρότευτλο, σιτάρι, καλαμπόκι	-
Σουηδία	Σιτάρι	5
Ινδία	Σακχαροκάλαμο	5
Ταϊλάνδη	Σακχαροκάλαμο, ρύζι	10

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



αιθυλένιο + νερό (ατμός) → αιθανόλη

Η βιοαιθανόλη μπορεί να παραχθεί από πλήθος υδατανθράκων (με γενικό μοριακό τύπο: $(\text{CH}_2\text{O})_n$). Στην περίπτωση της σακχαρόζης, αυτή αρχικώς υδρολύεται προς γλυκόζη και φρουκτόζη, γεγονός το οποίο μπορεί να επιτευχθεί είτε από τους ίδιους τους μικροοργανισμούς είτε με την προσθήκη εμπορικών σκευασμάτων ινβερτάσης.



Σακχαρόζη → γλυκόζη + φρουκτόζη

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



γλυκόζη (φρουκτόζη) → αιθανόλη + διοξείδιο του άνθρακα

Επίσης, το άμυλο μπορεί να μετατραπεί σε D-γλυκόζη, με τη βοήθεια του ενζύμου γλυκοαμυλάση. Μετά την ενζυμική υδρόλυση ακολουθεί η ζύμωση, η απόσταξη και η αφυδάτωση με σκοπό την παραγωγή άνυδρης βιοαιθανόλης (Demirbas, 2008).

1.3.2. Παραγωγή βιοαιθανόλης από λιγνινοκυτταρινούχα βιομάζα

Σύγχρονες μελέτες υποστηρίζουν ότι με τους σημερινούς ρυθμούς παραγωγής και κατανάλωσης των ορυκτών καυσίμων (πετρέλαιο, φυσικό αέριο και γαιάνθρακας), τα αποθέματα τους θα διαρκέσουν από 41 ως 700 χρόνια (Goldemberg, 2007). Έτσι λόγω της αναπόφευκτης εξάντλησης των παραπάνω αποθεμάτων, υπάρχει ενδιαφέρον για εναλλακτικές πηγές ενέργειας, όπως τα βιοκαύσιμα (Chandel *et al.*, 2007; Balat *et al.*, 2008; Demirbas, 2009).

Πολλές χώρες υποστηρίζουν ότι η παραγωγή βιοκαυσίμων θα ελαττώσει την εκπομπή των αερίων του θερμοκηπίου. Παρά το γεγονός αυτό όμως, πρόσφατες έρευνες αναφέρουν ότι ορισμένες διαδικασίες παραγωγής βιοκαυσίμων μπορεί τελικά να οδηγήσουν σε επιπλέον προσθήκη αερίων του θερμοκηπίου ή απαιτούν πολλά χρόνια για την απόσβεση του προστιθέμενου CO₂.

Ωστόσο, η ασφάλεια του ενεργειακού εφοδιασμού, η ικανότητα υποστήριξης, και η ζήτηση στην αγορά, ελέγχουν τις παραμέτρους για την ανάπτυξη των ενεργειακών συστημάτων. Η βιοαιθανόλη είναι μέρος της λύσης στην ερώτηση για την ασφάλεια της προσφοράς και της ζήτησης για μια βιώσιμη ανάπτυξη στον τομέα των μεταφορών. Σε όλη την Ευρώπη, υπάρχει μια ταχεία επέκταση των μονάδων παραγωγής βιοαιθανόλης πρώτης γενιάς, βασισμένη στη μετατροπή της σακχαρόζης και του αμύλου από τους βολβούς και τα δημητριακά. Έντονο ενδιαφέρον έχει προκύψει στη ζύμωση της πλούσιας σε υδατάνθρακες βιομάζας (έως 70%) για να παρέχει τις εναλλακτικές λύσεις στις πετροχημικές πηγές για τα καύσιμα και για τους οργανικούς χημικούς προδρόμους. Η ζύμωση των πηγών αμύλου όπως το καλαμπόκι ή ο σίτος έχει αποδειχθεί οικονομικά βιώσιμη και σε κλίμακα παραγωγής. Εντούτοις,

το δίλημμα είναι ότι αυτές οι πρώτες ύλες θα μπορούσαν επίσης να χρησιμοποιηθούν ως τρόφιμα ή τροφή. Επομένως, η βιομάζα αγροτικών παραπροϊόντων είναι μια ενδιαφέρουσα πρώτη ύλη για την παραγωγή βιοαιθανόλης. Η παγκόσμια, λιγνινοκυτταρινούχα βιομάζα είναι μια τεράστια ανεκμετάλλευτη πηγή που έχει τη δυνατότητα μιας εκτενούς βιώσιμης παραγωγής των βιολογικών καυσίμων για τη μεταφορά (Klinke *et al.*, 2001).

Η ζύμωση των λιγνινοκυτταρινούχων προϊόντων της πετροχημικής βιομηχανίας, συμπεριλαμβανομένων των δημοτικών και γεωργικών αποβλήτων, αποκαλείται τεχνολογία βιοαιθανόλης δεύτερης γενεάς, και αντιμετωπίζει τα υψηλότερα εμπόδια στην οικονομική βιωσιμότητα. Βελτιώσεις που μειώνουν τις δαπάνες, βελτιώνουν την παραγωγή ή την αποδοτικότητα των διαδικασιών ζύμωσης βιοαιθανόλης δεύτερης γενεάς είναι απαραίτητες (Klinke *et al.*, 2001).

Γενικότερα αρκετοί πολιτικοί και επιστήμονες εκφράζουν αισιοδοξία πως με την ανάπτυξη και αξιοποίηση των βιοκαυσίμων «2ης γενιάς», όπως η βιοαιθανόλη από λιγνινοκυτταρινούχες πρώτες ύλες, θα ικανοποιηθούν αρκετές από τις παγκόσμιες ενεργειακές ανάγκες (Chandel *et al.*, 2007; Balat *et al.*, 2008).

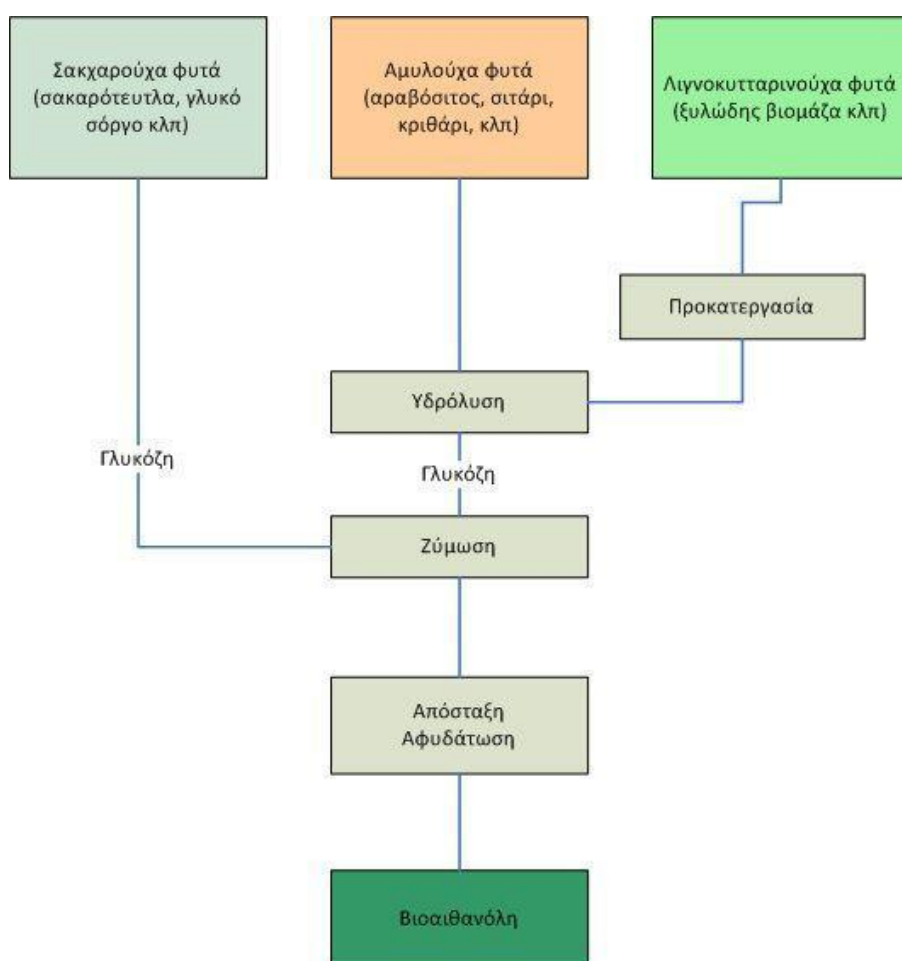
Η ιδιαίτερα περίπλοκη δομή των λιγνινοκυτταρινούχων υλικών καθιστά πολύ δύσκολη την αποικοδόμηση τους από τους μικροοργανισμούς, για αυτό το λόγο υπόκεινται σε κάποιες διεργασίες που έχουν σαν στόχο την απομάκρυνση της (Lee, 1997). Κατόπιν των σταδίων αυτών λαμβάνει χώρα η ενζυμική υδρόλυση και η ζύμωση. Το σημαντικότερο στάδιο της παραγωγής βιοαιθανόλης αποτελεί το στάδιο της ενζυμικής επεξεργασίας της κυτταρίνης για την παραγωγή σακχάρων. Συνήθως του σταδίου αυτού προηγείται ένα στάδιο προκατεργασίας (Sun & Cheng, 2002).

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

προκατεργασία και η υδρόλυση μπορούν να υλοποιηθούν από κοινού σε ένα στάδιο (Sun & Cheng, 2002).

Ένα από τα πλεονεκτήματα της βιομετατροπής λιγνινοκυτταρινούχων υλικών είναι και η δυνατότητα δημιουργίας ενός βιοδιυλιστηρίου, αξιοποιώντας το σύνολο των συστατικών τους για παραγωγή προϊόντων υψηλής προστιθέμενης αξίας, παράλληλα με την παραγωγή βιοαιθανόλης, αυξάνοντας έτσι τη συνολική δυνατότητα κέρδους και παραγωγικότητας από τα λιγνινοκυτταρινούχα υλικά (Balat *et al.*, 2008).

Διάγραμμα 1-1. Παραγωγή βιοαιθανόλης (Sun & Cheng, 2002)



Συνεπώς, το συμπέρασμα όλων των μελετών είναι πως από το 2015 και μετά η παραγωγή της αιθανόλης θα γίνεται κυρίως από τη λιγνινοκυτταρινούχο βιομάζα. Η διαδικασία αυτή μπορεί να πραγματοποιηθεί με δύο τρόπους. Πρώτον, με την υδρόλυση της λιγνινοκυτταρινούχου βιομάζας και τη μετέπειτα βιομετατροπή της σε

αιθανόλη και δεύτερον, με θερμοχημική κατεργασία της λιγνινοκυτταρινούχου βιομάζας (Χριστακόπουλος και Τόπακας, 2013).

Επιπλέον, αξίζει να αναφερθεί πως στο παρελθόν, έχουν προταθεί πολλές διαφορετικές διεργασίες για την υδρόλυση της λιγνινοκυτταρινούχου βιομάζας. Σήμερα, όμως, δύο διεργασίες κυριαρχούν (Χριστακόπουλος και Τόπακας, 2013):

- i. η όξινη υδρόλυση
- ii. η ενζυμική υδρόλυση, έχοντας προηγηθεί η κατάλληλη προκατεργασία.

1.3.3. Όξινη υδρόλυση της λιγνινοκυτταρινούχου βιομάζας

Η όξινη υδρόλυση της φυτικής λιγνινοκυτταρινούχου βιομάζας είναι γνωστή από το 1819. Η όξινη υδρόλυση μπορεί να λάβει χώρα με διάφορα είδη οξέων, συμπεριλαμβανομένου του θειώδους, του θεικού, του υδροχλωρικού, του υδροφθορικού, του φωσφορικού, του νιτρικού και του μεθανικού οξέος. Τα οξέα αυτά χρησιμοποιούνται είτε πυκνά είτε αραιά (Larsson *et al.*, 1999(a); Larsson *et al.*, 1999(b)).

Το κύριο πλεονέκτημα της υδρόλυσης με αραιό οξύ είναι η σχετικά χαμηλή κατανάλωση οξέων. Ωστόσο, για την επίτευξη αποδεκτών ρυθμών μετατροπής της κυτταρίνης σε γλυκόζη απαιτούνται υψηλές θερμοκρασίες, οι οποίες με τη σειρά τους αυξάνουν το ρυθμό της αποσύνθεσης των σακχάρων της ημικυτταρίνης και της διάβρωσης του εξοπλισμού. Η μέγιστη απόδοση γλυκόζης επιτυγχάνεται σε υψηλές θερμοκρασίες και μικρούς χρόνους παραμονής, αλλά δε ξεπερνάει το 60% της θεωρητικής τιμής. Επίσης, ορισμένα προϊόντα της αποδόμησης των σακχάρων παρεμποδίζουν το ακόλουθο στάδιο της ζύμωσης (Larsson *et al.*, 1999(a); Larsson *et al.*, 1999(b)). Τέλος, ένα ακόμα μεγάλο μειονέκτημα της μεθόδου αποτελεί η καταστροφή του μεγαλύτερου μέρους των πεντοζών που προέρχονται από την ημικυτταρίνη καθώς και ενός μέρους των εξοζών που προέρχονται από την κυτταρίνη λόγω της εφαρμογής υψηλών θερμοκρασιών (Χριστακόπουλος και Τόπακας, 2013).

Διεργασίες με πυκνά οξέα πραγματοποιούνται σε ήπιες θερμοκρασίες και κανονικές πιέσεις για μερικές ώρες. Ως αποτέλεσμα, δίνουν υψηλές αποδόσεις (έως και 90% της

μέγιστης απόδοσης σε γλυκόζη) με την ταυτόχρονη παραγωγή ελάχιστων παρεμποδιστών. Οι μεγάλες όμως ποσότητες των χρησιμοποιούμενων οξέων δημιουργούν προβλήματα διάβρωσης του εξοπλισμού και η απαίτηση για ανακύκλωση του μεγαλύτερου μέρους των οξέων συνεισφέρει με επιπρόσθετη κατανάλωση ενέργειας (Larsson *et al.*, 1999(a); Larsson *et al.*, 1999(b)).

1.3.4. Προκατεργασία της λιγνινοκυτταρινούχου βιομάζας

Όταν χρησιμοποιούνται ένζυμα για την σακχαροποίηση της κυτταρίνης, είναι απαραίτητο να προηγηθεί μια προκατεργασία (φυσική ή/και χημική) που θα αυξήσει την επιδεκτικότητα του πολυσακχαρίτη στις διάφορες ενζυμικές δράσεις, απομακρύνοντας ταυτόχρονα την ημικυτταρίνη και τη λιγνίνη που αποτελούν τα φυσικά εμπόδια της αποικοδόμησης της κυτταρίνης (Χριστακόπουλος και Τόπακας, 2013). Η λιγνινοκυτταρίνη προστατεύεται από τη συμπαγή και περιοριστική δομή της μήτρας της ημικυτταρίνης και της λιγνίνης. Για το λόγο αυτό, και λόγω της στενής σύνδεσης της κυτταρίνης και της ημικυτταρίνης με τη λιγνίνη, είναι απαραίτητο να λαμβάνει χώρα προκατεργασία της πρώτης ύλης, η οποία και να εξασφαλίζει την ελαχιστοποίηση της χημικής καταστροφής των ζυμώσιμων σακχάρων για την παραγωγή αιθανόλης σε μεγαλύτερες αποδόσεις. Με την προκατεργασία γίνεται δυνατή η διάσπαση της κρυσταλλικής δομής της κυτταρίνης και αυξάνεται το πορώδες της λιγνινοκυτταρίνης ώστε να επιτρέπεται η εισχώρηση των ενζύμων στις ίνες, με αποτέλεσμα οι υδατάνθρακες να είναι πλέον διαθέσιμοι για τη διεργασία της ενζυμικής υδρόλυσης για την παραγωγή μονοσακχαριτών και στη συνέχεια για τη ζύμωση αυτών προς αιθανόλη (Chandel *et al.*, 2007; Balat *et al.*, 2008; Sánchez & Cardona, 2008; Tomás-Pejó *et al.*, 2008; Kumar *et al.*, 2008).

Μια αποτελεσματική προκατεργασία πρέπει να διαθέτει τα εξής στοιχεία: (α) να οδηγεί σε απελευθέρωση ή να αυξάνει την απόδοση παραγωγής σακχάρων κατά την ενζυμική υδρόλυση, (β) να αποφεύγεται η αποικοδόμηση ή απώλεια των υδατανθράκων, (γ) να παράγει ελάχιστα ή μηδενικά επίπεδα παραπροϊόντων που παρεμποδίζουν την μετέπειτα υδρόλυση και ζύμωση και (δ) να έχει χαμηλές απαιτήσεις σε ενέργεια, κεφάλαιο και λειτουργικά έξοδα (Balat *et al.*, 2008; Sánchez & Cardona 2008). Η προκατεργασία είναι από τα πιο δαπανηρά στάδια της

διεργασίας παραγωγής βιοαιθανόλης από λιγνινοκυτταρινούχα υλικά, αποτελώντας έως και το 33% του συνολικού κόστους παραγωγής (Chandel *et al.*, 2007; Tomás-Pejó *et al.*, 2008).

Τις τελευταίες δεκαετίες έχει αναφερθεί ένα ευρύ φάσμα μεθόδων προκατεργασίας οι οποίες διακρίνονται σε τέσσερις κατηγορίες (Galbe & Zacchi, 2007; Sánchez & Cardona, 2008; Lee *et al.*, 2008; Tomás-Pejó *et al.*, 2008; Hayes, 2009):

- i. φυσικές (άλεση, κονιορτοποίηση, ακτινοβόληση κτλ),
- ii. χημικές (άλκαλι, αραιό οξύ, οξειδωτικές ενώσεις, οργανικοί διαλύτες κτλ),
- iii. φυσικοχημικές (προκατεργασία με ατμό, υδροθερμόλυση, υγρή οξείδωση κτλ)
- iv. βιολογικές
ή ακόμα και συνδυασμός των παραπάνω.

i. Φυσικές προκατεργασίες

Η φυσική προκατεργασία, δηλαδή η άλεση και ο τεμαχισμός της βιομάζας, διευκολύνει την ενζυμική υδρόλυση αυξάνοντας την ενεργή επιφάνεια της κυτταρίνης και της ημικυτταρίνης και μειώνοντας την κρυσταλλικότητα της κυτταρίνης (Galbe & Zacchi, 2007; Kumar *et al.*, 2008; Sánchez & Cardona, 2008; Tomás-Pejó *et al.*, 2008). Παρόλα αυτά, οι συγκεκριμένες προκατεργασίες είναι εξαιρετικά ενεργοβόρες καθιστώντας τις απαγορευτικές για εφαρμογή σε βιομηχανική κλίμακα, εκτός αν συνδυαστούν με θέρμανση ή προσθήκη χημικών (Galbe & Zacchi, 2007; Tomás-Pejó *et al.*, 2008; Sánchez & Cardona, 2008; Hayes, 2009).

ii. Χημικές προκατεργασίες

Οι χημικές προκατεργασίες χρησιμοποιούν διάφορες χημικές ενώσεις όπως όζον, οξέα, αλκάλια, υπεροξειδία και οργανικούς διαλύτες. Τα ανόργανα οξέα όπως H_2SO_4 και HCl χρησιμοποιούνται κατά κανόνα για την προκατεργασία της βιομάζας. Η υδρόλυση με αραιό θειικό οξύ (συνήθως κάτω από 4g/100g υλικού) έχει εφαρμοστεί επιτυχώς, δεδομένου ότι υδρολύεται η ημικυτταρίνη και βελτιώνεται σημαντικά το

μετέπειτα στάδιο της ενζυμικής υδρόλυσης (Galbe & Zacchi 2007, Chandel *et al.*, 2007; Sánchez & Cardona, 2008; Tomás-Pejó *et al.*, 2008; Balat *et al.*, 2008; Hayes, 2009). Η χρήση πυκνού οξέος δεν ενδείκνυται, αφενός λόγω του υψηλού κόστους και αφετέρου λόγω πρόκλησης σημαντικών λειτουργικών προβλημάτων, όπως διάβρωση των μηχανημάτων (Hamelinck *et al.*, 2005; Sánchez & Cardona, 2008).

Στην αλκαλική προκατεργασία προστίθενται αραιές βάσεις (όπως NaOH ή Ca(OH)₂) στη βιομάζα, οι οποίες δρουν αυξάνοντας την εσωτερική επιφάνεια του υλικού. Αυτό γίνεται κυρίως μέσω διόγκωσης των πόρων του υλικού, μείωσης του βαθμού πολυμερισμού και της κρυσταλλικότητας της κυτταρίνης, διάσπασης των δεσμών λιγνίνης-υδατανθράκων και τέλος απομάκρυνσης της λιγνίνης (Galbe & Zacchi, 2007; Sánchez & Cardona, 2008; Tomás-Pejó *et al.*, 2008; Balat *et al.*, 2008; Hayes 2009).

Μια άλλη προσέγγιση είναι η χρήση οργανικών διαλυτών ή μιγμάτων νερού και οργανικών διαλυτών με προσθήκη ενός ανόργανου οξέος (H₂SO₄ και HCl), με αποτέλεσμα τη διάσπαση των εσωτερικών δεσμών της λιγνίνης και της ημικυτταρίνης. Η μέθοδος αυτή αναφέρεται συνήθως ως «organosolv» και έχει υψηλό κόστος λόγω της χρήσης οργανικών διαλυτών (Pan *et al.*, 2005; Galbe & Zacchi, 2007).

iii. Φυσικοχημικές προκατεργασίες

Η φυσικοχημική προκατεργασία περιλαμβάνει μεθόδους που αποτελούν συνδυασμό φυσικών και χημικών μεθόδων. Η προκατεργασία με ατμό (steam pretreatment) είναι μια από τις πλέον χρησιμοποιούμενες μεθόδους προκατεργασίας λιγνινοκυτταρινούχων υλικών (Galbe & Zacchi, 2007; Tomás-Pejó *et al.*, 2008; Sánchez & Cardona, 2008; Hayes, 2009). Η μέθοδος αυτή καλείται και «έκρηξη με ατμό» (steam explosion), λόγω της απότομης εκτόνωσης της πίεσης που οδηγεί σε αποδιάταξη του πλέγματος των ινών των λιγνινοκυτταρινούχων υλικών. Μελέτες υποστηρίζουν επιπλέον ότι προκαλείται όξινη υδρόλυση από τα οργανικά οξέα που περιέχονται σε ορισμένα είδη βιομάζας, τα οποία δρουν ως καταλύτες στην υδρόλυση της ημικυτταρίνης σε ολιγο- και μονοσακχαρίτες, καθιστώντας την κυτταρίνη πιο εύαλπη στη δράση των ενζύμων. Λόγω της διαφοράς στη σύσταση σε οργανικά

οξέα, ορισμένα λιγνινοκυτταρινούχα υλικά είναι πιο εύκολο να διασπαστούν σε σχέση με άλλα (Galbe & Zacchi, 2007; Hayes 2009). Η προκατεργασία με ατμό μπορεί να βελτιωθεί με προσθήκη οξέος, όπως H_2SO_4 και SO_2 , προσομοιάζοντας την υδρόλυση με αραιό οξύ αλλά με πολύ μικρότερο ποσοστό υγρασίας (Galbe & Zacchi, 2007; Tomás-Rejón *et al.*, 2008).

Η υδροθερμόλυση (hydrothermolysis, liquid hot-water treatment) είναι μία υδροθερμική κατεργασία που δεν απαιτεί ραγδαία αποσυμπίεση και δε χρησιμοποιεί κανένα χημικό ή καταλύτη. Πίεση εφαρμόζεται για τη διατήρηση του νερού σε υγρή μορφή σε υψηλές θερμοκρασίες (160-240°C) και προκαλεί μετατροπές στη δομή του λιγνινοκυτταρινούχο υλικού. Ο στόχος αυτής της προκατεργασίας είναι η διαλυτοποίηση της ημικυτταρίνης, η αύξηση της προσβασιμότητας της κυτταρίνης και η αποφυγή του σχηματισμού παρεμποδιστών. Το μίγμα που προκύπτει μετά την προκατεργασία μπορεί να φιλτραριστεί για την ανάκτηση δύο κλασμάτων: α) ένα στερεό κλάσμα πλούσιο σε κυτταρίνη και β) ένα υγρό κλάσμα πλούσιο σε σάκχαρα που προέρχονται από την ημικυτταρίνη (κυρίως ξυλόζη). Για την αποφυγή του σχηματισμού παρεμποδιστών το pH πρέπει να διατηρείται στο 4-7. Η προκατεργασία με θερμό νερό απομακρύνει μέχρι και το 80% της ημικυτταρίνης και ενισχύει την επιδεκτικότητα του υλικού σε ένζυμα. Η λιγνίνη αποπολυμερίζεται και διαλυτοποιείται μερικώς κατά την προκατεργασία αλλά η απολιγνινοποίηση μόνο με θερμό νερό δεν είναι δυνατή εξαιτίας της ανασυμπύκνωσης διαλυτών ενώσεων που προέρχονται από τη λιγνίνη. Γενικά, η προκατεργασία με θερμό νερό είναι ελκυστική εξαιτίας του χαμηλού κόστους της καθώς δεν απαιτείται καταλύτης, ενώ το κόστος κατασκευής και συντήρησης είναι χαμηλό εξαιτίας του χαμηλού κινδύνου για διάβρωση. Ένα ακόμα μεγάλο πλεονέκτημα της συγκεκριμένης διαδικασίας είναι η μειωμένη συγκέντρωση αποικοδομήσιμων προϊόντων και αυτό οφείλεται στο γεγονός πως τα διαλυμένα προϊόντα της ημικυτταρίνης και της λιγνίνης βρίσκονται σε χαμηλή συγκέντρωση εξαιτίας των υψηλών ποσοτήτων νερού που χρησιμοποιούνται. Ωστόσο, αυτή η διεργασία απαιτεί υψηλές ποσότητες νερού και περισσότερη ενέργεια από ότι διεργασίες που όπως η προκατεργασία με εκτόνωση ατμού (Hayes, 2009).

Άλλες φυσικοχημικές μέθοδοι περιλαμβάνουν την υγρή οξείδωση (wet oxidation) και την «εκτόνωση ίνας με αμμωνία» (Ammonia fiber explosion, AFEX). Στην πρώτη, η

βιομάζα επεξεργάζεται σε νερό και αέρα ή οξυγόνο, σε θερμοκρασίες άνω των 120°C, με την προσθήκη ορισμένες φορές κάποιου αλκαλικού καταλύτη. Η μέθοδος αυτή είναι κατάλληλη για υλικά με χαμηλό ποσοστό λιγνίνης (Galbe & Zacchi, 2007). Η εκτόνωση ίνας με αμμωνία είναι μια αλκαλική μέθοδος, παρόμοια με την κατεργασία με ατμό η οποία όμως γίνεται σε υψηλή πίεση (πάνω από 3 MPa). Κατά την προκατεργασία αυτή μόνο ένα μικρό μέρος της βιομάζας διαλυτοποιείται, αλλά η δομή του υλικού αλλάζει, διασπώνται οι δεσμοί λιγνίνης-υδατανθράκων, αυξάνοντας έτσι την πρόσβαση και υδρόλυση των ενζύμων (Galbe & Zacchi, 2007; Balat *et al.*, 2008; Hayes 2009). Παρά τις ενδεχόμενες υψηλές αποδόσεις, η μέθοδος AFEX έχει μεγάλο κόστος λόγω της χρήσης αμμωνίας και της ανάκτησής της, αλλά και σημαντικά θέματα ασφάλειας (Hayes, 2009).

iv. Βιολογικές προκατεργασίες

Στις βιολογικές προκατεργασίες χρησιμοποιούνται μικροοργανισμοί, όπως οι βασιδιομύκητες, που μπορούν να αποικοδομούν την λιγνίνη. Η μέθοδος αυτή θεωρείται φιλική προς το περιβάλλον και ενεργειακά οικονομική, καθώς δεν απαιτεί υψηλές θερμοκρασίες και χρήση χημικών. Όμως ο ρυθμός κατεργασίας των βιολογικών μεθόδων είναι πολύ χαμηλός ώστε να εφαρμοστούν σε βιομηχανική κλίμακα και ένα μέρος της πρώτης ύλης χάνεται λόγω της κατανάλωσής του από τους μικροοργανισμούς (Galbe & Zacchi, 2007; Kumar *et al.*, 2008; Tomás-Pejó *et al.*, 2008; Balat *et al.*, 2008; Sánchez & Cardona, 2008).

1.3.5. Ενζυμική υδρόλυση της λιγνινοκυτταρινούχου βιομάζας

Το αδιάλυτο κλάσμα που απομένει μετά την προκατεργασία των λιγνινοκυτταρινούχων υλικών, αποτελείται κυρίως από κυτταρίνη και λιγνίνη, καθώς το μεγαλύτερο μέρος του κλάσματος των ημικυτταρινών έχει διαλυτοποιηθεί. Έτσι, η πιο σημαντική ενζυμική δράση που είναι αναγκαία για την υδρόλυση της προκατεργασμένης βιομάζας είναι εκείνη των κυτταρινασών. Βέβαια, και η παρουσία των ημικυτταρινασών θεωρείται απαραίτητη μιας και το ημικυτταρινούχο κλάσμα μπορεί να συνεισφέρει σημαντικά σε ζυμώσιμα σάκχαρα και να ελαττωθεί σημαντικά το κόστος παραγωγής της βιοαιθανόλης (Χριστακόπουλος και Τόπακας, 2013).

Η βιοαποικοδόμηση της λιγνινοκυτταρίνης άρχισε να αναπτύσσεται κατά τη δεκαετία του 1960. Λαμβάνει χώρα σε χαμηλές θερμοκρασίες με τη χρήση ενζύμων ως καταλύτες και παρέχει εξειδικευμένη μετατροπή της κυτταρίνης. Η κυτταρίνη είναι ο κύριος πολυσακχαρίτης που απομένει μετά από τις περισσότερες προκατεργασίες. Επομένως, θεωρείται ότι έχει τη δυνατότητα επίτευξης μεγαλύτερων αποδόσεων και μειωμένου σχηματισμού τοξικών ενώσεων σε σχέση με την όξινη υδρόλυση. Η παραγωγή κυτταρινασών είναι κοινή για τους μύκητες. Τα ένζυμα αυτά υδρολύουν τους β-1,4-γλυκοζιτικούς δεσμούς. Η δράση των κυτταρινασών είναι συνεργιστική, δηλαδή η συνδυασμένη δραστηριότητα των ενζύμων είναι μεγαλύτερη από το άθροισμα των δράσεων όλων των ενζύμων ξεχωριστά. Τρία είδη ενζύμων δρουν συνεργιστικά για την υδρόλυση της κυτταρίνης (Galbe & Zacchi, 2002; Balat *et al.*, 2008; Kumar *et al.*, 2008; Hayes, 2009):

- i. οι ενδο-β-1,4-γλουκανάσες οι οποίες προσβάλλουν εσωτερικά τις άμορφες περιοχές της αλυσίδας της κυτταρίνης,
- ii. οι κελλοβιοϋδρολάσες ή εξωγλουκανάσες προσβάλλουν τα άκρα του πολυμερούς (κυτταρίνης), απελευθερώνοντας κελλοβιόζη
- iii. οι β-γλυκοζιδάσες οι οποίες διασπούν την κελλοβιόζη σε δύο μόρια D-γλυκόζης

Όπως αναφέρθηκε παραπάνω η σχηματιζόμενη κελλοβιόζη διασπάται σε δύο μόρια γλυκόζης με τη δράση των β-γλυκοζιδασών. Αυτό είναι σημαντικό για την πορεία της υδρόλυσης επειδή η κελλοβιόζη παρεμποδίζει τη δράση πολλών κυτταρινασών. Από την άλλη, η β-γλυκοζιδάσες παρεμποδίζονται από τη γλυκόζη. Έτσι, από τη στιγμή που τα ένζυμα παρεμποδίζονται από τα τελικά προϊόντα, ο σχηματισμός τους επηρεάζει αρνητικά την υδρόλυση της κυτταρίνης. Δεν είναι δυνατόν να βρεθούν μοναδικές βέλτιστες συνθήκες της υδρόλυσης, καθώς αυτές εξαρτώνται από παράγοντες όπως η σύσταση σε ξηρή μάζα, το pH, η θερμοκρασία, ο χρόνος παραμονής και η πηγή των ενζύμων. Γενικά, μικρότερες συγκεντρώσεις στερεών οδηγούν σε υψηλότερες αποδόσεις της υδρόλυσης. Η συγκέντρωση των κυτταρινασών έχει μεγάλη επίδραση στη μετατροπή της κυτταρίνης. Τέλος, αυξομειώσεις στο χρόνο της υδρόλυσης επηρεάζουν τη βέλτιστη θερμοκρασία, το pH και τις υπόλοιπες συνθήκες (Galbe & Zacchi, 2002).

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

Τα υδρολυτικά ένζυμα βρίσκονται είτε ελεύθερα είτε σε συμπλέγματα. Τα συμπλέγματα ενζυμικών συστημάτων είναι γνωστά και ως «cellulosomes» και συνήθως υπάρχουν σε αναερόβια βακτήρια και μύκητες, ενώ οι αερόβιοι μικροοργανισμοί παράγουν συνήθως ξεχωριστά ένζυμα που εκκρίνονται στο μέσο ανάπτυξης (Kumar *et al.*, 2008).

Οι κύριοι παράγοντες που επηρεάζουν την ενζυμική υδρόλυση περιλαμβάνουν το είδος και τα χαρακτηριστικά του υποστρώματος, την ενεργότητα των ενζύμων και τις συνθήκες της αντίδρασης (Sun & Cheng, 2002; Balat *et al.*, 2008). Η μη-αναστρέψιμη προσρόφιση των ενζύμων στο υπόστρωμα είναι μερικώς υπεύθυνη για την σταδιακή απενεργοποίησή τους, το οποίο όμως μπορεί να ελαχιστοποιηθεί με την προσθήκη κάποιων επιφανειοδραστικών ουσιών, όπως Tween και πολυαιθυλενογλυκόλη (Kristensen & Börjesson, 2007; Balat *et al.*, 2008; Lee *et al.*, 2008). Τέλος, η δυνατότητα ανακύκλωσης των ενζύμων μπορεί να μειώσει το κόστος της υδρόλυσης (Steele *et al.*, 2005; Cardona & Sánchez, 2007; Tu *et al.*, 2009).

1.3.6. Θερμοχημική μετατροπή της λιγνινοκυτταρινούχου βιομάζας

Στη θερμοχημική μετατροπή, τα συστατικά της λιγνινοκυτταρινούχου βιομάζας μετατρέπονται αρχικά σε αέριο σύνθεσης (syngas) υπό την επίδραση έντονης θέρμανσης και μερική παροχή αέρα στο εσωτερικό ενός αεροποιητή. Το αέριο σύνθεσης μετατρέπεται ακολούθως σε αιθανόλη μέσω ζυμωτικής ή καταλυτικής

διεργασίας (Χριστακόπουλος και Τόπακας, 2013).

1.4. Διεργασίες παραγωγής αιθανόλης

Στη βιβλιογραφία συχνά δηλώνεται ότι μια διαδικασία παραγωγής αιθανόλης βασισμένη στη λιγνινοκυτταρίνη απαιτεί έναν οργανισμό που με ζύμωση να μπορεί να μετατρέψει ταυτόχρονα πεντόζες και εξόζες σε αιθανόλη (Lachke, 2002; Hahn-Hägerdal *et al.*, 2007). Η διεργασία της ενζυμικής υδρόλυσης μπορεί να σχεδιαστεί με διάφορους τρόπους. Τα βήματα που ακολουθούν την προκατεργασία, δηλαδή η ενζυμική υδρόλυση και η ζύμωση των σακχάρων, μπορούν να διεξαχθούν ξεχωριστά σε διαφορετικούς αντιδραστήρες (Separate Hydrolysis and Fermentation, SHF) ή ταυτόχρονα στον ίδιο αντιδραστήρα (Simultaneous Saccharification and Fermentation, SSF) (Galbe & Zacchi, 2002). Η βέλτιστη θερμοκρασία για την ενζυμική υδρόλυση είναι περίπου στους 45-50°C και για τη ζύμωση στους 30-33°C. Βασικό πλεονέκτημα της διεργασίας SHF είναι η ικανότητα εφαρμογής των άριστων συνθηκών και για τις δύο διεργασίες. Ωστόσο η διεργασία SHF μειονεκτεί έναντι της SSF καθώς τα σάκχαρα που απελευθερώνονται παρεμποδίζουν τα ένζυμα κατά την υδρόλυση ενώ στη διεργασία SSF, τα παραγόμενα σάκχαρα καταναλώνονται άμεσα από το μικροοργανισμό της ζύμωσης, και αποφεύγεται η παρεμπόδιση της δράσης της β- γλυκοζιδάσης. Επιπλέον, η ζύμη μπορεί να παρεμποδιστεί από τις υψηλές συγκεντρώσεις της γλυκόζης. Επομένως, ένα ακόμα πλεονέκτημα για τη ζύμωση είναι η προσθήκη της ζύμης προτού η συγκέντρωση της γλυκόζης φτάσει σε υψηλά επίπεδα. Αξίζει, εντούτοις, να σημειωθεί ότι η αιθανόλη μπορεί επίσης να εμποδίσει τα κυτταρινούχα ένζυμα (Holtzapfel *et al.*, 1990; Yourchisin, 2004). Ένα ακόμη πλεονέκτημα της διεργασίας SSF σε σύγκριση με την SHF είναι η ενσωμάτωση των διεργασιών της υδρόλυσης και της ζύμωσης σε έναν κοινό αντιδραστήρα. Η διεργασία γίνεται συμβιβαστικά στους 35°C, αλλά η ανάπτυξη ανασυνδυασμένων στελεχών ζύμης αναμένεται να βελτιώσει την απόδοσή της. Τέλος, ένα σημαντικό μειονέκτημα της SSF είναι η δυσκολία ανακύκλωσης και επαναχρησιμοποίησης της ζύμης γιατί αναμιγνύεται με τα υπολείμματα της λιγνίνης (Galbe & Zacchi, 2002).

Επίσης, μια άλλη μέθοδος είναι η άμεση μικροβιακή μετατροπή (Direct Microbial Conversion, DMC ή Consolidated Bioprocessing, CBP). Σ' 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 (Panagiotou *et al.*, 2005).

1.5. Αιθανολοπαραγωγοί μικροοργανισμοί

Η ζύμη *Saccharomyces cerevisiae* έχει εδραιωθεί στην παραγωγή αιθανόλης από σακχαρούχα και αμυλούχα υποστρώματα, εμφανίζει υψηλές αποδόσεις αλλά και ανθεκτικότητα στην αιθανόλη, σε παραπροϊόντα της ζύμωσης και σε άλλες παρεμποδιστικές ενώσεις που είναι παρούσες σε λιγνινοκυτταρινούχα υλικά (Galbe & Zacchi, 2002). Η ζύμη *S. cerevisiae* μεταβολίζει την γλυκόζη σε αιθανόλη μέσω του μονοπατιού Embden-Meyerhof-Parnas (EMP). Ένα διαφορετικό μονοπάτι αφομοίωσης της γλυκόζης είναι το Entner-Doudoroff (ED), που αξιοποιείται συνοδευτικά με το EMP από πολλά βακτήρια, όπως του γένους *Zymomonas*. Τα βακτήρια αυτά είναι οι μόνοι μικροοργανισμοί που μεταβολίζουν αναερόβια τη γλυκόζη μέσω του ED μονοπατιού, σε αντίθεση με το EMP ή τη γλυκόλυση (Dien *et al.*, 2003). Το μονοπάτι ED αποδίδει μόνο το μισό ποσοστό ATP ανά mol γλυκόζης σε σχέση με το EMP, με αποτέλεσμα τα βακτήρια *Zymomonas* να παράγουν λιγότερη κυτταρική βιομάζα σε σχέση με τη ζύμη και να διοχετεύουν μεγαλύτερο ποσοστό της πηγής άνθρακα προς μεταβολικά προϊόντα. Το βακτήριο *Zymomonas mobilis* είναι ένας άλλος μικροοργανισμός που χρησιμοποιείται στη βιομηχανική παραγωγή αιθανόλης, το οποίο έχει υψηλότερες αποδόσεις από τις ζύμες, λόγω της παραγωγής λιγότερης βιομάζας, αλλά αναπτύσσεται με πιο αργό ρυθμό (Galbe & Zacchi, 2002; Dien *et al.*, 2003).

Σε αντίθεση με την επεξεργασία των σακχαρούχων και αμυλούχων υποστρωμάτων όπου απελευθερώνονται μόνο μονομερή γλυκόζης, η επεξεργασία των λιγνινοκυτταρινούχων υποστρωμάτων οδηγεί και σε πεντόζες. Όμως η ζύμη *S. cerevisiae* και το βακτήριο *Z. mobilis* δε διαθέτουν την ικανότητα μεταβολισμού των πεντοζών. Στη φύση, ορισμένα βακτήρια, μύκητες και κάποιες ζύμες έχουν την ικανότητα να μεταβολίζουν πεντόζες, αλλά με χαμηλή απόδοση σε αιθανόλη. Η

χρήση σε μεγάλη κλίμακα ζυμών που μεταβολίζουν πεντόζες παρουσιάζει προβλήματα λόγω της ευαισθησίας τους σε υψηλές συγκεντρώσεις αιθανόλης, της απαίτησης για συγκεκριμένες συνθήκες αερισμού, την υψηλή ευαισθησία σε παρεμποδιστές και την ανικανότητα να ζυμώσουν τις πεντόζες σε χαμηλά pH (Agbogbo & Coward-Kelly, 2008; Jeffries *et al.*, 2007).

Συνοπτικά, δηλαδή προκύπτει πως ο μικροοργανισμός που θα χρησιμοποιηθεί στη διεργασία παραγωγής αιθανόλης από λιγνινοκυτταρινούχα βιομάζα πρέπει να έχει όσο το δυνατόν περισσότερα από τα χαρακτηριστικά που αναφέρονται στον Πίνακα 1-4 και που απεικονίζουν τα χαρακτηριστικά το ιδανικού μικροοργανισμού που μπορεί να χρησιμοποιηθεί για αυτή τη διεργασία (Χριστακόπουλος και Τόπακας, 2013).

Πίνακας 1-4. Επιθυμητά χαρακτηριστικά ενός μικροοργανισμού που θα χρησιμοποιηθεί για την αποτελεσματική βιομετατροπή των λιγνινοκυτταρινούχων υλικών σε αιθανόλη (Χριστακόπουλος και Τόπακας, 2013)

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

2. ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ

2. ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ

2.1. Υλικά

2.1.1. Γεωργικό υπόλειμμα στελεχών αραβοσίτου

Το γεωργικό υπόλειμμα των στελεχών αραβοσίτου (Corn Stover, CS) ($93,9 \pm 0.1\%$ ξηρή ύλη) το παρείχε το τμήμα Γεωργικής Παραγωγής και Αγροτικού Περιβάλλοντος του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας. Ο θερισμός του πραγματοποιήθηκε το Σεπτέμβριο του 2013, από το πειραματικό πεδίο του πανεπιστημίου, που βρίσκεται στο Βελεστίνο, Μαγνησίας (Ελλάδα) και καλύπτει μια περιοχή 15 εκταρίων καλλιεργήσιμης γης. Το αποξηραμένο στον αγρό CS, τεμαχίστηκε και στη συνέχεια αλέσθηκε χρησιμοποιώντας έναν εργαστηριακό μύλο, ώστε να περάσει από κόσκινο με πόρους 0,75 mm ενώ τέλος, αποθηκεύτηκε σε θερμοκρασία δωματίου μέσα σε ερμητικά κλειστά πλαστικά βαρέλια.

Επιπλέον, στερεό υπόλειμμα αραβοσίτου, που έχει υποβληθεί σε απολιγνίνωση (A) και σε συνδυασμό απολιγνίνωσης και υδροθερμικής προκατεργασίας (B), προήλθε από το Ινστιτούτο Χημικών Διεργασιών & Ενεργειακών Πόρων (ΙΔΕΠ) στη Θέρμη Θεσσαλονίκης.

2.1.2. Πριονίδι οξιάς

Το προκατεργασμένο υπόλειμμα κοπής ξυλόδους φυτικής βιομάζας από οξιά (beechwood sawdust) με την εμπορική ονομασία Lignocel το παρείχε το Ινστιτούτο Χημικών Διεργασιών & Ενεργειακών Πόρων (ΙΔΕΠ) στη Θέρμη Θεσσαλονίκης. Το λιγνινοκυτταρινούχο υπόστρωμα υπέστη προκατεργασία υγρής οξείδωσης (wet oxidation) σε διαφορετικές συνθήκες προκειμένου να προσδιοριστεί ο βέλτιστος συνδυασμός συνθηκών για την αποδοτικότερη χρήση του υλικού σε διεργασίες παραγωγής βιοκαυσίμων.

2.1.3. Ένζυμα και Μικροοργανισμοί

Τα εμπορικά ενζυμικά διαλύματα Celluclast[®] 1.5L (κυτταρινάση), Novozyme[®] 188 (β-γλυκοζιδάση) και Cellic[®] CTec2 προήλθαν από την εταιρεία Novozymes (Δανία). Το ένζυμο Cmax3[™], προέρχεται από την εταιρεία Dyadic (Florida, Η.Π.Α.), ενώ το ένζυμο Accellerase[®] 1500 από την εταιρεία DuPont (Delaware, Η.Π.Α.).

Η ξηρή μαγιά Ethanol Red[®] προήλθε από την εταιρεία Fermentis σε σακουλάκια συσκευασμένα υπό κενό και χρησιμοποιήθηκε για τα πειράματα της ζύμωσης (Lesaffre, Γαλλία).

Όλα τα υπόλοιπα χημικά αντιδραστήρια που χρησιμοποιήθηκαν στην παρούσα διπλωματική εργασία προμηθεύτηκαν από τις εταιρείες Sigma – Aldrich (Η.Π.Α.), Panreac (Ισπανία), Applichem (Γερμανία), LAB-SCAN (Ιρλανδία) και Fisher Scientific (Η.Π.Α.), και η καθαρότητά τους ήταν αναλυτικού βαθμού.

2.1.4. Συσκευές και Όργανα

Παρουσιάζονται οι συσκευές και τα όργανα που χρησιμοποιήθηκαν στην παρούσα διπλωματική εργασία.

- Επωαστήρας Orbital incubator S150, Stuart Scientific (Μ. Βρετανία)
- Θερμαινόμενος επωαστήρας με ανάδευση Eppendorf Thermomixer Comfort, Eppendorf (Γερμανία)
- Θερμοστατούμενα υδατόλουτρα
- Συσκευή ανάδευσης Orbit LS, Labnet (Μ. Βρετανία)
- Συσκευή διήθησης υπό κενό
- Συσκευή μέτρησης pH WTW 537, WTW (Γερμανία)
- Συσκευή υγρής χρωματογραφίας υψηλής απόδοσης (HPLC-Shimadzu LC-20AD), με ανιχνευτή δείκτη διάθλασης (RI-Shimadzu RID 10A).
- Φυγόκεντρος Beckman Coulter (Η.Π.Α.) και μικροφυγόκεντρος πάγκου Eppendorf 3200 (Γερμανία)
- Φωτόμετρο UV – VIS Cam Spec M302, Labequip (Καναδάς)

- Σύστημα παραγωγής υπερκαθαρού νερού Direct-Q, Millipore (Η.Π.Α.)
- Ξηραντήρες
- Ηλεκτρονικοί ζυγοί ακριβείας
- Microplate (Molecular devices)
- Φούρνος μικροκυμάτων Microwave digestion equipment, speed-wave™ MWS-2, Berghof Instruments GmbH (Γερμανία)
- Αυτόκαυστο Labo Autoclave, SANYO (Η.Π.Α.)
- Ιξωδόμετρο Paar Physica MCR (Anton Paar GmbH, Austria)
- Αναμεικτήρας ρευστοποίησης ελεύθερης πτώσης (Freefall Mixer, Εργαστήριο Βιοτεχνολογίας, Ε.Μ.Π.)

Τα πλαστικά και γυάλινα εργαστηριακά είδη που χρησιμοποιήθηκαν ήταν των εταιρειών Greiner-Bio One (Γερμανία), Eppendorf (Γερμανία), Whatman (Ηνωμένο Βασίλειο), Millipore (Η.Π.Α.), Sterilin Limited (Ηνωμένο Βασίλειο), SIMAX (Τσεχία), SCHOTT AG (Γερμανία), BOMEX (Κίνα) και ISO LAB (Γερμανία).

2.2. Μέθοδοι

2.2.1. Αναλυτικές τεχνικές

i. Προσδιορισμός σύστασης βιομάζας (NREL)

Η κυτταρίνη, η ημικυτταρίνη και η λιγνίνη καθώς και η περιεχόμενη τέφρα στο CS, υπολογίστηκε με βάση τη διαδικασία NREL (Sluiter, 2005). Σύμφωνα με αυτή, πραγματοποιείται όξινη υρδόλυση 300 mg ξηρού υλικού με προσθήκη 3 ml διαλύματος 72% w/w θειϊκού οξέος για 60 λεπτά στους 30°C σε υδατόλουτρο, με στόχο τη διαλυτοποίηση της κυτταρίνης, της ημικυτταρίνης και της λιγνίνης. Στη συνέχεια, πραγματοποιείται αραίωση με προσθήκη 84 ml απιονισμένου νερού και επώαση σε κλίβανο αποστείρωσης στους 121 °C για 60 λεπτά. Έπειτα, πραγματοποιείται διήθηση υπό κενό σε προζυγισμένο ξηρό υάλινο ηθμό. Σε 500 ml του διηθήματος προστίθενται 4,5 ml θειϊκό οξύ 4% w/w, έτσι ώστε να πραγματοποιηθεί αραίωση 1 προς 10 σε τελικό όγκο 5 ml και το δείγμα

φωτομετράται στα 205 nm με τυφλό δείγμα θειϊκό οξύ 4% w/w για τη μέτρηση της διαλυτής λιγνίνης. Το υπόλοιπο μέρος του διηθήματος, εξουδετερώνεται με CaCO_3 και αφήνεται σε ηρεμία για να διαχωριστούν οι 2 φάσεις του. Από το υπερκείμενο υγρό παίρνω δείγμα στο οποίο προσδιορίζω τα ολικά αναγωγικά σάκχαρα. Το στερεό που έχει απομείνει στον ηθμό εκπλένεται με περίπου 50 ml απιονισμένου νερού και τοποθετείται για ξήρανση στους 105 °C. Όταν το βάρος του σταθεροποιηθεί, ζυγίζεται ο ηθμός και αφαιρώντας το βάρος του προζυγισμένου ηθμού υπολογίζεται η τέφρα. Κάθε δοκιμή πραγματοποιήθηκε εις διπλούν.

ii. Μέτρηση ολικών αναγωγικών σακχάρων

Η συγκέντρωση των αναγωγικών σακχάρων προσδιορίστηκε σύμφωνα με τη μέθοδο 3,5-δινιτροσαλικυλικού οξέος (DNS) (Miller,1959). Σύμφωνα με τη συγκεκριμένη μέθοδο, σε 250 μl δείγματος προστίθενται 250 μl DNS, σε δοκιμαστικό σωλήνα, ενώ παρασκευάζεται και ένα τυφλό δείγμα. Στη συνέχεια, τα δείγματα βράζονται για 5 λεπτά. Μετά το βράσιμο, προστίθενται 2 ml απιονισμένο νερό σε κάθε δείγμα και ακολουθεί φωτομέτρηση στα 540 nm. Τα ολικά αναγωγικά σάκχαρα (Total Reducing Sugar, TRS) εκφράζονται μέσω καμπύλης αναφοράς σε ισοδύναμα γλυκόζης. Κάθε δοκιμή πραγματοποιήθηκε εις διπλούν.

Εικόνα 2-1. Φασματόμετρο για τη μέτρηση αναγωγικών σακχάρων



iii. Μέτρηση γλυκόζης

Ο υπολογισμός της περιεκτικότητας σε γλυκόζη πραγματοποιήθηκε σύμφωνα με το εμπορικό ενζυμικό διάλυμα GOD/PAP (glucose oxidase / peroxidase assay). Σύμφωνα με τη μέθοδο, σε 240 μl ,από το εμπορικό kit της Biosis, ενζυμικού διαλύματος GOD/PAP, προστίθενται 10 μl δείγματος. Αυτά τοποθετούνται σε μία πλακέτα 96-well ELISA Microplate, η οποία επώαζεται στο μηχάνημα Microplate για 15 λεπτά. Με τη βοήθεια του προγράμματος SOFTmax PRO, η θερμοκρασία επώασης ορίζεται στους 37 °C, η απορρόφηση μετράται στα 510 nm και τα αποτελέσματα λαμβάνονται στο End Point, δηλαδή όταν έχουν σταθεροποιηθεί. Κάθε δοκιμή πραγματοποιήθηκε εις διπλούν.

iv. Μέτρηση αιθανόλης

Η αιθανόλη που παράγεται κατά τη ζύμωση του υγροποιημένου CS αναλύθηκε με μια συσκευή HPLC, που αποτελείται από ένα πλήρως ολοκληρωμένο σύστημα παροχής διαλύτη (Shimadzu LC-20AD), σε συνδυασμό με έναν ανιχνευτή δείκτη διάθλασης (Shimadzu RID 10A), έναν αυτόματο δειγματολήπτη (Shimadzu SIL-20A) και ένα σύστημα εισαγωγής υπολογιστή (LCsolution Έκδοση 1.24 SP1, Shimadzu). Χρησιμοποιήθηκε μια στήλη χρωματογραφίας Aminex HPX-87H (Bio-Rad, 300x7.8 mm, μέγεθος σωματιδίων 9 μm). Η κινητή φάση ήταν 5 mM θειικό οξύ σε απαερωμένο νερό καθαρότητας HPLC με μια σταθερή ταχύτητα ροής 0.6 mL / min και η θερμοκρασία της στήλης διατηρήθηκε στους 40 °C χρησιμοποιώντας ένα θερμαντήρα στήλης (Millipore Waters TCM). Ο όγκος του δείγματος ήταν 50 μl και ο χρόνος της ανάλυσης ήταν 30 λεπτά. Κάθε δοκιμή πραγματοποιήθηκε εις διπλούν.

2.2.2. Υδροθερμική προκατεργασία

Για την προκατεργασία του CS χρησιμοποιήθηκε φούρνος μικροκυμάτων (Microwave digestion equipment, speedwave™ MWS-2, Berghof Instruments GmBH, Γερμανία). Η συσκευή ήταν εφοδιασμένη με ανιχνευτή υπερύθρων για την εξ

αποστάσεως μέτρηση της θερμοκρασίας, χωρίς επαφή με το δείγμα το οποίο βρισκόταν σε ειδικά φιαλίδια ανθεκτικά σε υψηλή πίεση και θερμοκρασία. Η ισχύς του φούρνου μικροκυμάτων ρυθμίστηκε στα 700 W. Η διαδικασία της προκατεργασίας πραγματοποιήθηκε σε συγκέντρωση στερεών ίση με 10% w/v σε αραιό διάλυμα οξικού οξέος (0,3% v/v). Οι χρόνοι θέρμανσης και ψύξης του φούρνου δε θεωρούνται μέρος του χρόνου προκατεργασίας, αφού απαιτούνται περίπου 5 λεπτά για να φτάσει την τελική θερμοκρασία. Με σκοπό να ενυδατωθούν κατάλληλα οι ίνες του CS, το CS τοποθετείται σε κωνική φιάλη μαζί με το διάλυμα οξικού οξέος 0,3% v/v και η φιάλη αφήνεται σε υδατόλουτρο, στους 80 °C για μια ώρα, πριν την υδροθερμική προκατεργασία. Στη συνέχεια, το περιεχόμενο της φιάλης αδειάζεται σε κατάλληλα φιαλίδια, τα οποία τοποθετούνται στο φούρνο μικροκυμάτων για να ξεκινήσει η προκατεργασία. Σύμφωνα με μελέτη που έχει προηγηθεί, βρέθηκε ότι οι βέλτιστες συνθήκες της συγκεκριμένης προκατεργασίας είναι στους 230 °C για 15 λεπτά. Έτσι, μετά από τα 15 λεπτά της προκατεργασίας, το περιεχόμενο των φιαλιδίων διαχωρίζεται σε υγρό και στερεό κλάσμα με φιλτράρισμα υπό κενό και έκπλυση με περίπου 200ml απιονισμένου νερού για την απομάκρυνση παρεμποδιστών (φουρφουράλη, μυρμηκικό οξύ κ.λπ.) και οξικού οξέος. Το στερεό κλάσμα που παραλαμβάνεται ξηραίνεται στους 60 °C έως την επόμενη ημέρα και αποτελεί το τελικό προκατεργασμένο CS. Στο υλικό αυτό, γίνονται πειράματα προσδιορισμού της σύστασης ,με τη μέθοδο NREL (§ 2.2.1) καθώς και πειράματα υδρόλυσης.

Εικόνα 2-2. Φούρνος μικροκυμάτων (Microwave digestion equipment, speedwave™ MWS-2, Berghof Instruments GmbH, Γερμανία)



2.2.3. Ενζυμική υδρόλυση

Η ενζυμική υδρόλυση του προκατεργασμένου υλικού πραγματοποιήθηκε σε τρεις κλίμακες, σύμφωνα με τη συγκέντρωση των στερεών.

- a) Στην πρώτη περίπτωση, η συγκέντρωση του στερεού στο διάλυμα ήταν 3% w/v. Στη συγκεκριμένη περίπτωση μελετήθηκε η ικανότητα υδρόλυσης λιγνινοκυτταρινούχας βιομάζας από διαφορετικά εμπορικά ενζυμικά σκευάσματα.

Χρησιμοποιήθηκαν τα εξής :

- Μίγμα Celluclast[®] 1.5L και Novozym[®] 188 σε αναλογία 5:1 v/v
- Εμπορικό ένζυμο Cellic[®] CTec2
- Εμπορικό ένζυμο Cmax3[™]
- Εμπορικό ένζυμο Accellerase[®]1500

Μελετήθηκε επίσης, η επίδραση της ενζυμικής συγκέντρωσης στη διαδικασία της υδρόλυσης και για το λόγο αυτό πραγματοποιήθηκαν πειραματικές δοκιμές με ενζυμικές συγκεντρώσεις 3 ,6 , 9 και 12 mg ενζύμου/g Ξ.Β, για κάθε διαφορετικό ένζυμο. Η ενζυμική υδρόλυση πραγματοποιήθηκε λοιπόν σε φιαλίδια των 2 ml σε Thermomixer (Eppendorf, Germany). Σε κάθε περίπτωση ο όγκος της αντίδρασης ήταν 1,5 ml, ενώ η συγκέντρωση στερεών ήταν 3% w/v. Το ανάλογο ενζυμικό σκεύασμα αραιωνόταν κατάλληλα με ρυθμιστικό διάλυμα κιτρικών/φωσφορικών 100 mM με pH 5.0 ,ώστε να προκύπτει κάθε φορά η επιθυμητή συγκέντρωση ενζύμου. Σε κάθε μίγμα προστέθηκε αζίδιο του νατρίου (τελικής συγκέντρωσης 0.02% w/v) με σκοπό την αποτροπή μικροβιακής μόλυνσης. Η ενζυμική υδρόλυση πραγματοποιήθηκε για 72 ώρες, στους 50 °C και σε 900 rpm. Σε τακτά χρονικά διαστήματα λαμβάνονταν δείγματα προκειμένου να μετρηθούν τα ολικά αναγωγικά σάκχαρα και η γλυκόζη μέσω ενζυμικού σκευάματος, με σκοπό την εκτίμηση της κυτταρίνης και της υδρόλυσης των πολυσακχαριτών.

Εικόνα 2-3. Thermomixer (Eppendorf) για τη διεξαγωγή της ενζυμικής υδρόλυσης



- b) Στη δεύτερη περίπτωση, η συγκέντρωση του στερεού μπορεί να ξεπεράσει το 10% w/v. Η διαδικασία είναι παρόμοια με την προηγούμενη, με τις εξής διαφορές. Η ενζυμική υδρόλυση πραγματοποιείται σε κωνικές φιάλες των 100 ml και λαμβάνει χώρα σε επωαστήρα στους 50 °C και 180 rpm, για 72 ώρες. Τέλος, ο όγκος της αντίδρασης ήταν πάνω από 10 ml (ανάλογα με τη συγκέντρωση των στερεών).
- c) Στην τρίτη περίπτωση, η συγκέντρωση του στερεού φτάνει το 24% w/v. Αφού πραγματοποιήθηκε βελτιστοποίηση των συνθηκών προκατεργασίας, οι βέλτιστες συνθήκες προκατεργασίας χρησιμοποιήθηκαν για την παρασκευή ποσότητας προκατεργασμένου CS που υφίσταται υδρόλυση σε υψηλή συγκέντρωση στερεών και ακόλουθη ζύμωση για παραγωγή αιθανόλης. Για την ρευστοποίηση και σακχαροποίηση του υδροθερμικά προκατεργασμένου CS, σε υψηλή συγκέντρωση στερεών 24% w/v, χρησιμοποιήθηκε ένας θάλαμος σακχαροποίησης, αναμεικτήρας ελεύθερης πτώσης (free-fall mixer), με σκοπό να επιτευχθεί υψηλή συγκέντρωση γλυκόζης. Το μίξερ αυτό, αποτελείται από 2 κάθετα τοποθετημένους θαλάμους υδρόλυσης, πλάτους 25 cm και διαμέτρου 60 cm, με την ικανότητα να περιστρέφονται, για την κατάλληλη ανάμιξη των συστατικών. Η ταχύτητα περιστροφής ρυθμίστηκε στα 7 rpm και η φορά της άλλαξε από ωρολογιακή σε αντι-ωρολογιακή κάθε 2 λεπτά. Οι θάλαμοι υδρόλυσης διατηρούνταν σε σταθερή θερμοκρασία 50±1.0 °C από ένα θερμαντικό περίβλημα που περιείχε λάδι. Το ένζυμο που χρησιμοποιήθηκε ήταν το Cellic[®] CTec2,

αραιωμένο σε ρυθμιστικό διάλυμα κιτρικών/φωσφορικών 100 mM με pH 5.0, ώστε να προκύψει ενζυμική συγκέντρωση 9 mg ενζύμου /g Ξ.Β. Η διάρκεια του συγκεκριμένου βήματος υδρόλυσης διήρκησε είτε 12 είτε 24 ώρες.

Εικόνα 2-4. Θάλαμος σακχαροποίησης free-fall mixer



2.2.4. Ζύμωση

Τα πειράματα των ζυμώσεων που πραγματοποιήθηκαν με συγκέντρωση στερεών 10% και 17% w/v, διεξήχθησαν σε κωνικές φιάλες Erlenmeyer των 50 ml με τοποθέτηση 2,5 g υλικού σε pH 5.0. Οι φιάλες στη συνέχεια τοποθετήθηκαν σε επωαστήρα στους 35 °C και ανάδευση 80 ± 2 rpm στον τροχιακό αναδευτήρα. Αντίστοιχα, τα πειράματα ζυμώσεων που πραγματοποιήθηκαν με συγκέντρωση στερεών 24% w/v διεξήχθησαν σε κωνικές φιάλες Erlenmeyer των 100 ml, όπου τοποθετήθηκαν 25 ± 0.5 g ρευστοποιημένου και σακχαροποιημένου υλικού σε pH 5.0 και η θερμοκρασία επώασης ορίστηκε στους 35 °C, με ανάδευση 80 ± 2 rpm στον τροχιακό αναδευτήρα του επωαστήρα. Για όλες τις ζυμώσεις χρησιμοποιήθηκε το στέλεχος Ethanol Red® (Lesaffre, France), του *Saccharomyces cerevisiae*, χωρίς την προσθήκη επιπλέον συστατικών στο ζυμό της ζύμωσης. Η ζύμη που προστέθηκε

ήταν ίση με 15 mg ζύμης / g αρχικής ξηρής μάζας. Ανά τακτά χρονικά διαστήματα, λαμβάνονταν δείγματα, που αναλύονταν για αιθανόλη. Κάθε δοκιμή πραγματοποιήθηκε εις διπλούν.

Εικόνα 2-5. Επωαστήρας, όπου πραγματοποιήθηκε η ζύμωση



3. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

3. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

3.1. Μελέτη υδροθερμικής προκατεργασίας σε Corn Stover

3.1.1. Σύσταση υποστρωμάτων λιγνινοκυτταρινούχας βιομάζας

Το υπόλειμμα στελεχών αραβόσιτου (CS) για αυτή τη μελέτη λήφθηκε από τη Θεσσαλία (Ελλάδα) το Σεπτέμβριο του 2013 και αναλύθηκε ως προς τη σύστασή του. Διαπιστώθηκε ότι περιέχει $38,8 \pm 0,86$ % κυτταρίνη, $23,5 \pm 1,12$ % ημικυτταρίνη, $20,2 \pm 0,72$ % λιγνίνη και $5,3 \pm 0,19$ % τέφρα σε ξηρή βάση (dry basis). Τα αποτελέσματα συμφωνούν με προηγούμενες αναφορές σύστασης για τα υπολείμματα αραβόσιτου (Öhgren *et al.*, 2007, Ancic *et al.*, 2013, Zu *et al.*, 2014).

Μετά τη διαδικασία της υδροθερμικής προκατεργασίας στις βέλτιστες συνθήκες, το υλικό μελετήθηκε ξανά ως προς τη σύσταση και προέκυψε ότι περιέχει $61,3 \pm 1,51$ % κυτταρίνη, $8,9 \pm 0,42$ % ημικυτταρίνη και $19,4 \pm 0,89$ % λιγνίνη. Είναι φανερό πως μετά την επεξεργασία του, η περιεκτικότητα του υλικού σε κυτταρίνη έχει αυξηθεί με ταυτόχρονη μείωση της ημικυτταρίνης, με αποτέλεσμα η ενζυμική υδρόλυση και η επακόλουθη ζύμωση που θα υποστεί να είναι πιο αποτελεσματικές. Το ποσοστό της λιγνίνης παραμένει σταθερό.

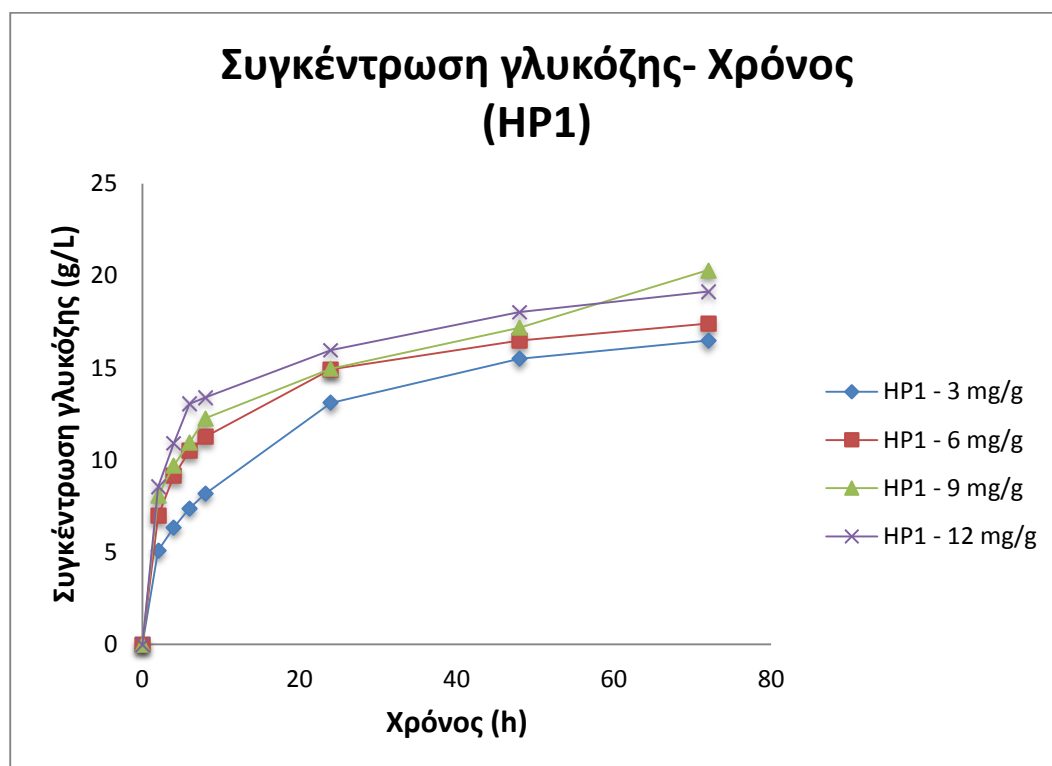
3.1.2. Επίδραση ενζυμικού φορτίου στην υδρόλυση CS

Στην παρούσα εργασία, μελετάται η επίδραση διαφόρων εμπορικών ενζυμικών διαλυμάτων στην ενζυμική υδρόλυση υδροθερμικά προκατεργασμένου CS. Για το λόγο αυτό, γίνεται χρήση τεσσάρων εμπορικών σκευασμάτων σε διάφορες ενζυμικές συγκεντρώσεις. Έτσι, χρησιμοποιείται το ενζυμικό διάλυμα Celluclast[®] 1.5L (κυτταρινάση)-Novozyme[®] 188 (β-γλυκοζιδάση) (κωδικοποίηση HP1) καθώς και τα ένζυμα Cellic[®] CTec2 (κωδικοποίηση HP2), Cmax3[™] (κωδικοποίηση HP3), Accellerase[®] 1500 (κωδικοποίηση HP4). Καθένα από τα παραπάνω ένζυμα μελετήθηκε για ενζυμικό φορτίο 3, 6, 9 και 12 mg/g Ξ.Β. Πραγματοποιήθηκαν λοιπόν ενζυμικές υδρολύσεις του υδροθερμικά προκατεργασμένου CS, σε συγκέντρωση στερεών 3% w/v, με τις προαναφερθείσες συνθήκες, για 72 ώρες. Ανά τακτά χρονικά διαστήματα λαμβάνονταν δείγματα, τα οποία αναλύονταν για τον υπολογισμό της

γλυκόζης. Τα αποτελέσματα παρουσιάζονται παρακάτω, για κάθε ένζυμο ξεχωριστά.

- Ενζυμικό διάλυμα Celluclast® 1.5L -Novozyme® 188

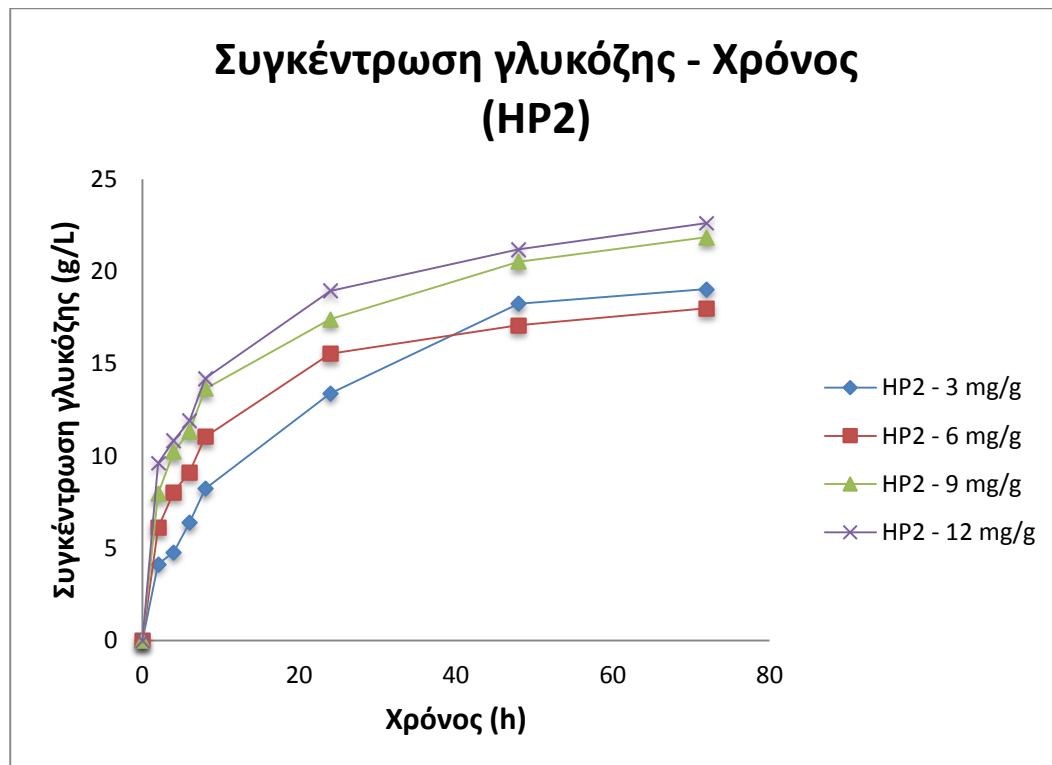
Διάγραμμα 3-1. Μεταβολή της συγκέντρωσης της γλυκόζης με το χρόνο για το ενζυμικό διάλυμα HP1 με συγκεντρώσεις 3, 6, 9 και 12 mg/g



Σύμφωνα με το διάγραμμα 3-1, είναι εμφανές πως μετά το τέλος των υδρολύσεων οι ενζυμικές συγκεντρώσεις των 3 και 6 mg/g Ξ.Β εμφανίζουν χαμηλότερες συγκεντρώσεις γλυκόζης (16,5 και 17,4 g/L αντίστοιχα). Το ενζυμικό φορτίο των 9 mg/g Ξ.Β εμφανίζει την υψηλότερη συγκέντρωση γλυκόζης (20,3 g/L), ενώ το φορτίο των 12 mg/g Ξ.Β φαίνεται να παρεμποδίζεται από τα προϊόντα της υδρόλυσης, καθώς οι συγκεντρώσεις της γλυκόζης στην περίπτωση αυτή αναμένονταν υψηλότερες (19,1 g/L). Για το ενζυμικό διάλυμα Celluclast® 1.5L -Novozyme® 188, λοιπόν βρέθηκε πως η βέλτιστη ενζυμική συγκέντρωση για εφαρμογή ενζυμικής υδρόλυσης σε υδροθερμικά προκατεργασμένο CS είναι τα 9 mg/g Ξ.Β.

- Εμπορικό ένζυμο Cellic® CTec2

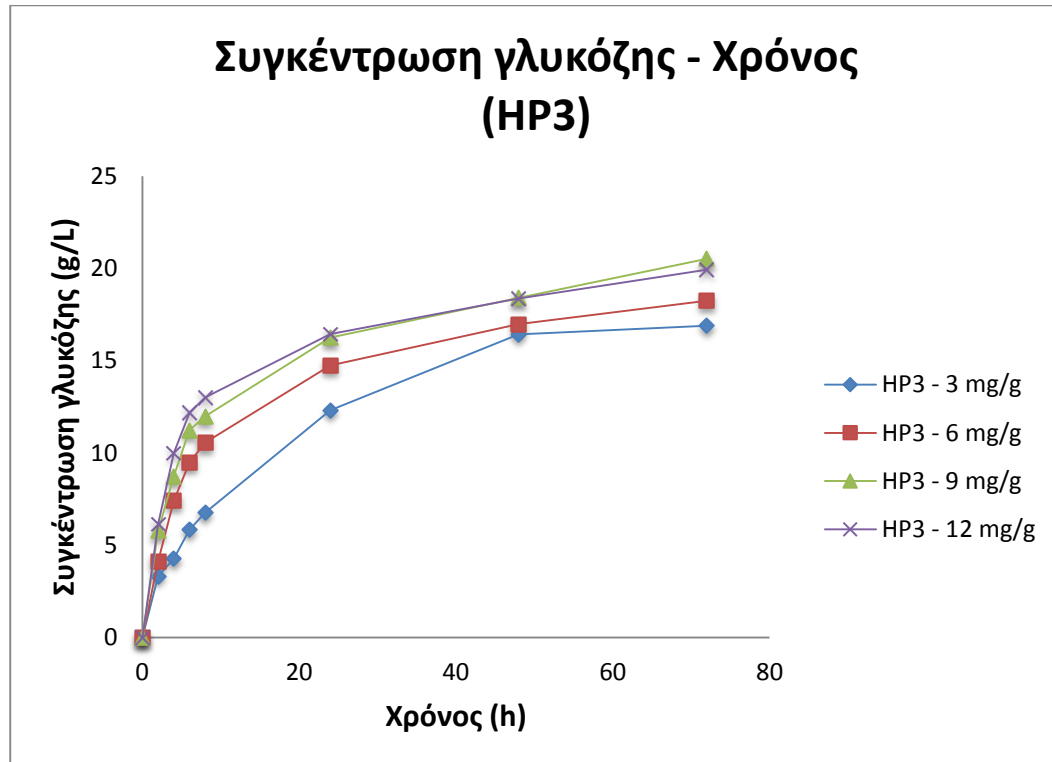
Διάγραμμα 3-2. Μεταβολή της συγκέντρωσης της γλυκόζης με το χρόνο για το ένζυμο HP2 με συγκεντρώσεις 3, 6, 9 και 12 mg/g



Παρατηρώντας το διάγραμμα 3-2, φαίνεται πως τα ενζυμικά φορτία των 3 και 6 mg/g Ξ.Β οδηγούν σε χαμηλότερες συγκεντρώσεις γλυκόζης (19 και 18 g/L αντίστοιχα), όπως ήταν αναμενόμενο. Οι ενζυμικές συγκεντρώσεις των 9 και 12 mg/g Ξ.Β παρουσιάζουν αρκετά κοντινά και ταυτόχρονα ικανοποιητικά αποτελέσματα. Στην πρώτη περίπτωση, μετά τις 72 ώρες υδρόλυσης, προκύπτει συγκέντρωση γλυκόζης 21,9 g/L , ενώ στη δεύτερη 22,6 g/L αντίστοιχα. Η ελάχιστη αυτή απόκλιση, της τάξεως του 3% , δε μπορεί να δικαιολογήσει το επιπλέον κόστος σε μια βιομηχανία και για το λόγο αυτό προτιμάται η χρήση του ενζύμου HP2 στην ενζυμική συγκέντρωση των 9 mg/g Ξ.Β.

- Εμπορικό ένζυμο Cmax3™

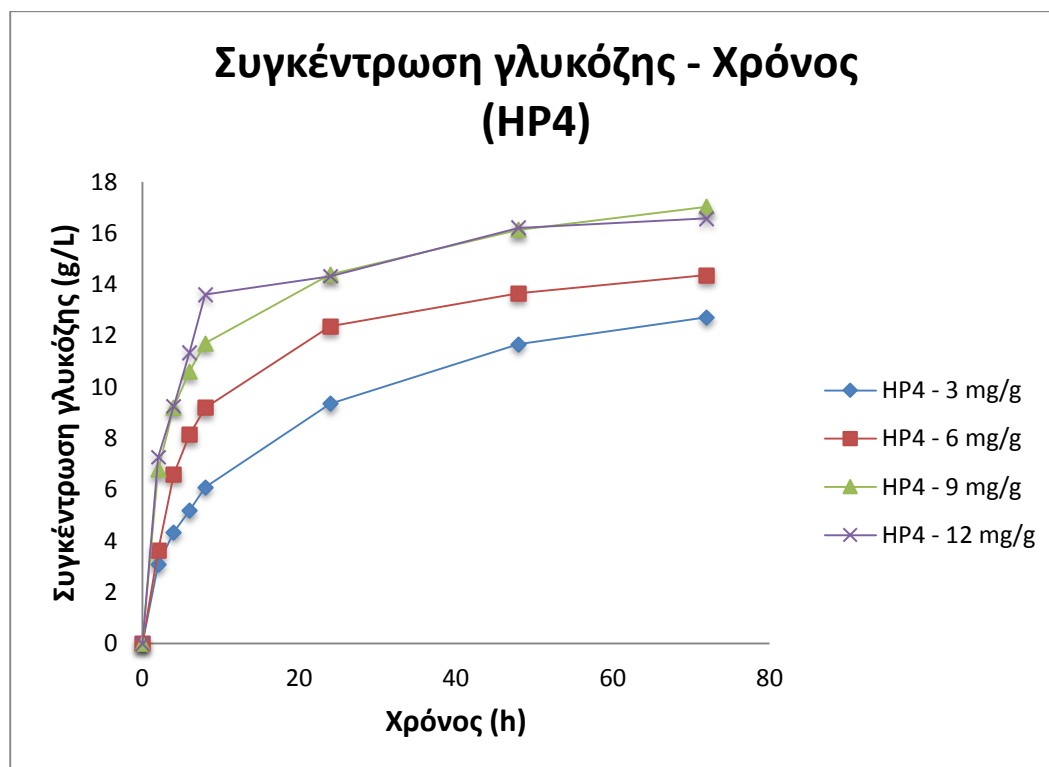
Διάγραμμα 3-3. Μεταβολή της συγκέντρωσης της γλυκόζης με το χρόνο για το ένζυμο HP3 με συγκεντρώσεις 3, 6, 9 και 12 mg/g



Σύμφωνα με το διάγραμμα 3-3, οι ενζυμικές συγκεντρώσεις 3 και 6 mg/g Ξ.Β του ενζύμου HP3, δεν αποδίδουν επαρκώς, έχοντας συγκεντρώσεις γλυκόζης 16,9 και 18,3 g/L, αντίστοιχα. Τα ενζυμικά φορτία των 9 και 12 mg/g Ξ.Β παρουσιάζουν παραπλήσιες συγκεντρώσεις. Το φορτίο όμως των 9 mg/g Ξ.Β οδηγεί σε υψηλότερη συγκέντρωση γλυκόζης (20,5 έναντι 19,9 g/L), γεγονός που το καθιστά καταλληλότερο για χρήση στη συγκεκριμένη περίπτωση ενζυμικής υδρόλυσης.

- Εμπορικό ένζυμο Accellerase®1500

Διάγραμμα 3-4. Μεταβολή της συγκέντρωσης της γλυκόζης με το χρόνο για το ένζυμο HP4 με συγκεντρώσεις 3, 6, 9 και 12 mg/g



Από το διάγραμμα 3-4, είναι φανερό πως τα ενζυμικά φορτία 3 και 6 mg/g Ξ.Β του ενζύμου HP4 οδηγούν σε χαμηλές συγκεντρώσεις γλυκόζης (12,7 και 14,4 g/L αντίστοιχα). Αντίθετα, η ενζυμική συγκέντρωση των 9 mg/g Ξ.Β καθώς και εκείνη των 12 mg/g Ξ.Β, παρουσιάζουν αισθητά υψηλότερες συγκεντρώσεις γλυκόζης (17 και 16,6 g/L αντίστοιχα), όπως ήταν αναμενόμενο. Πιο συγκεκριμένα, η συγκέντρωση των 9 mg/g Ξ.Β εμφανίζει την υψηλότερη συγκέντρωση σε γλυκόζη, πιθανότατα λόγω παρεμπόδισης του ενζύμου σε μεγαλύτερη συγκέντρωση και έτσι θεωρείται καταλληλότερη για την ενζυμική υδρόλυση που μελετάται με χρήση του ενζύμου HP4.

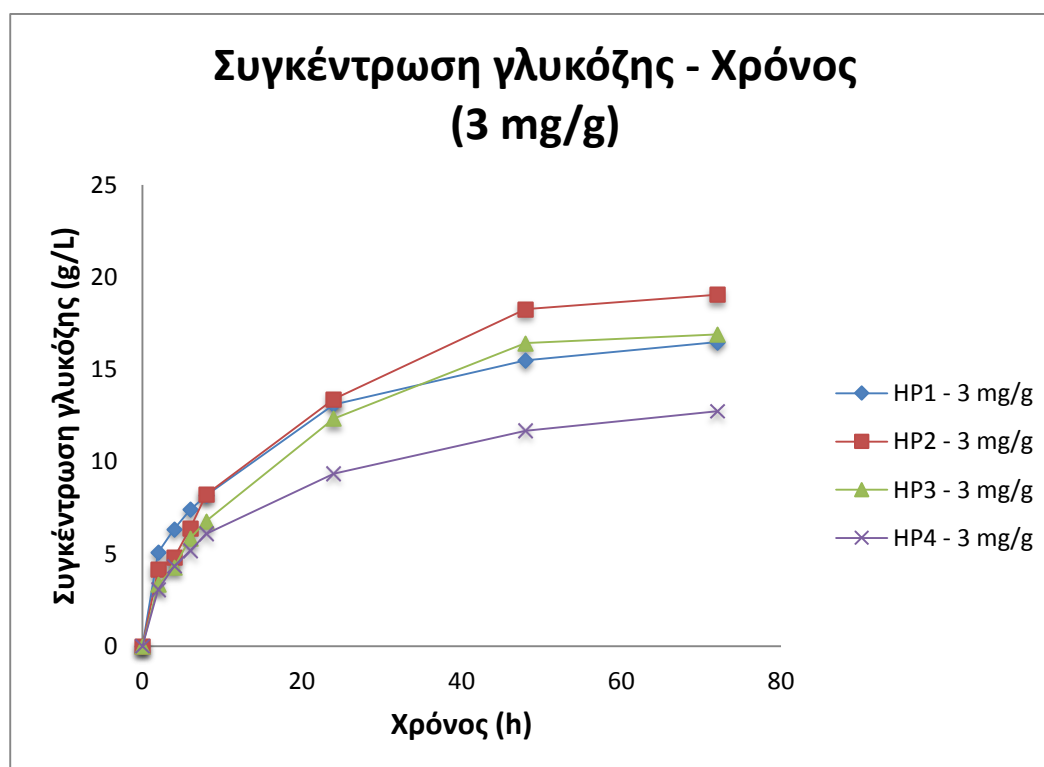
3.1.3. Σύγκριση εμπορικών κυτταρινολυτικών ενζύμων

Για τη σύγκριση της επίδρασης των διαφορετικών ενζύμων στην υδρόλυση του προκατεργασμένου CS, πραγματοποιήθηκαν ενζυμικές υδρολύσεις σε δείγματα

υδροθερμικά προκατεργασμένου CS για διάφορες συνθήκες. Η συγκέντρωση των στερεών για κάθε δείγμα ήταν 3% w/v. Επιπλέον, με στόχο να βρεθεί το ένζυμο που εμφανίζει τα καλύτερα αποτελέσματα υδρόλυσης τα πειράματα πραγματοποιήθηκαν χρησιμοποιώντας τέσσερα διαφορετικά ένζυμα για τη σακχαροποίηση και ρευστοποίηση του υλικού. Έτσι, έγινε χρήση του εμπορικού ενζυμικού διαλύματος Celluclast® 1.5L (κυτταρινάση)- Novozyme® 188 (β-γλυκοζιδάση) (κωδικοποίηση HP1), καθώς και των εμπορικών ενζύμων Cellic® CTec2 (κωδικοποίηση HP2), Cmax3™ (κωδικοποίηση HP3) και Accellerase®1500 (κωδικοποίηση HP4), για ενζυμικές συγκεντρώσεις 3, 6, 9 και 12 mg/g Ξ.Β και για 72 ώρες υδρόλυσης. Ανά τακτά χρονικά διαστήματα, λαμβάνονταν δείγματα, τα οποία αναλύονταν για τον προσδιορισμό της γλυκόζης. Τα αποτελέσματα συγκρίνονται με βάση τα διαφορετικά ένζυμα στις ίδιες ενζυμικές συγκεντρώσεις. Σύμφωνα λοιπόν, με τις μετρήσεις προκύπτουν τα παρακάτω διαγράμματα.

- Για ενζυμική συγκέντρωση 3 mg/g ξηρής μάζας :

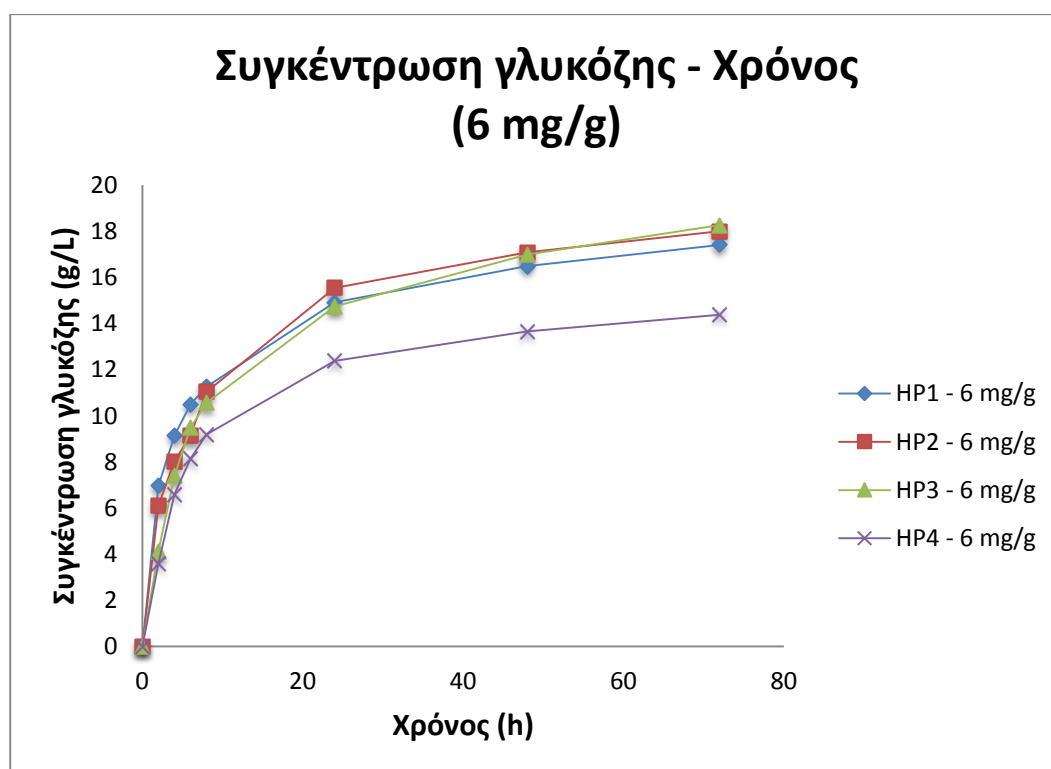
Διάγραμμα 3-5. Μεταβολή της συγκέντρωσης της γλυκόζης με το χρόνο για ενζυμικό φορτίο 3 mg/g, με χρήση των ενζύμων HP1, HP2, HP3 και HP4



Με βάση το παραπάνω διάγραμμα, είναι εμφανές, πως τα ένζυμα HP1, HP3 και HP4 υστερούν αναφορικά με την τελική συγκέντρωση γλυκόζης. Το ένζυμο HP2 εμφανίζει αρκετά καλά αποτελέσματα, ενώ παρατηρείται πως οι τιμές των συγκεντρώσεων στην περίπτωση του συγκεκριμένου ενζύμου σταθεροποιούνται περίπου στις 40 ώρες. Συνεπώς, το ένζυμο HP2, παρουσιάζει τα καλύτερα αποτελέσματα ενζυμικής υδρόλυσης στο CS για το ενζυμικό φορτίο των 3 mg/g Ξ.Β.

- Για ενζυμική συγκέντρωση 6 mg/g ξηρής μάζας :

Διάγραμμα 3-6. Μεταβολή της συγκέντρωσης της γλυκόζης με το χρόνο για ενζυμικό φορτίο 6 mg/g, με χρήση των ενζύμων HP1, HP2, HP3 και HP4

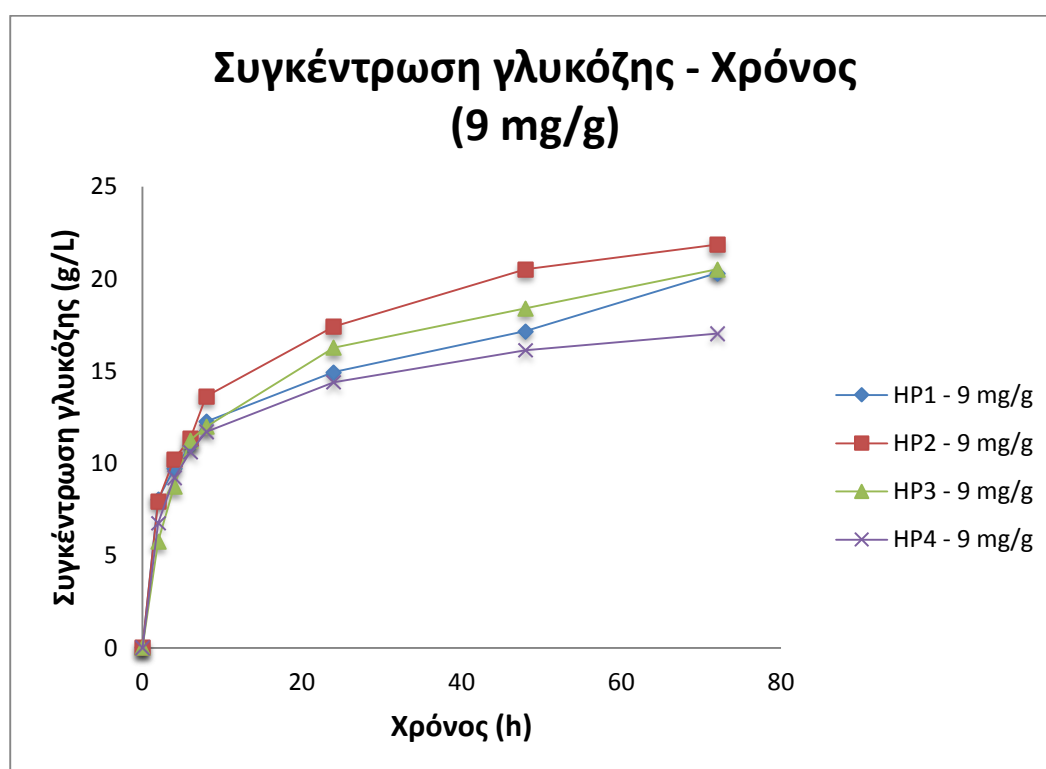


Όπως φαίνεται στο διάγραμμα 3-6, το ένζυμο HP4 δεν οδηγεί σε ικανοποιητικές τιμές συγκεντρώσεων γλυκόζης σε σχέση με τα υπόλοιπα ένζυμα. Τα ένζυμα HP1 και HP3

παρουσιάζουν παρόμοια συμπεριφορά αλλά με σχετικά χαμηλότερες τιμές συγκεντρώσεων σε σχέση με το HP2. Έτσι, για το ενζυμικό φορτίο των 6 mg/g Ξ.Β, το ένζυμο HP2 θεωρείται καταλληλότερο για τη διεργασία της υδρόλυσης στο CS.

- Για ενζυμική συγκέντρωση 9 mg/g ξηρής μάζας :

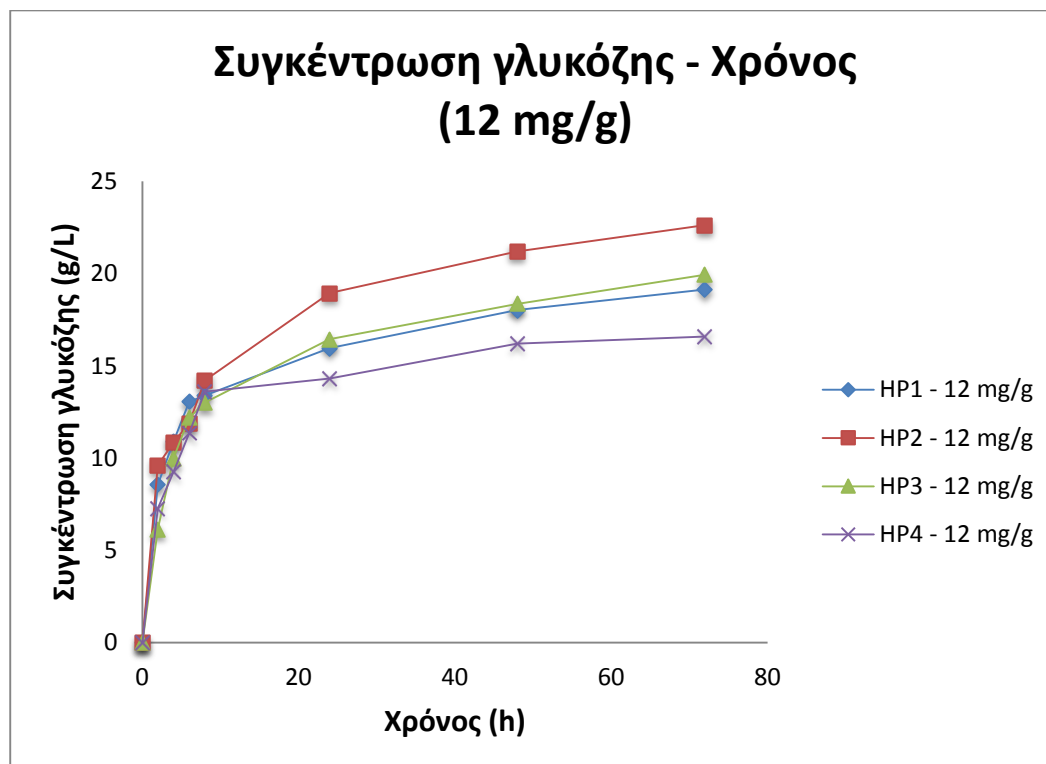
Διάγραμμα 3-7. Μεταβολή της συγκέντρωσης της γλυκόζης με το χρόνο για ενζυμικό φορτίο 9 mg/g, με χρήση των ενζύμων HP1, HP2, HP3 και HP4



Αντίστοιχα με τις προηγούμενες περιπτώσεις, σύμφωνα με το διάγραμμα 3-7, παρατηρείται πως το ένζυμο HP2 οδηγεί σε υψηλότερη συγκέντρωση γλυκόζης μετά το πέρας της υδρόλυσης συγκριτικά με τα υπόλοιπα ένζυμα. Για το λόγο αυτό, προτιμάται για την υδρόλυση CS με ενζυμικό φορτίο 9mg/g Ξ.Β.

- Για ενζυμική συγκέντρωση 12 mg/g ξηρής μάζας :

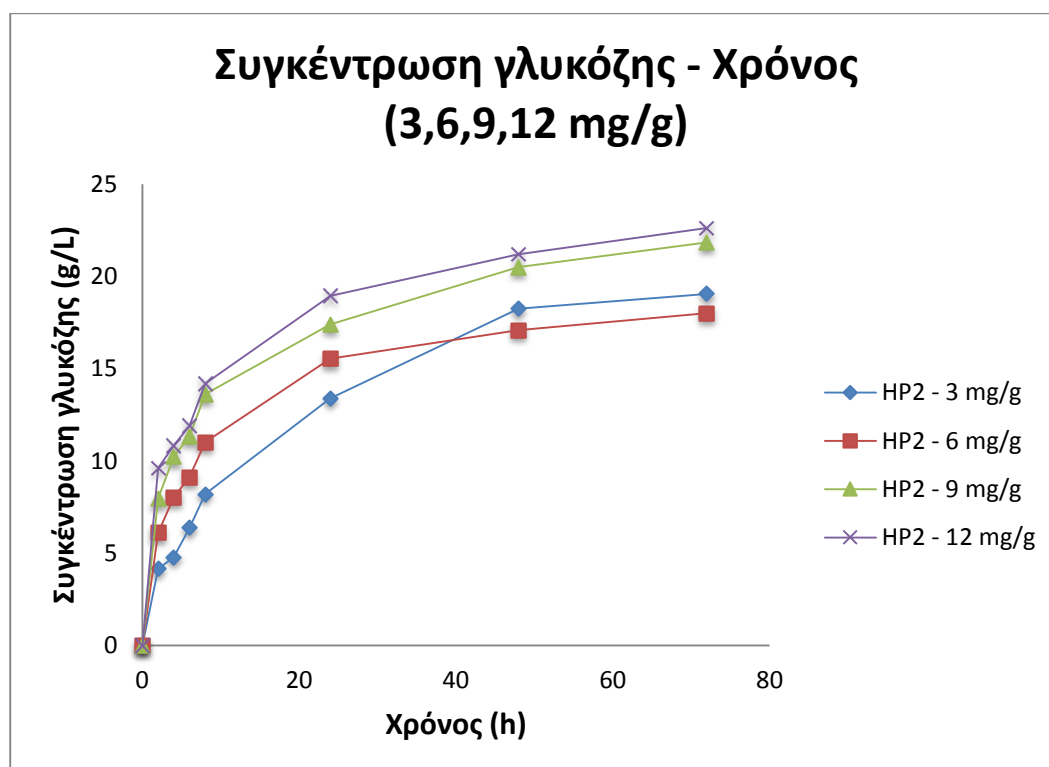
Διάγραμμα 3-8. Μεταβολή της συγκέντρωσης της γλυκόζης με το χρόνο για ενζυμικό φορτίο 12 mg/g, με χρήση των ενζύμων HP1, HP2, HP3 και HP4



Για το ενζυμικό φορτίο των 12 mg/g Ξ.Β, σύμφωνα με το παραπάνω διάγραμμα, καταλληλότερο για χρήση σε υδρόλυση CS είναι το ένζυμο HP2, καθώς εμφανίζει υψηλότερες συγκεντρώσεις γλυκόζης και σε μικρότερο μάλιστα χρόνο.

Όπως προκύπτει λοιπόν, από τα πειράματα και τη μελέτη των αποτελεσμάτων τους, το ένζυμο HP2 θεωρείται πιο κατάλληλο σε σχέση με τα υπόλοιπα τρία ένζυμα, για χρήση σε μια διεργασία ενζυμικής υδρόλυσης CS στα ενζυμικά φορτία των 3, 6, 9 και 12 mg/g Ξ.Β. Συνοπτικά λοιπόν, με στόχο την ανάδειξη τόσο του καταλληλότερου ενζύμου όσο και της βέλτιστης ενζυμικής συγκέντρωσης στην οποία θα πρέπει να χρησιμοποιηθεί για την υδρόλυση, γίνεται σύγκριση μεταξύ των αποτελεσμάτων που διακρίθηκαν για κάθε ενζυμική συγκέντρωση. Προκύπτουν επομένως, ο παρακάτω πίνακας.

Διάγραμμα 3-9. Μεταβολή της συγκέντρωσης της γλυκόζης με το χρόνο για τα ενζυμικά φορτία 3,6,9,12 mg/g, με χρήση του ενζύμου HP2

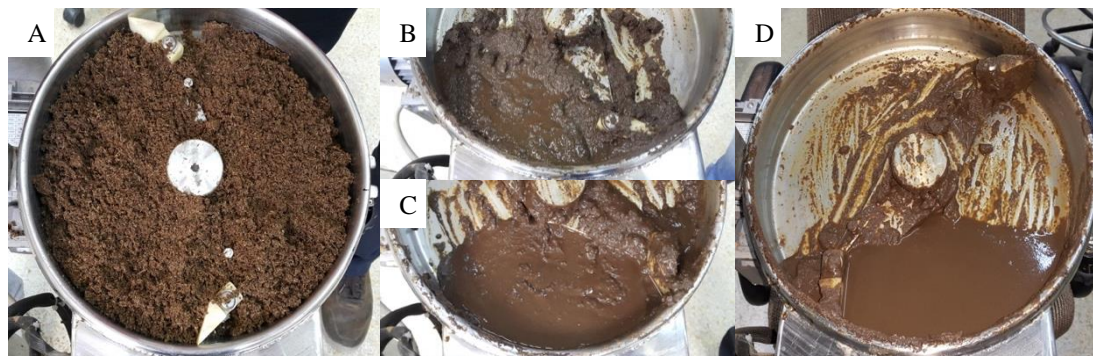


Σύμφωνα λοιπόν με το διάγραμμα 3-9, τα ενζυμικά φορτία 3 και 6 mg/g Ξ.Β, του ενζύμου εμφανίζουν χαμηλότερες τιμές γλυκόζης. Το ένζυμο HP2 με ενζυμικές συγκεντρώσεις 9 και 12 mg/g Ξ.Β, παρουσιάζει τις υψηλότερες συγκεντρώσεις σε γλυκόζη, μετά το πέρας της υδρόλυσης. Επιπλέον, στα ενζυμικά φορτία των 9 και 12 mg/g Ξ.Β παρατηρείται ότι η υδρόλυση μεγιστοποιείται και έπειτα παραμένει σταθερή σε αρκετά μικρό χρονικό διάστημα, περίπου 24 ωρών. Λόγω των ελάχιστων αποκλίσεων της τάξεως του 3% μεταξύ των δύο αυτών ενζυμικών συγκεντρώσεων, προτιμάται εν τέλει το ένζυμο HP2 με συγκέντρωση 9 mg/g Ξ.Β. Η χρήση του ενζύμου σε συγκέντρωση 12 mg/g Ξ.Β δε θα μπορούσε να δικαιολογηθεί σε μια βιομηχανία λόγω του υψηλότερου κόστους σε συνδυασμό με τη μικρή διαφορά στην απόδοση σε σχέση με το φορτίο των 9 mg/g Ξ.Β.

3.1.4. Ζύμωση ρευστοποιημένου CS σε υψηλή αρχική συγκέντρωση στερεών

Το CS υποβλήθηκε στη διαδικασία της ρευστοποίησης και σακχαροποίησης, σε υψηλή αρχική συγκέντρωση ξηρής μάζας, 24% w/v, στο θάλαμο ρευστοποίησης, όπως περιγράφηκε προηγουμένως. Η διάρκεια της διεργασίας ήταν είτε 12, είτε 24 ώρες, ενώ μελετήθηκε και η επίδραση της προσθήκης επιπλέον ενζύμου, πριν το στάδιο της ζύμωσης. Το προκατεργασμένο CS, σύστασης 61,3% w/w σε κυτταρίνη, παρουσιάζει μεγάλη δυνατότητα επίτευξης υψηλής συγκέντρωσης σακχάρων, που αποτελεί απαραίτητη προϋπόθεση ώστε να επιτευχθεί και υψηλή συγκέντρωση αιθανόλης στο ζυμό της ζύμωσης. Το CS ρευστοποιήθηκε τελείως έπειτα από 12 ώρες κατεργασίας και η συγκέντρωση της γλυκόζης και των ολικών αναγωγικών σακχάρων (TRS) ήταν 84,29 και 119,54 g/L ,αντίστοιχα, ενώ μετά από 24 ώρες υδρόλυσης, τόσο η γλυκόζη όσο και τα ολικά αναγωγικά σάκχαρα είχαν αυξηθεί ελαφρώς (91,03 και 130,88 g/L, αντίστοιχα). Οι διαφορές ανάμεσα στα επίπεδα της γλυκόζης και των TRS, αποδίδονται κυρίως σε σάκχαρα που προέρχονται από την υδρόλυση υπολειμμάτων ημικυτταρίνης και όχι σε συσσώρευση κελλοβιόζης, αφού το Cellic[®] CTec2 παρουσιάζει δράση ημικυτταρινάσης και περιέχει υψηλά επίπεδα β-γλυκοζιδάσης. Η υδρόλυση της κυτταρίνης, με βάση τη γλυκόζη, ήταν 50,3 ή 54,3 % μετά από 12 και 24 ώρες ενζυμικής κατεργασίας αντίστοιχα. Σύμφωνα με αυτά τα αποτελέσματα, 12 ώρες ρευστοποίησης και σακχαροποίησης φαίνονται να είναι επαρκείς για την αποτελεσματική υδρόλυση της κυτταρίνης. Η μέγιστη συγκέντρωση αιθανόλης ήταν 35,5 g/L μετά από 72 ώρες και 36,8 g/L μετά από 96 ώρες, στην περίπτωση των 12 και 24 ωρών υδρόλυσης αντίστοιχα (Πίνακας 3-1), εμφανίζοντας υψηλή παραγωγικότητα αιθανόλης μετά τις πρώτες 24 ώρες ζύμωσης (περίπου 1,4 g/L·h και για τις δύο περιπτώσεις, όπως φαίνεται στον Πίνακα 3-1). Η συγκέντρωση της αιθανόλης ενισχύθηκε με την προσθήκη επιπλέον ενζύμου, στο ξεκίνημα της ταυτόχρονης ζύμωσης και υδρόλυσης κατά 17% και 14% , έπειτα από 12 και 24 ώρες σακχαροποίησης, αντίστοιχα. Η ενίσχυση αυτή, ήταν αρκετή για να επιτευχθεί συγκέντρωση αιθανόλης μεγαλύτερη από το όριο του 4% w/w (41,5 και 41,9 g/L, μετά από 12 και 24 ώρες σακχαροποίησης αντίστοιχα), που αποτελεί απαραίτητη προϋπόθεση για μια βιώσιμη διεργασία παραγωγής αιθανόλης. Η απόδοση της αιθανόλης έφτασε το 51% της μέγιστης θεωρητικής απόδοσης, με βάση τη συνολική μετατροπή της κυτταρίνης σε αιθανόλη (Πίνακας 3-1).

Εικόνα 3-1. Ρευστοποίηση και σακχαροποίηση του CS με υψηλή αρχική συγκέντρωση ξηρής μάζας 24% w/v στην αρχή της διεργασίας (A), και μετά από 1 ώρα (B) , 2 ώρες (C) και 4 ώρες (D)



Σύμφωνα με τη μελέτη των Avcı *et al.* (2013,a), κατά την προκατεργασία με αραιό φωσφορικό οξύ (161.81°C, 0.78% v/v H₃PO₄ για 9.78 λεπτά) η μέγιστη συγκέντρωση αιθανόλης ήταν 26,4 g/L μετά από 48 ώρες, ενώ κατά την προκατεργασία με αραιό θειικό οξύ (0.75% v/v H₂SO₄, 160°C χωρίς χρόνο) επιτεύχθηκε συγκέντρωση αιθανόλης 30,6 g/L (Avcı *et al.*, 2013,b) μετά από 72 ώρες, Για τη ζύμωση χρησιμοποιήθηκε το στέλεχος FBR5 της *Escherichia coli* με προσθήκη 15 FPU/g ξηρής μάζας, συμπληρωμένο με 9 CBU/g ξηρής μάζας και 1578 U ξυλανάσης /g ημικυτταρινούχου περιεχομένου και επιπλέον θρεπτικών συστατικών. Σε άλλη μελέτη, με χρήση του ίδιου στελέχους της *E.coli*, που μπορεί να ζυμώνει τόσο πεντόζες αλλά και εξόζες, ο Saha *et al.* (2013) πραγματοποίησε ζύμωση υδροθερμικά προκατεργασμένου CS (10% w/v, 200°C για 5 λεπτά) και ανέφερε παραγωγή αιθανόλης με συγκέντρωση 20,9 g/L μετά από 12 ώρες. Σύμφωνα με τον Xu *et al.* (2010), κατά την, καταλυόμενη με οξικό οξύ, υδροθερμική προκατεργασία (15 g οξικού οξέος ανά kg ακατέργαστου CS, 195°C για 15 λεπτά) υπήρξε παραγωγή αιθανόλης με συγκέντρωση 33,7 g/L (ζύμωση με μαγιά αρτοποιίας) σε συγκέντρωση στερεών 13% με εφαρμογή της διεργασίας SSF. Ο Xuezhı *et al.* (2014), ανέφερε μια μέγιστη συγκέντρωση αιθανόλης της τάξεως των 39,4 g/L μετά από 18 ώρες προ-υδρόλυσης και 60 ώρες διεργασίας S-SSF με προσθήκη 30-35 FPU/g υποστρώματος. Οι Zhao και Xia (2009) πέτυχαν συγκέντρωση αιθανόλης της τάξεως των 27,8 g/L με ζύμωση αλκαλικά προκατεργασμένου CS για 72 h με προσθήκη 20 FPU/g ξηρής μάζας, συμπληρωμένο με 10 CBU/g ξηρής μάζας. Οι Wan και Li (2010) διαπίστωσαν μια συγκέντρωση αιθανόλης 25 g/L , χρησιμοποιώντας μια μέθοδο προκατεργασίας

με μύκητες *Ceriporiopsis subvermisporea* και μετά από ζύμωση 72 ωρών με *S. cerevisiae*. Η υψηλότερη συγκέντρωση αιθανόλης (49,7 g/L) παρατηρήθηκε από τους Lu et al. (2010) κατά την προκατεργασία με έκρηξη ατμού σε συγκέντρωση στερεών 30% w/w με εφαρμογή ημιδιαλείποντος διεργασίας SHF αλλά με χαμηλότερη παραγωγικότητα (0,34 g/L · h) σε σύγκριση με την παραγωγικότητα των 0,58 g/L · h που επιτεύχθηκε σε αυτή την εργασία.

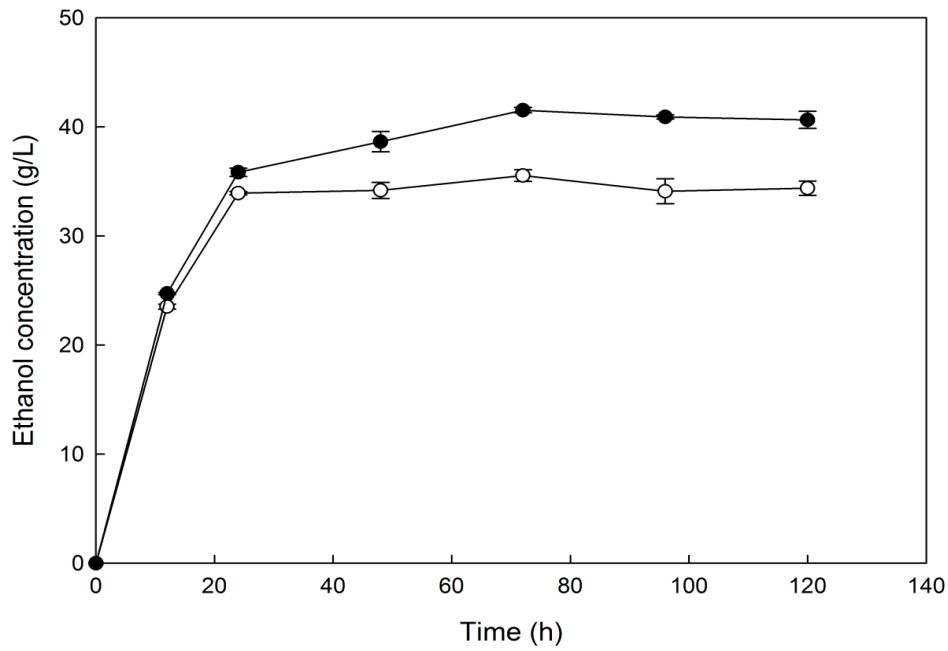
Εικόνα 3-2. Υλικό τύπου CS με συγκέντρωση στερεών 24% w/v , πριν (αριστερά) και μετά (δεξιά) τη διαδικασία ρευστοποίησης high gravity



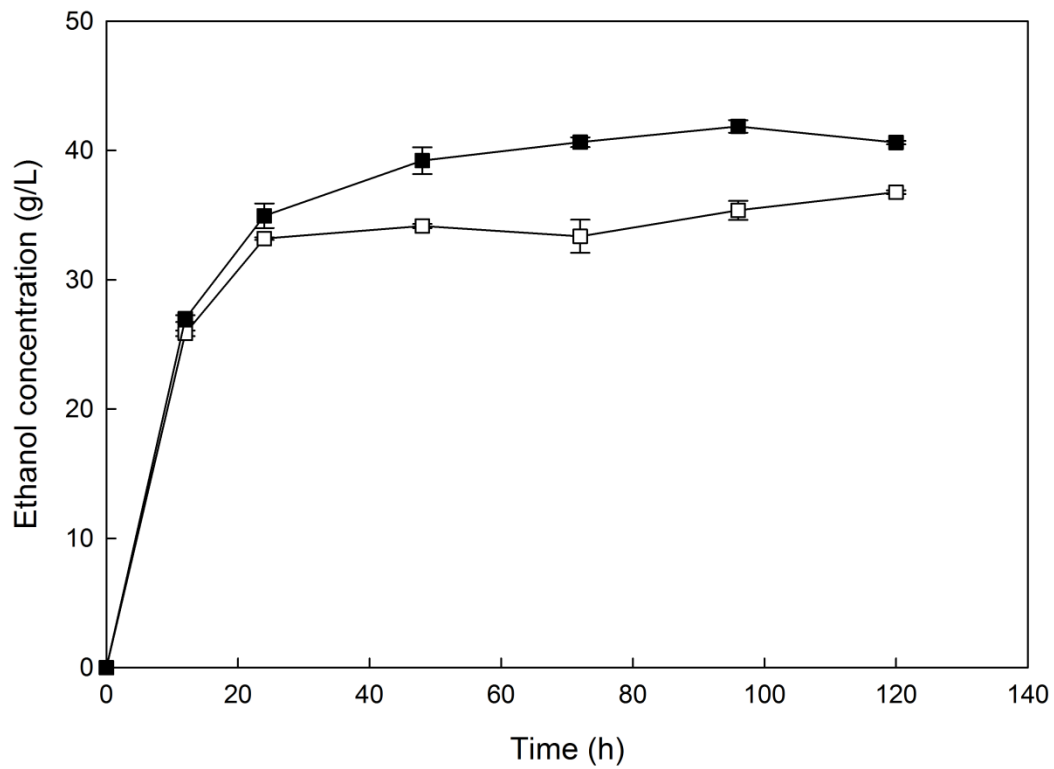
Στην παρούσα εργασία, ελήφθησαν καλύτερα αποτελέσματα, συγκριτικά με τις παραπάνω μελέτες, αναφορικά με τη συγκέντρωση της αιθανόλης, ακόμα και χωρίς την προσθήκη επιπλέον ενζύμων στην αρχή της διαδικασίας SSF ή εξωτερικής β-γλυκοζιδάσης. Η υψηλή παραγωγή αιθανόλης των 41,5 g/L , που επιτεύχθηκε με ζύμωση υδροθερμικά προκατεργασμένου CS σε μη αποστειρωμένα μέσα και χωρίς να έχει προηγηθεί στάδιο αποτοξίνωσης ή προσθήκη θρεπτικών συστατικών, αναδεικνύει τη δυνατότητα του συγκεκριμένου υλικού να χρησιμοποιηθεί ως πρώτη ύλη για μια οικονομικά εφικτή διεργασία μετατροπής βιομάζας σε αιθανόλη. Τα συγκεκριμένα αποτελέσματα παρουσιάζονται στα επόμενα διαγράμματα.

Σημειώνεται πως στα παρακάτω διαγράμματα, οι κουκκίδες με λευκό χρώμα αναπαριστούν τη ζύμωση που πραγματοποιήθηκε χωρίς προσθήκη επιπλέον ενζύμου μετά την υδρόλυση του CS, ενώ οι κουκκίδες με μαύρο χρώμα αναφέρονται στη ζύμωση που πραγματοποιήθηκε με προσθήκη επιπλέον ενζύμου μετά τη διαδικασία της σακχαροποίησης και ρευστοποίησης.

Διάγραμμα 3-10. Διάγραμμα μεταβολής της συγκέντρωσης αιθανόλης σε συνάρτηση με το χρόνο για CS που έχει υποστεί υδρόλυση για 12 ώρες σε συγκέντρωση στερεών 24%



Διάγραμμα 3-11. Διάγραμμα μεταβολής της συγκέντρωσης αιθανόλης σε συνάρτηση με το χρόνο για CS που έχει υποστεί υδρόλυση για 24 ώρες σε συγκέντρωση στερεών 24%



Συνοπτικά τα παραπάνω αποτελέσματα, παρουσιάζονται στον πίνακα 3-1.

Πίνακας 3-1. Επίδραση διαφορετικών συνθηκών ρευστοποίησης-σακχαροποίησης στην παραγωγή, απόδοση και σχετική απόδοση(υπολογισμένη ως ποσοστό της μέγιστης θεωρητικής απόδοσης) της αιθανόλης

Συνθήκες υδρόλυσης			Παραγωγή αιθανόλης		
Διάρκεια (h)	Προσθήκη επιπλέον ενζύμων	Συγκέντρωση (g/L)	Παραγωγικότητα αιθανόλης τις πρώτες 24h (g/L·h)	Απόδοση (g/ 100 g ξηρής μάζας)	Σχετική απόδοση αιθανόλης(%)
12	-	35.54	1.41	11.25	43.6
12	+	41.53	1.49	13.15	50.9
24	-	36.77	1.38	11.64	45.1
24	+	41.85	1.46	13.25	51.3

3.2. Μελέτη προκατεργασίας απολιγνίνωσης σε Corn Stover

3.2.1. Σύσταση υλικών A/B

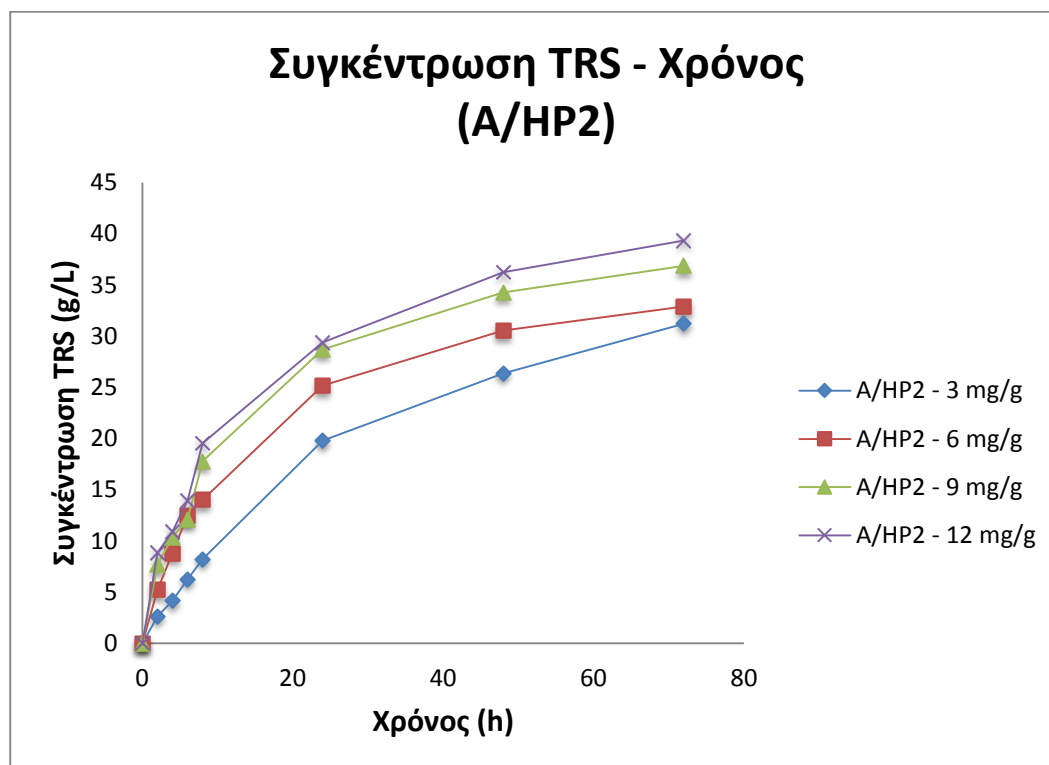
Για τη μελέτη της προκατεργασίας απολιγνίνωσης (Milox), χρησιμοποιήθηκε στερεό υπόλειμμα αραβοσίτου, που έχει υποβληθεί σε απολιγνίνωση (A) και σε συνδυασμό απολιγνίνωσης και υδροθερμικής προκατεργασίας (B). Το υλικό προήλθε από το Ινστιτούτο Χημικών Διεργασιών & Ενεργειακών Πόρων (ΙΔΕΠ) στη Θέρμη Θεσσαλονίκης. Η σύσταση του υλικού A, μετά την προκατεργασία του, διαπιστώθηκε πως ήταν $81,61 \pm 1,03$ % κυτταρίνη, $6,46 \pm 0,86$ % ημικυτταρίνη και $5,79 \pm 0,38$ % λιγνίνη, βάρος κατά βάρος σε ξηρή βάση (dry basis). Το υλικό B, βρέθηκε ότι μετά την προκατεργασία του περιείχε $91,35 \pm 0,79$ % κυτταρίνη, $1,06 \pm 0,32$ % ημικυτταρίνη και $3,11 \pm 0,56$ % λιγνίνη, βάρος κατά βάρος σε ξηρή βάση. Όπως είναι φανερό, το υλικό B που έχει υποστεί 2 είδη προκατεργασίας έχει αρκετά υψηλότερο ποσοστό κυτταρίνη και χαμηλότερο ποσοστό ημικυτταρίνης.

3.2.2. Επίδραση ενζυμικού φορτίου στην υδρόλυση των A και B

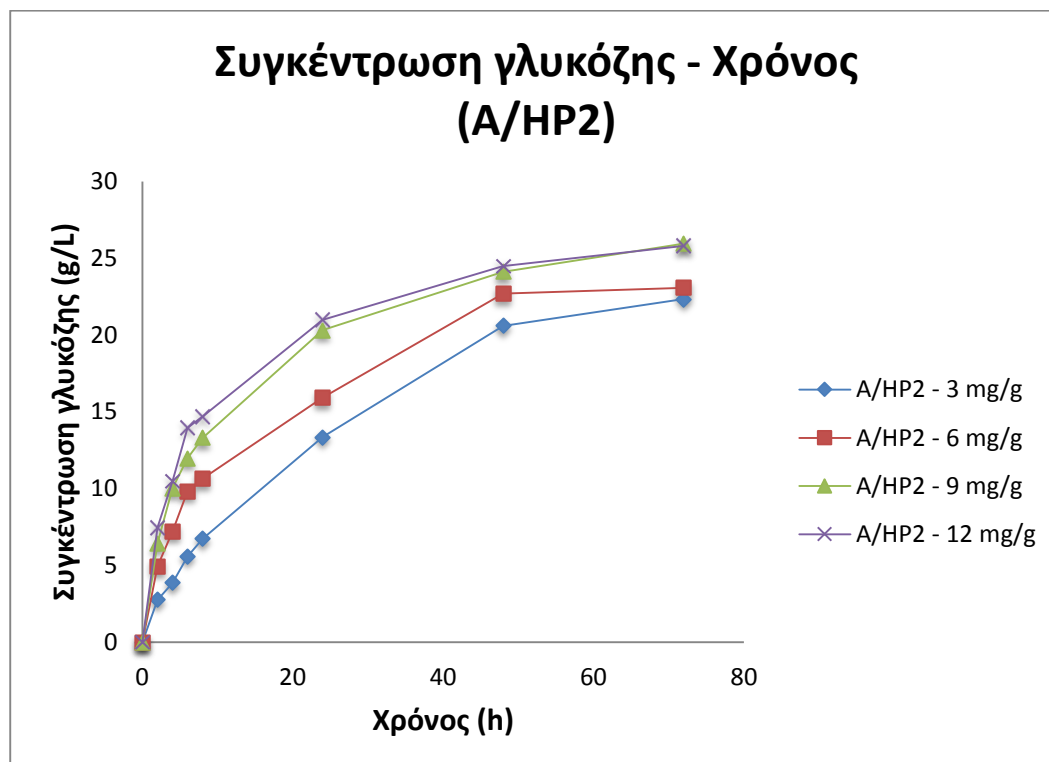
Με στόχο τον προσδιορισμό της βέλτιστης ενζυμικής συγκέντρωσης στην οποία θα υποβληθεί σε ενζυμική υδρόλυση το κάθε υλικό, πραγματοποιούνται πειράματα υδρολύσεων σε διάφορες συνθήκες. Για τα συγκεκριμένα πειράματα, γίνεται χρήση του ενζύμου Cellic® CTec2 (κωδικοποίηση HP2), καθώς όπως διαπιστώθηκε στην προηγούμενη παράγραφο, παρουσιάζει τα πιο ικανοποιητικά αποτελέσματα συγκριτικά με τα υπόλοιπα ένζυμα που χρησιμοποιήθηκαν. Μελετήθηκε λοιπόν, η ενζυμική υδρόλυση των υλικών A και B, για συγκέντρωση στερεών 3% w/v και για ενζυμικά φορτία 3, 6, 9 και 12 mg/g Ξ.B του ενζύμου HP2. Η διαδικασία της υδρόλυσης διήρκησε 72 ώρες, κατά τις οποίες λαμβάνονταν δείγματα ανά τακτά χρονικά διαστήματα και αναλύονταν για τον προσδιορισμό της συγκέντρωσης των ολικών αναγωγικών σακχάρων και της γλυκόζης. Σύμφωνα με τις μετρήσεις, προκύπτουν τα παρακάτω διαγράμματα, όπως παραθέτονται για κάθε υλικό.

- **Υλικό A**

Διάγραμμα 3-12. Μεταβολή της συγκέντρωσης ολικών αναγωγικών σακχάρων με το χρόνο για το υλικό 3A με ενζυμικά φορτία 3, 6, 9 και 12 mg/g του ενζύμου HP2



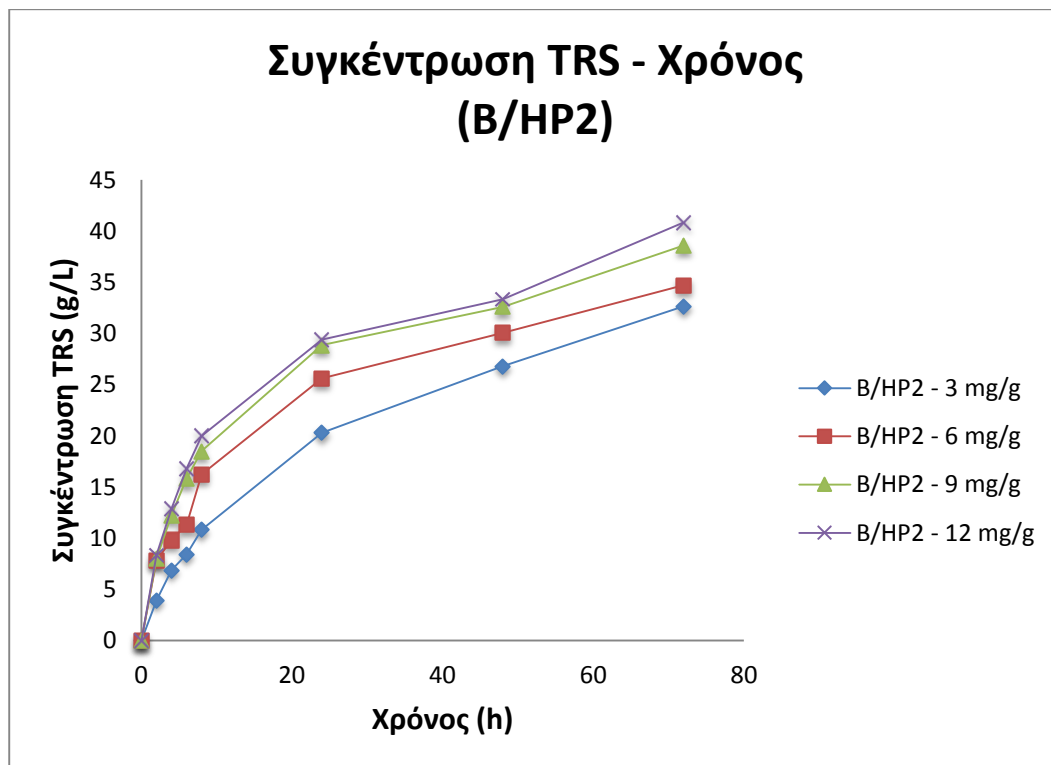
Διάγραμμα 3-13. Μεταβολή της συγκέντρωσης της γλυκόζης με το χρόνο για το υλικό 3A με ενζυμικά φορτία 3, 6, 9 και 12 mg/g του ενζύμου HP2



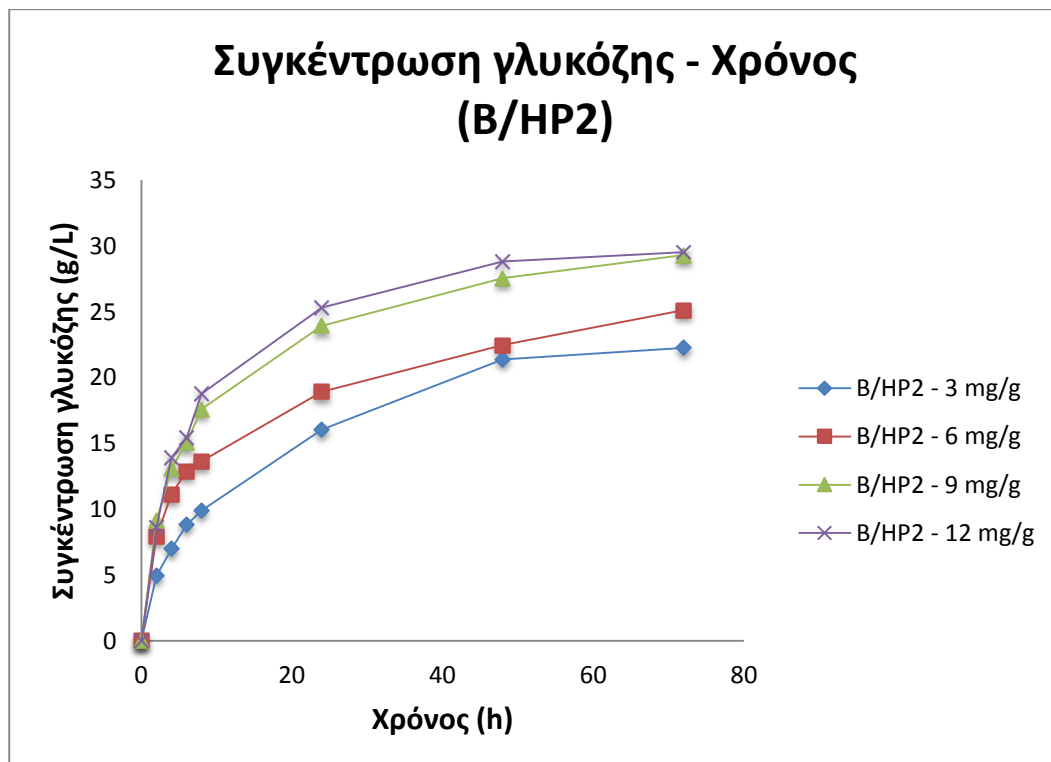
Όπως φαίνεται στα διαγράμματα 3-12 και 3-13, το ένζυμο HP2 σε συγκεντρώσεις 3 και 6 mg/g Ξ.Β, εμφανίζει μικρότερη ενεργότητα, με αποτέλεσμα να προκύπτουν μικρότερες συγκεντρώσεις TRS (31,2 και 32,9 g/L αντίστοιχα) και γλυκόζης (22,3 και 23 g/L αντίστοιχα), συγκριτικά με τα μεγαλύτερα ενζυμικά φορτία. Στις συγκεντρώσεις των 9 και 12 mg/g Ξ.Β, τα αποτελέσματα είναι παραπλήσια με ικανοποιητικές συγκεντρώσεις TRS (36,9 και 39,3 g/L αντίστοιχα) και υψηλές συγκεντρώσεις γλυκόζης (26 και 25,8 g/L αντίστοιχα). Η απόκλιση της τάξεως του 6% με βάση τα TRS, ανάμεσα στα φορτία των 9 και 12 mg/g Ξ.Β είναι ελάχιστη. Για το λόγο αυτό, θεωρείται ότι το βέλτιστο ενζυμικό φορτίο του HP2 για ενζυμική υδρόλυση του υλικού A, είναι στα 9 mg/g Ξ.Β, καθώς η αύξησή του θα περιελάμβανε και αύξηση στο κόστος της διεργασίας χωρίς την ανάλογη αύξηση σε απόδοση.

- Υλικό Β

Διάγραμμα 3-14. Μεταβολή της συγκέντρωσης ολικών αναγωγικών σακχάρων με το χρόνο για το υλικό 3C με ενζυμικά φορτία 3, 6, 9 και 12 mg/g του ενζύμου HP2



Διάγραμμα 3-15. Μεταβολή της συγκέντρωσης της γλυκόζης με το χρόνο για το υλικό 3C με ενζυμικά φορτία 3, 6, 9 και 12 mg/g του ενζύμου HP2

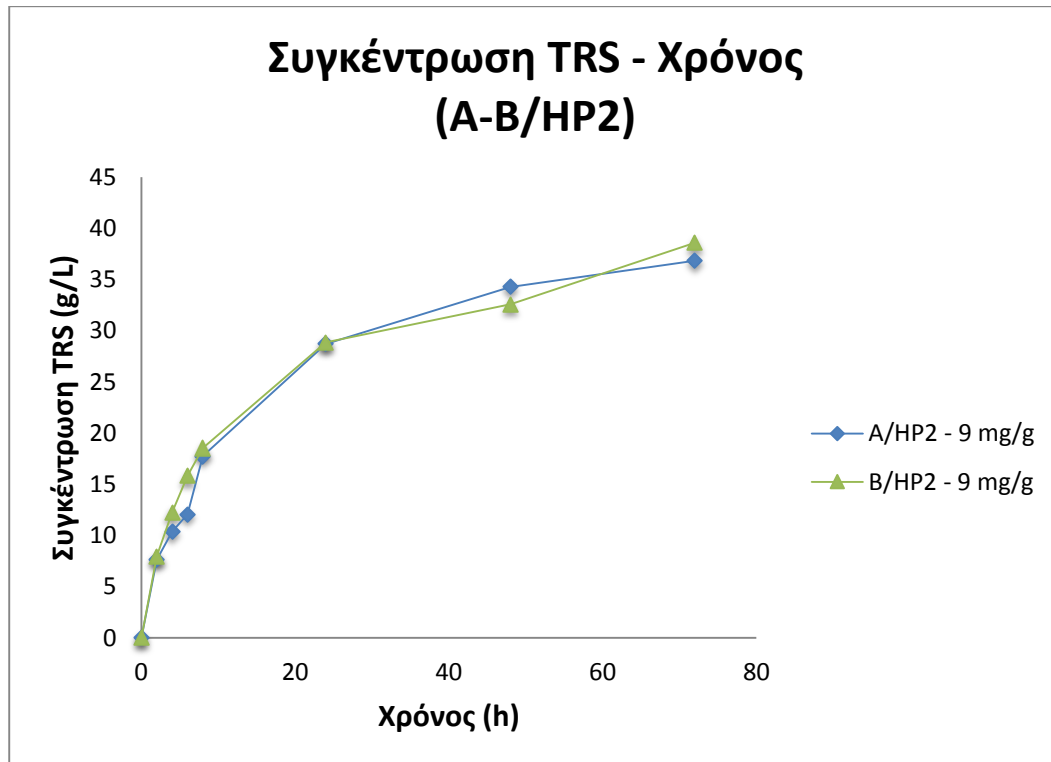


Σύμφωνα με τα διαγράμματα 3-14 και 3-15, οι ενζυμικές συγκεντρώσεις των 3 και 6 mg/g Ξ.Β αποδίδουν αρκετά χαμηλότερες τιμές συγκεντρώσεων TRS (32,7 και 34,7 g/L αντίστοιχα) και γλυκόζης (22,3 και 25,1 g/L αντίστοιχα). Τα φορτία των 9 και 12 mg/g Ξ.Β αντίθετα, εμφανίζουν πολύ ικανοποιητική συμπεριφορά, με κοντινές τιμές συγκεντρώσεων τόσο TRS (38,6 και 40,8 g/L αντίστοιχα) όσο και γλυκόζης (29,3 και 29,5 g/L αντίστοιχα). Είναι φανερό πως, όπως και για το υλικό Α, η διαφορά στην ενεργότητα μεταξύ των φορτίων 9 και 12 mg/g Ξ.Β είναι ελάχιστη (απόκλιση 5%) και έτσι, για το υλικό Β διακρίνεται ως καταλληλότερη συγκέντρωση ενζύμου για υδρόλυση εκείνη των 9 mg/g Ξ.Β.

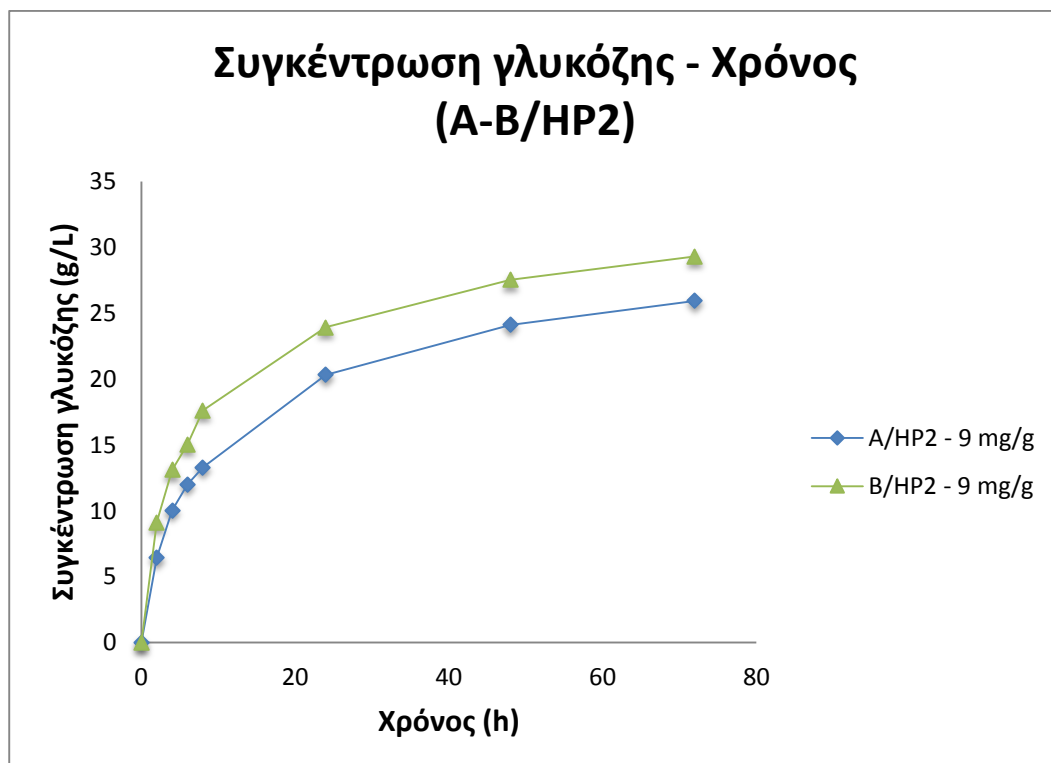
3.2.3. Σύγκριση υλικών Α και Β ως προς την απελευθέρωση ζυμώσιμων σακχάρων

Από τη μελέτη που πραγματοποιήθηκε στην προηγούμενη παράγραφο, προέκυψε η βέλτιστη τιμή της ενζυμικής συγκέντρωσης στην οποία πρέπει να χρησιμοποιηθεί το ένζυμο HP2 για την υδρόλυση των υλικών Α και Β. Και για τις δύο περιπτώσεις το καταλληλότερο ενζυμικό φορτίο ήταν τα 9 mg/g Ξ.Β. Στη συγκεκριμένη ενότητα, θα συγκριθούν τα βέλτιστα αποτελέσματα των 2 υλικών μεταξύ τους, με σκοπό να διαπιστωθεί ποιο από τα δύο υλικά και κατά προέκταση ποια από τις προκατεργασίες στις οποίες υποβλήθηκαν, είναι πιο αποδοτική αναφορικά με την απελευθέρωση ζυμώσιμων σακχάρων. Στη συνέχεια, παρουσιάζονται τα διαγράμματα όπου συγκρίνονται οι συγκεντρώσεις TRS και γλυκόζης των δύο υλικών, με χρήση του ενζύμου Cellic[®] CTec2.

Διάγραμμα 3-16. Μεταβολή της συγκέντρωσης ολικών αναγωγικών σακχάρων με το χρόνο για τα υλικά 3A και 3C με ενζυμικό φορτίο 9 mg/g του ενζύμου HP2



Διάγραμμα 3-17. Μεταβολή της συγκέντρωσης της γλυκόζης με το χρόνο για τα υλικά 3A και 3C με ενζυμικό φορτίο 9 mg/g του ενζύμου HP2



Είναι φανερό, από τα διαγράμματα 3-16 και 3-17, πως το υλικό Β, εμφανίζει πιο ικανοποιητικά αποτελέσματα υδρόλυσης. Αναφορικά με τη συγκέντρωση των ολικών αναγωγικών σακχάρων, τα δύο υλικά παρουσιάζουν μικρές διαφορές, αντίθετα η απόκλιση στη συγκέντρωση γλυκόζης που προκύπτει από την υδρόλυση κάθε υλικού είναι αρκετά μεγαλύτερη, με το υλικό Β να υπερβαίνει το Α κατά 11% ως προς τη γλυκόζη. Η προαναφερθείσα διαφορά δικαιολογείται από το ποσοστό κυτταρίνης κάθε υλικού, καθώς το υλικό Β έχοντας υποστεί δύο ειδών προκατεργασίες (Milox και υδροθερμική) εμφανίζει υψηλότερο ποσοστό κυτταρίνης που στη συνέχεια υδρολύεται και οδηγεί σε μεγαλύτερη συγκέντρωση γλυκόζης. Συνοπτικά λοιπόν, συμπεραίνεται πως ο συνδυασμός των προκατεργασιών απολιγνίνωσης και υδροθερμικής οδηγεί σε αρκετά υψηλότερη απόδοση ζυμώσιμων σακχάρων μετά την ενζυμική υδρόλυση, συγκριτικά με την προκατεργασία μόνο με απολιγνίνωση.

3.2.4. Σύγκριση υλικών Α και Β ως προς την παραγωγή βιοαιθανόλης

Για τη μελέτη της ζύμωσης των υλικών Α και Β και την αξιολόγησή τους, πραγματοποιήθηκαν πειράματα ζυμώσεων σε διάφορες συνθήκες. Για όλες τις ενζυμικές υδρολύσεις έγινε χρήση του ενζύμου Cellic[®] CTec2 (HP2) σε ενζυμική συγκέντρωση των 6 mg/g Ξ.Β. Επιπλέον, η συγκέντρωση στερεών ήταν σταθερή σε κάθε δοκιμή και ίση με 10% w/v. Για κάθε υλικό, διεξήχθησαν δύο ζυμώσεις για 93 ώρες : μία διεργασία ταυτόχρονης υδρόλυσης και ζύμωσης, χωρίς προϋδρόλυση (Χωρίς Προϋδρόλυση, ΧΠ) του υλικού και μία διεργασία ταυτόχρονης υδρόλυσης και ζύμωσης, της οποίας όμως έχει προηγηθεί ρευστοποίηση και προϋδρόλυση (Με Προϋδρόλυση, ΜΠ) του υλικού για 8 ώρες με το ένζυμο HP2. Ανά τακτά χρονικά διαστήματα λαμβάνονταν δείγματα, τα οποία αναλύονταν στο HPLC για τον προσδιορισμό της συγκέντρωσης της αιθανόλης. Προκύπτουν λοιπόν, τα ακόλουθα αποτελέσματα για κάθε υλικό.

Πίνακας 3-2. Πίνακας αποτελεσμάτων των ζυμώσεων του υλικού 3A, με και χωρίς προϋδρόλυση

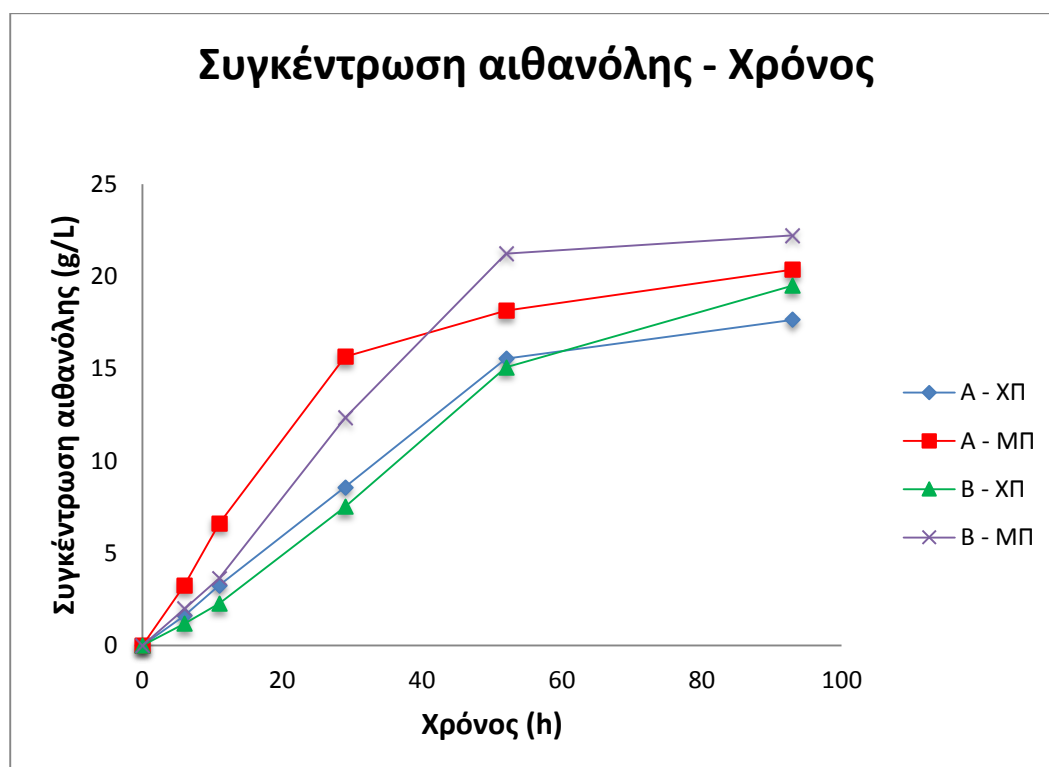
3A					
Χρόνος (h)	Χωρίς προϋδρόλυση		Με προϋδρόλυση		% Απόκλιση ΜΠ vs ΧΠ
	Συγκέντρωση Αιθανόλης (g/L)	Παραγωγικότητα Αιθανόλης (g/L·h)	Συγκέντρωση Αιθανόλης (g/L)	Παραγωγικότητα Αιθανόλης (g/L·h)	
6	1,61	0,27	3,26	0,54	50,57
11	3,26	0,30	6,62	0,60	50,73
29	8,60	0,30	15,66	0,54	45,11
52	15,56	0,30	18,15	0,35	14,26
93	17,65	0,19	20,38	0,22	13,39

Πίνακας 3-3. Πίνακας αποτελεσμάτων των ζυμώσεων του υλικού 3C, με και χωρίς προϋδρόλυση

3C					
Χρόνος (h)	Χωρίς προϋδρόλυση		Με προϋδρόλυση		% Απόκλιση ΜΠ vs ΧΠ
	Συγκέντρωση Αιθανόλης (g/L)	Παραγωγικότητα Αιθανόλης (g/L·h)	Συγκέντρωση Αιθανόλης (g/L)	Παραγωγικότητα Αιθανόλης (g/L·h)	
6	1,18	0,20	1,98	0,33	40,32
11	2,28	0,21	3,66	0,33	37,62
29	7,52	0,26	12,34	0,43	39,02
52	15,09	0,29	21,23	0,41	28,94
93	19,51	0,21	22,23	0,24	12,24

Με βάση λοιπόν του πίνακες 3-2 και 3-3, μπορεί να κατασκευαστεί και το παρακάτω διάγραμμα, στο οποίο συγκρίνονται τα αποτελέσματα όλων των ζυμώσεων.

Διάγραμμα 3-18. Μεταβολή της συγκέντρωσης της αιθανόλης με το χρόνο για τη ζύμωση των υλικών 3A και 3C, με και χωρίς προϋδρόλυση



Σύμφωνα με τους πίνακες 3-2, 3-3 και με το διάγραμμα 3-18, προκύπτει το συμπέρασμα πως το υλικό B, με προϋδρόλυση πριν τη ζύμωση, οδηγεί στα καλύτερα αποτελέσματα, έχοντας την υψηλότερη συγκέντρωση αιθανόλης στο τέλος της ζύμωσης. Επιπλέον, είναι φανερό πως οι ζυμώσεις των οποίων έχει προηγηθεί προϋδρόλυση, εμφανίζουν μεγαλύτερη απόδοση σε αιθανόλη συγκριτικά με εκείνες στις οποίες οι διαδικασίες της ζύμωσης και υδρόλυσης πραγματοποιούνται εξ ολοκλήρου στον ίδιο χρόνο. Ενδεικτικό είναι πως ειδικά τις πρώτες ώρες της διεργασίας η απόκλιση μεταξύ των δύο περιπτώσεων μπορεί να φτάσει έως και το 50%, ενώ μειώνεται σταδιακά μέχρι το τέλος της υδρόλυσης όπου κυμαίνεται στο 13% για το υλικό A και στο 12% για το υλικό B. Συμπερασματικά δηλαδή, προκύπτει πως η προκατεργασία με συνδυασμό απολιγνίνωσης και υδροθερμικής διεργασίας, επιφέρει αρκετά καλύτερα αποτελέσματα αναφορικά με την απόδοση σε αιθανόλη, ειδικά εάν συνδυαστεί και με ένα στάδιο προϋδρόλυσης πριν τη ζύμωση, γεγονός που ήταν αναμενόμενο και λόγω της υψηλότερης περιεκτικότητας σε κυτταρίνη του υλικού που υπεβλήθηκε στη συγκεκριμένη προκατεργασία.

3.3. Μελέτη προκατεργασίας υγρής οξείδωσης σε πριονίδι οξιάς

3.3.1. Σύσταση Lignocel

Τα δείγματα Lignocel, προήλθαν από το Εθνικό Κέντρο Έρευνας και Τεχνολογικής Ανάπτυξης (Ε.Κ.Ε.Τ.Α., Θεσσαλονίκη), όπου πραγματοποιήθηκε και η προκατεργασία τους. Και τα 9 δείγματα, έχουν προκατεργασθεί με τη διαδικασία της υγρής οξείδωσης, σε διαφορετικές όμως συνθήκες. Η μέθοδος αυτή είναι κατάλληλη για υλικά με χαμηλό ποσοστό λιγνίνης. Σύμφωνα με τη συγκεκριμένη προκατεργασία η βιομάζα επεξεργάζεται σε νερό και αέρα ή οξυγόνο, σε υψηλές θερμοκρασίες (άνω των 120 °C. Πολλές φορές μπορεί να γίνει και προσθήκη κάποιου αλκαλικού καταλύτη. Η σύσταση κάθε δείγματος και οι ακριβείς συνθήκες προκατεργασίας του, παρουσιάζονται παρακάτω στους πίνακες 3-4 έως και 3-6.

Πίνακας 3-4. Πίνακας συστάσεων και συνθηκών προκατεργασίας των δειγμάτων Lignocel (α)

A/a	1	2	3
Όνομα δείγματος	ligC_300414_L	ligC_050514_L	ligC_290514_L
Βιομάζα	Lignocel	Lignocel	Lignocel
Διάλυμα	d. H ₂ O/acetone (50/50%)	d. H ₂ O/acetone (50/50%)	d. H ₂ O/acetone (25/75%)
Αέριο	Air (40% O ₂)	N ₂	Air
Πίεση (bar)	8,5	8,5	20
Θερμοκρασία (°C)	175	175	160
Χρόνος αντίδρασης (min)	120	120	120
Λιγνίνη μη διαλυτή σε οξύ (%)	10,26	15,36	15,70
Λιγνίνη διαλυτή σε οξύ (%)	1,67	0,00	3,00
Κυτταρίνη (%)	70,61	71,83	50,22
Ημικυτταρίνη (%)	16,02	10,38	19,71
Σύνολο (%)	98,56	97,56	88,63

Πίνακας 3-5. Πίνακας συστάσεων και συνθηκών προκατεργασίας των δειγμάτων Lignocel (β)

A/a	4	5	6
Όνομα δείγματος	ligC_160614_L	h_ligC_110614_L_a	h_ligC_110614_L_b
Βιομάζα	Lignocel	Hydrolized Lignocel (175°C, 2h)	Hydrolized Lignocel (175°C, 2h)
Διάλυμα	d. H ₂ O/acetone (25/75%)	d. H ₂ O/acetone (50/50%)	d. H ₂ O/acetone (25/75%)
Αέριο	Air (40% O ₂)	Air (40% O ₂)	Air (40% O ₂)
Πίεση (bar)	8,5	8,5	8,5
Θερμοκρασία (°C)	175	175	175
Χρόνος αντίδρασης (min)	120	120	120
Λιγνίνη μη διαλυτή σε οξύ (%)	13,92	8,39	13,38
Λιγνίνη διαλυτή σε οξύ (%)	2,25	0,51	0,65
Κυτταρίνη (%)	57,03	79,47	73,60
Ημικυτταρίνη (%)	23,82	4,01	4,22
Σύνολο (%)	97,02	92,39	91,85

Πίνακας 3-6. Πίνακας συστάσεων και συνθηκών προκατεργασίας των δειγμάτων Lignocel (γ)

A/a	7	8	9
Όνομα δείγματος	ligC_120614_L	ligC_171114_L	ligc_151214_L
Βιομάζα	Lignocel	Lignocel	Lignocel
Διάλυμα	d. H ₂ O/acetone (25/75%)	d. H ₂ O/acetone (50/50%)	d. H ₂ O/acetone (75/25%)
Αέριο	Air (40% O ₂)	Air (40% O ₂)	Air (40% O ₂)
Πίεση (bar)	40	40	40
Θερμοκρασία (°C)	175	175	175
Χρόνος αντίδρασης (min)	120	120	120
Λιγνίνη μη διαλυτή σε οξύ (%)	2,06	2,07	11,54
Λιγνίνη διαλυτή σε οξύ (%)	1,55	1,33	1,00
Κυτταρίνη (%)	75,36	86,68	84,10
Ημικυτταρίνη (%)	17,93	10,27	5,18
Σύνολο (%)	96,90	100,35	101,81

Σύμφωνα με τα δεδομένα των παραπάνω πινάκων, μπορούν να γίνουν οι εξής παρατηρήσεις. Αρχικά, διαπιστώνεται πως όλα τα δείγματα διαφέρουν μεταξύ τους ως προς τις συνθήκες στις οποίες υπεβλήθησαν σε προκατεργασία. Υπάρχουν δείγματα με διαφορετική βιομάζα (υδρολυμένο και ακατέργαστο υλικό), με διαφορετικό διάλυμα επεξεργασίας (σύμφωνα με την αναλογία νερού-ακετόνης) καθώς και με διαφορετικό αέριο επεξεργασίας (αέρας, άζωτο, διαφορετική περιεκτικότητα αέρα σε οξυγόνο). Ακόμα, διαφέρει η θερμοκρασία επεξεργασίας (ένα δείγμα στους 160 °C έναντι 175 °C των υπόλοιπων δειγμάτων), η πίεση (επεξεργασία σε 8,5 , 20 και 40 bar). Ο χρόνος αντίδρασης ήταν σταθερός και ίσος με 120 λεπτά σε όλα τα δείγματα. Τέλος, είναι εμφανής η διαφορά στη σύσταση κάθε δείγματος, σύμφωνα με τις % περιεκτικότητες τόσο της λιγνίνης (διαλυτής και αδιάλυτης σε οξύ),όσο και της κυτταρίνης και ημικυτταρίνης. Παρατηρείται πως τα

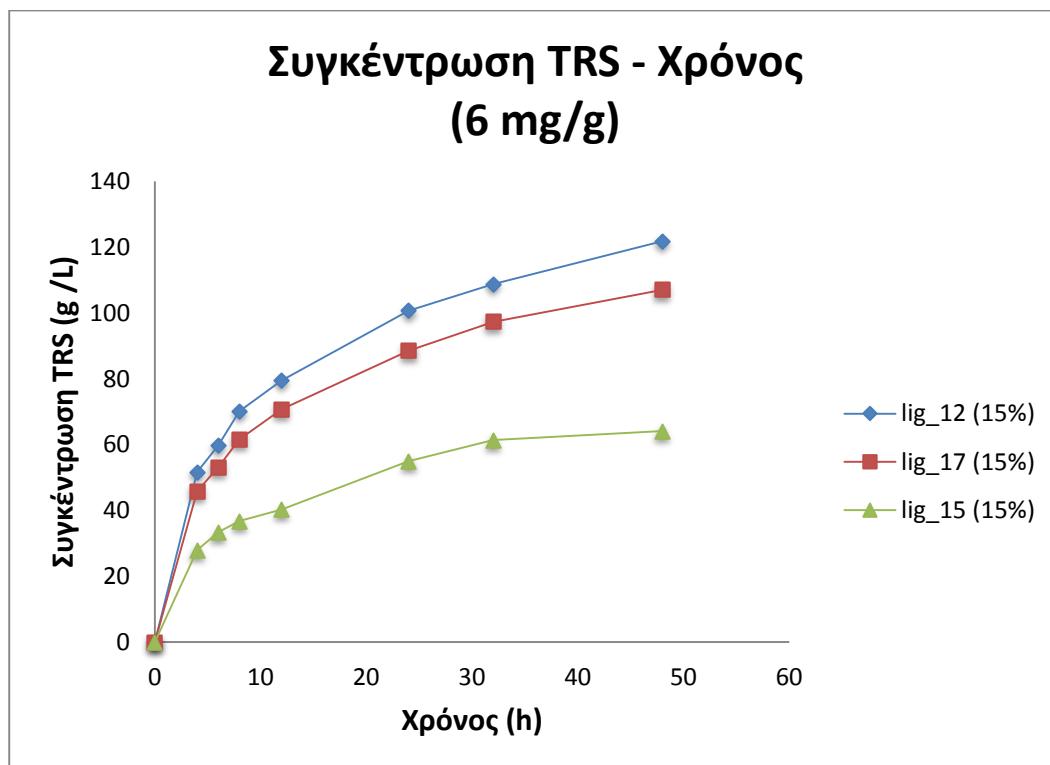
δείγματα 7,8 και 9 εμφανίζουν τα υψηλότερα ποσοστά κυτταρίνης και ημικυτταρίνης, ενώ ταυτόχρονα έχουν μικρή περιεκτικότητα σε λιγνίνη. Αντίθετα, τα δείγματα 3 και 4 παρουσιάζουν τις μικρότερες περιεκτικότητες σε κυτταρίνη και αυξημένα ποσοστά λιγνίνης μη διαλυτής σε οξύ.

3.3.2. Επίδραση ενζυμικού φορτίου στην υδρόλυση προκατεργασμένου Lignocel

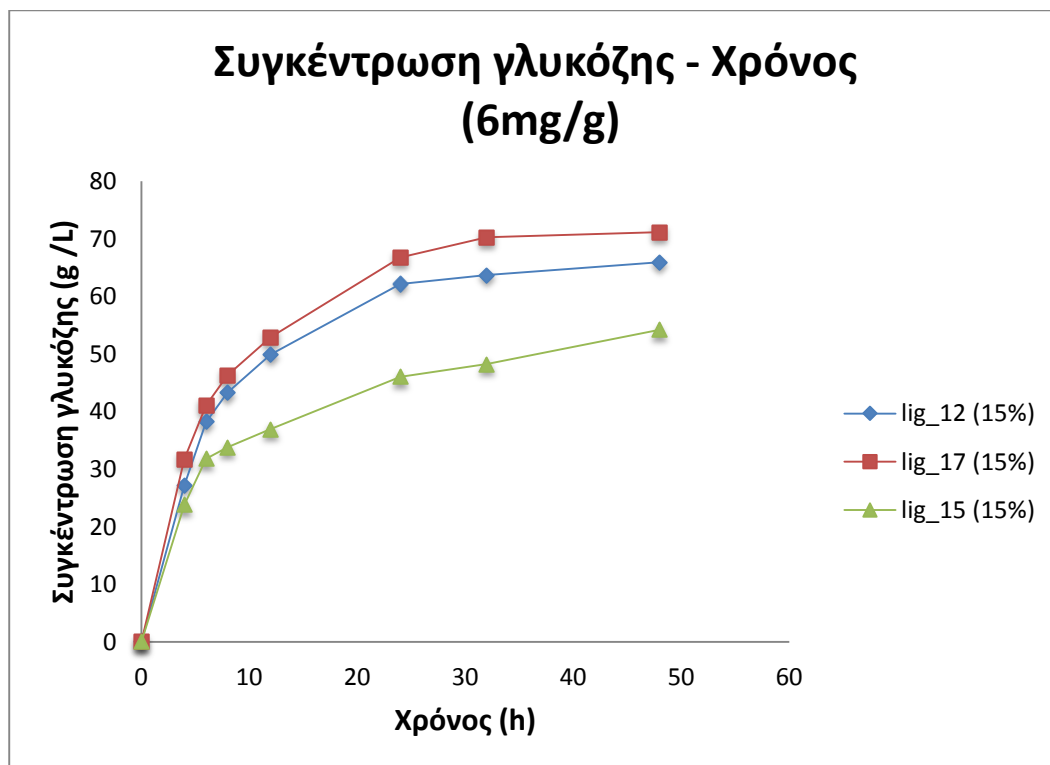
Για τη μελέτη της επίδρασης του ενζυμικού φορτίου στην υδρόλυση του προκατεργασμένου Lignocel, πραγματοποιήθηκαν ενζυμικές υδρολύσεις των δειγμάτων 7 (lig_12), 8 (lig_17) και 9 (lig_15) για διάφορες συνθήκες. Τα συγκεκριμένα δείγματα, επιλέχθηκαν λόγω της υψηλής περιεκτικότητάς τους σε κυτταρίνη και ημικυτταρίνη και θεωρείται πως λειτουργούν αντιπροσωπευτικά για το σύνολο των δειγμάτων. Η συγκέντρωση των στερεών για κάθε δείγμα ήταν 15% w/v. Τα πειράματα πραγματοποιήθηκαν με χρήση του ενζύμου Cellic[®] CTec2, για ενζυμικές συγκεντρώσεις 6, 9 και 12 mg/g Ξ.Β και για 48 ώρες υδρόλυσης. Ανά τακτά χρονικά διαστήματα, λαμβάνονταν δείγματα, τα οποία αναλύονταν για τον προσδιορισμό των ολικών αναγωγικών σακχάρων και της γλυκόζης. Σύμφωνα λοιπόν, με τις μετρήσεις προκύπτουν τα παρακάτω διαγράμματα για κάθε περίπτωση ενζυμικού φορτίου.

- Για ενζυμική συγκέντρωση 6 mg/g ξηρής μάζας :

Διάγραμμα 3-19. Μεταβολή της συγκέντρωσης ολικών αναγωγικών σακχάρων με το χρόνο για ενζυμικό φορτίο 6 mg/g για τα δείγματα 7, 8 και 9



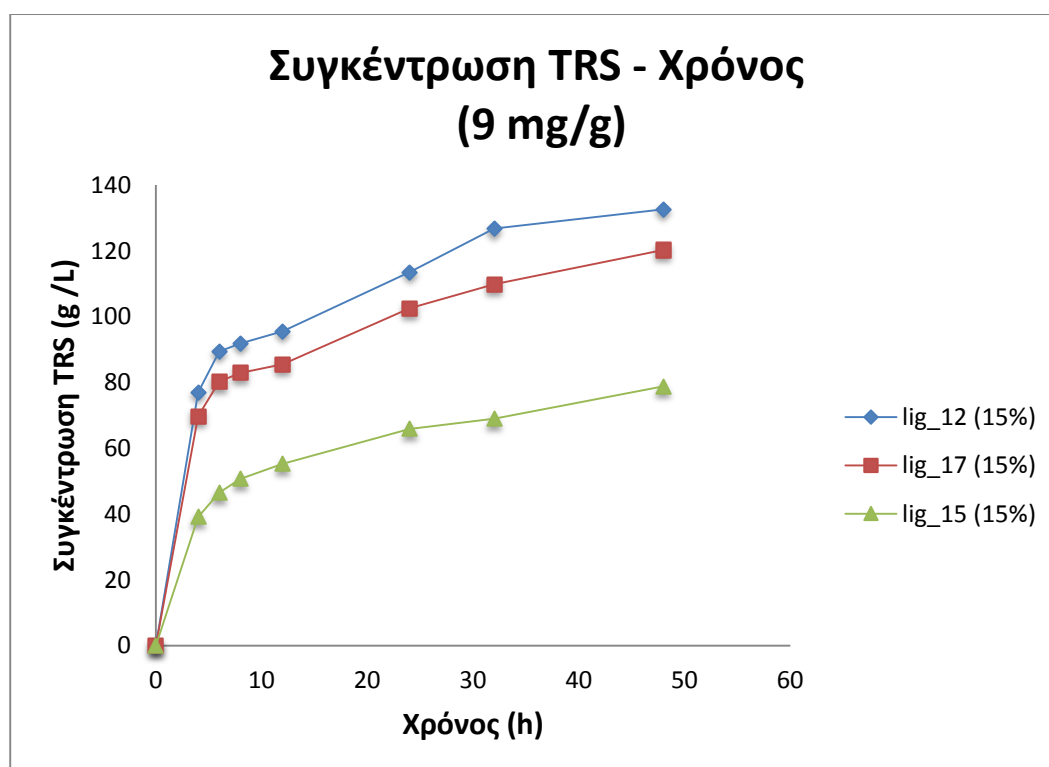
Διάγραμμα 3-20. Μεταβολή της συγκέντρωσης της γλυκόζης με το χρόνο για ενζυμικό φορτίο 6 mg/g για τα δείγματα 7, 8 και 9



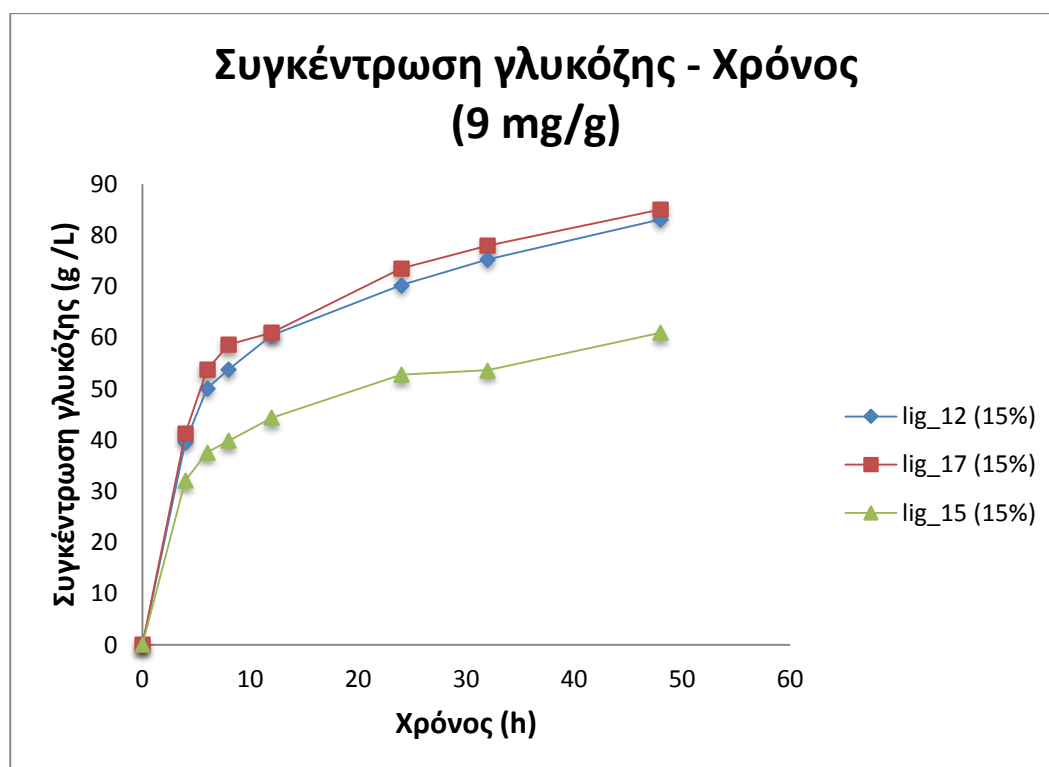
Με βάση τα διαγράμματα 3-19 και 3-20, είναι εμφανές πως το δείγμα 9 (lig_15) υστερεί κατά πολύ συγκριτικά με τα άλλα δύο δείγματα, αφού τόσο η συγκέντρωση των TRS αλλά και της γλυκόζης, μετά τις 48 ώρες υδρόλυσης είναι αρκετά μικρότερη. Τα δείγματα 7 (lig_12) και 8 (lig_17) παρουσιάζουν ικανοποιητικά αποτελέσματα, με μικρή απόκλιση. Και τα δύο δείγματα έχουν σταθεροποιηθεί πριν το τέλος της υδρόλυσης. Ωστόσο, παρά το γεγονός πως στις 48 ώρες το δείγμα 7 έχει υψηλότερη συγκέντρωση TRS (121,8 έναντι 107 g/L), το δείγμα 8 θεωρείται καλύτερο αφού στον ίδιο χρόνο, έχει μεγαλύτερη συγκέντρωση γλυκόζης(71,2 έναντι 66 g/L). Συνοπτικά δηλαδή, για ενζυμικό φορτίο 6 mg/g Ξ.Β, το δείγμα 8 είναι αποδοτικότερο.

- Για ενζυμική συγκέντρωση 9 mg/g ξηρής μάζας :

Διάγραμμα 3-21. Μεταβολή της συγκέντρωσης ολικών αναγωγικών σακχάρων με το χρόνο για ενζυμικό φορτίο 9 mg/g για τα δείγματα 7, 8 και 9



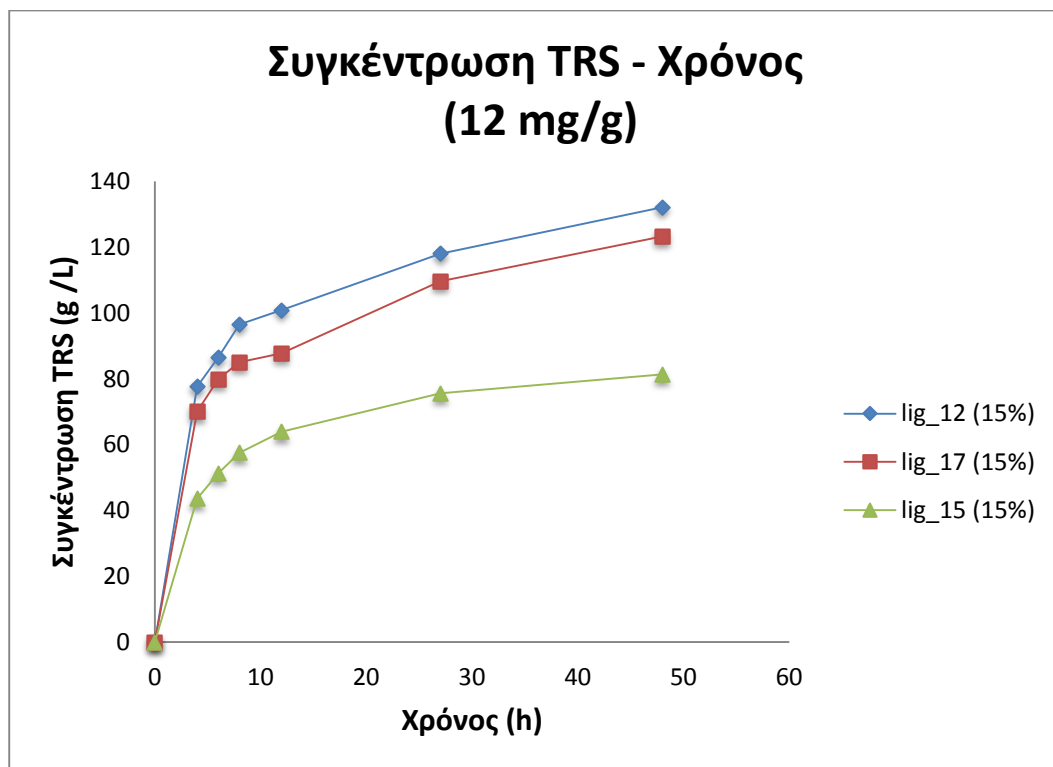
Διάγραμμα 3-22. Μεταβολή της συγκέντρωσης της γλυκόζης με το χρόνο για ενζυμικό φορτίο 9 mg/g για τα δείγματα 7, 8 και 9



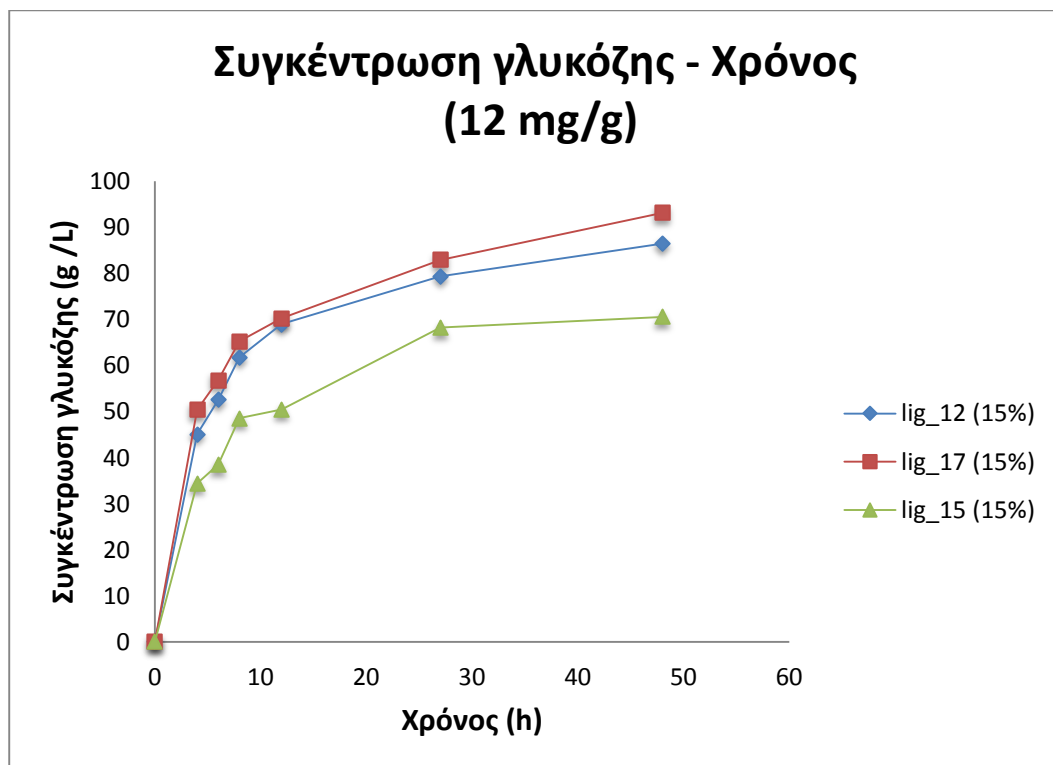
Αντίστοιχα με την προηγούμενη περίπτωση, όπως παρατηρείται από τα διαγράμματα 3-21 και 3-22, το δείγμα 9 (lig_15) δεν παρουσιάζει ικανοποιητικά αποτελέσματα, έχοντας αρκετά μικρότερη απόδοση σε γλυκόζη συγκριτικά με τα άλλα δύο δείγματα. Τόσο το δείγμα 7 (lig_12) όσο και το δείγμα 8 (lig_17), εμφανίζουν μεγαλύτερες συγκεντρώσεις TRS (132,6 και 120,3 g/L αντίστοιχα) και γλυκόζης (83,1 και 85,1 g/L αντίστοιχα), με μικρές διαφορές ανάμεσά τους. Το δείγμα 8 υπερτερεί και πάλι λόγω υψηλότερης συγκέντρωσης γλυκόζης στο τέλος της υδρόλυσης.

- Για ενζυμική συγκέντρωση 12 mg/g ξηρής μάζας :

Διάγραμμα 3-23. Μεταβολή της συγκέντρωσης ολικών αναγωγικών σακχάρων με το χρόνο για ενζυμικό φορτίο 12 mg/g για τα δείγματα 7, 8 και 9



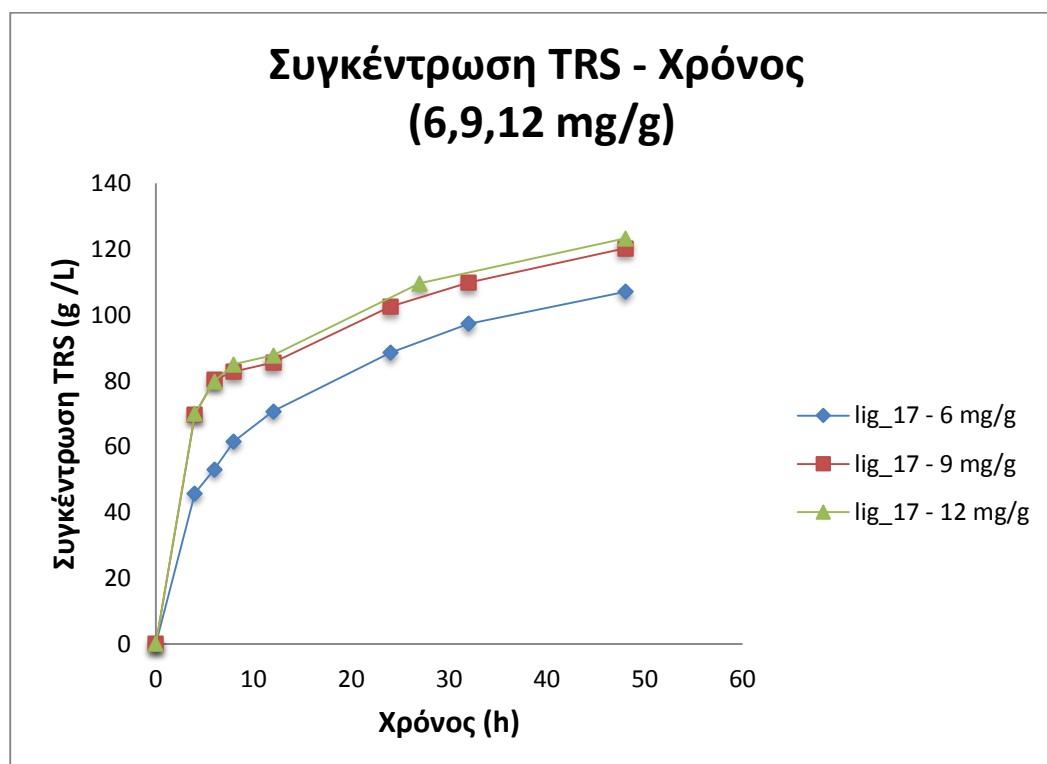
Διάγραμμα 3-24. Μεταβολή της συγκέντρωσης της γλυκόζης με το χρόνο για ενζυμικό φορτίο 12 mg/g για τα δείγματα 7, 8 και 9



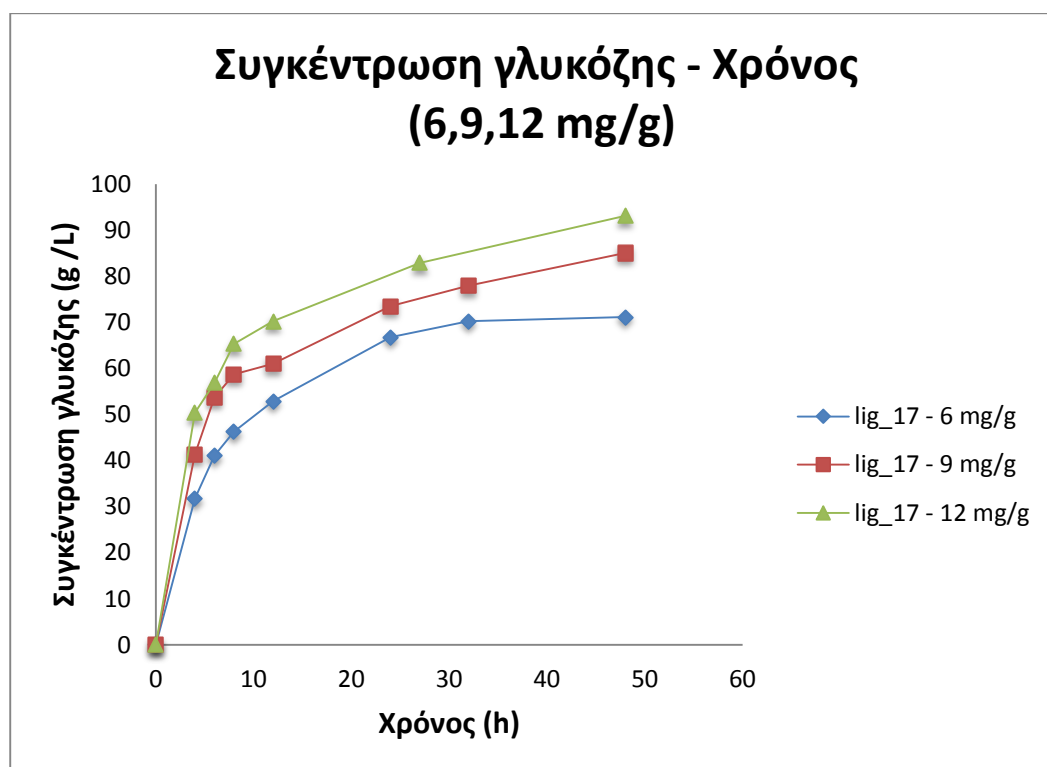
Σύμφωνα με τα διαγράμματα 3-23 και 3-24, το δείγμα 9 (lig_15) στο τέλος της υδρόλυσης, έχει χαμηλότερη συγκέντρωση TRS και γλυκόζης σε σχέση με τα υπόλοιπα δείγματα. Τα δείγματα 7 (lig_12) και 8 (lig_17) παρουσιάζουν και πάλι καλά αποτελέσματα, με μικρές αποκλίσεις. Και στη συγκεκριμένη περίπτωση το δείγμα 7 έχει υψηλότερη συγκέντρωση TRS (132,1 έναντι 123,3 g/L) στις 48 ώρες, προτιμάται όμως το δείγμα 8 λόγω των μικρών διαφορών και τις υψηλότερης συγκέντρωσης σε γλυκόζη (93,1 έναντι 86,5 g/L).

Όπως προκύπτει λοιπόν από τα πειράματα και τη μελέτη των αποτελεσμάτων τους, το δείγμα 8 (lig_17), εμφανίζει τα πιο ικανοποιητικά αποτελέσματα υδρόλυσης, λόγω της αυξημένης συγκέντρωσης της γλυκόζης, τόσο για το ενζυμικό φορτίο των 6 mg/g Ξ.Β αλλά και για τα ενζυμικά φορτία των 9 και 12 mg/g Ξ.Β. Για το λόγο αυτό, θα γίνει σύγκριση των μετρήσεων του δείγματος 8 για κάθε ενζυμικό φορτίο με σκοπό τη διαπίστωση της καταλληλότερης ενζυμικής συγκέντρωσης για τη διαδικασία της ενζυμικής υδρόλυσης των Lignocel, που έχουν προκατεργαστεί με υγρή οξείδωση.

Διάγραμμα 3-25. Μεταβολή της συγκέντρωσης ολικών αναγωγικών σακχάρων με το χρόνο για τα ενζυμικά φορτία 6, 9 και 12 mg/g του δείγματος 8



Διάγραμμα 3-26. Μεταβολή της συγκέντρωσης της γλυκόζης με το χρόνο για τα ενζυμικά φορτία 6, 9 και 12 mg/g του δείγματος 8



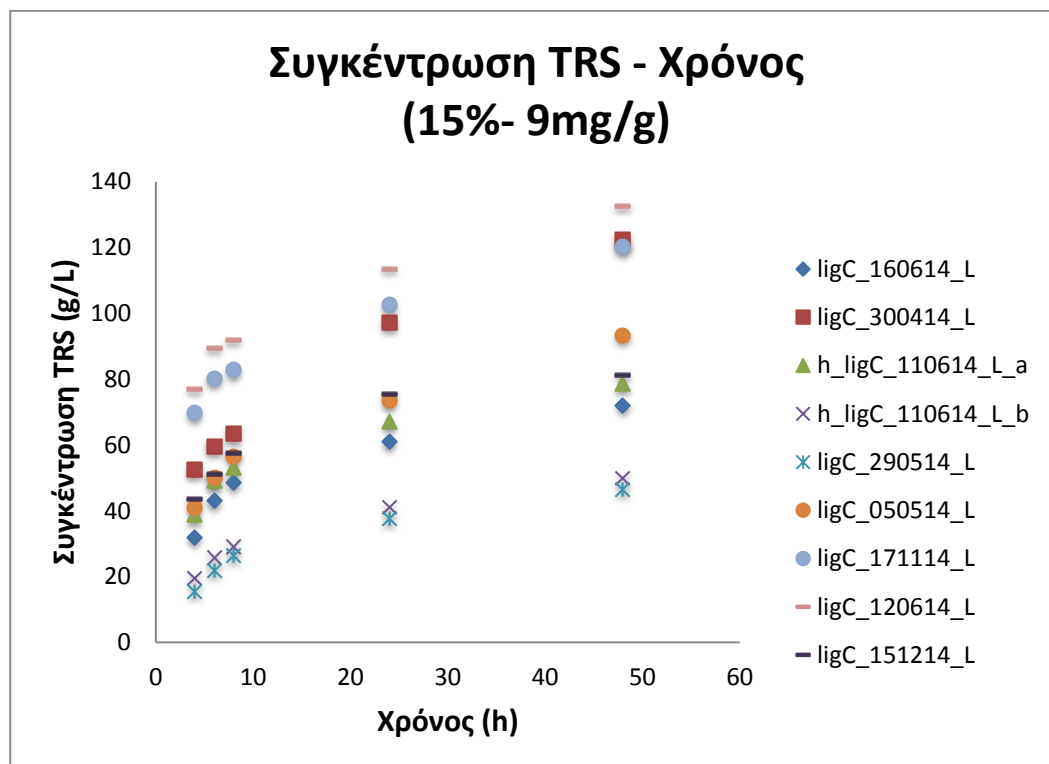
Στα διαγράμματα 3-25 και 3-26 παρουσιάζονται οι μεταβολές των συγκεντρώσεων των TRS και της γλυκόζης αντίστοιχα για κάθε ενζυμικό φορτίο του δείγματος 8 (lig_17). Με βάση λοιπόν αυτά τα δύο διαγράμματα, είναι εμφανές πως το δείγμα στη μικρότερη ενζυμική συγκέντρωση των 6 mg/g Ξ.Β, παρουσιάζει τη μικρότερη συγκέντρωση TRS και γλυκόζης, όπως ήταν και αναμενόμενο. Ακόμα, παρατηρείται πως οι ενζυμικές συγκεντρώσεις των 9 και 12 mg/g Ξ.Β έχουν ελάχιστες αποκλίσεις της τάξεως του 1% με βάση τη γλυκόζη. Η συγκέντρωση των ολικών αναγωγικών σακχάρων μετά τις 48 ώρες υδρόλυσης είναι σχεδόν ίση για τα δύο αυτά ενζυμικά φορτία, ενώ και η συγκέντρωση της γλυκόζης στο ίδιο σημείο έχει μικρή διαφορά μεταξύ των δύο συγκεντρώσεων. Πράγματι, όπως θα περίμενε κανείς, η συγκέντρωση γλυκόζης για το ενζυμικό φορτίο των 12 mg/g Ξ.Β είναι μεγαλύτερη από εκείνο των 9 mg/g Ξ.Β, αλλά με πολύ μικρότερη διαφορά από ότι ήταν αναμενόμενο. Το γεγονός αυτό μπορεί να οφείλεται είτε σε παρεμπόδιση του ενζύμου από κάποιο προϊόν του, είτε σε κορεσμό του ενζύμου στην ενζυμική συγκέντρωση των 9 mg/g Ξ.Β. Το συμπέρασμα λοιπόν της μελέτης που πραγματοποιήθηκε στη συγκεκριμένη ενότητα είναι πως το βέλτιστο ενζυμικό φορτίο, για την ενζυμική υδρόλυση Lignocel προκατεργασμένου με υγρή οξείδωση είναι τα 9 mg/g Ξ.Β, αφού οι διαφορές στην

απόδοση σε σχέση με το φορτίο των 12 mg/g Ξ.Β είναι μικρές και δε δικαιολογούν το επιπλέον οικονομικό κόστος σε μια βιομηχανία.

3.3.3. Αξιολόγηση των συνθηκών υγρής οξείδωσης ως προς την απελευθέρωση ζυμώσιμων σακχάρων

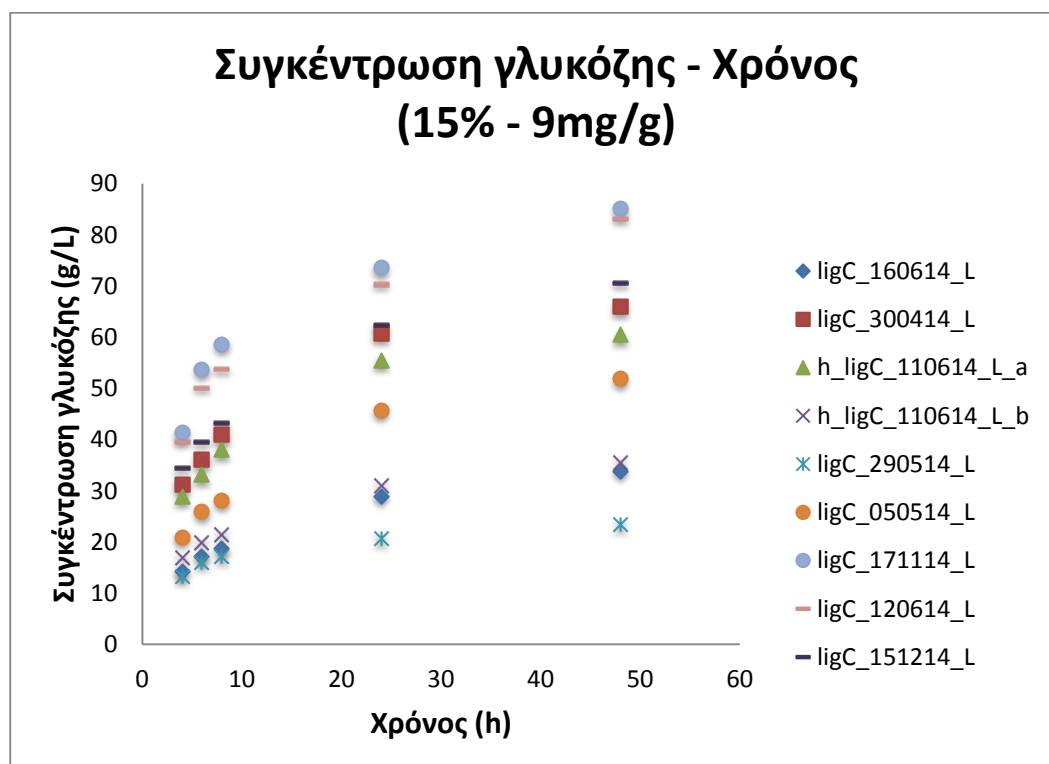
Με σκοπό την αξιολόγηση των συνθηκών της υγρής οξείδωσης ως προς την απελευθέρωση ζυμώσιμων σακχάρων, πραγματοποιείται ένα ακόμα πείραμα ενζυμικής υδρόλυσης με συγκέντρωση στερεών 15 % w/v. Η υδρόλυση έγινε με χρήση του ενζύμου Cellic[®] CTec2, στο βέλτιστο ενζυμικό φορτίο των 9 mg/g Ξ.Β, όπως αυτό υπολογίστηκε στην προηγούμενη παράγραφο. Στη συγκεκριμένη υδρόλυση, μελετήθηκαν και τα εννέα δείγματα Lignocel, που παρουσιάζονται στους πίνακες 3-3 έως και 3-6. Τέλος, η ενζυμική υδρόλυση διήρκησε 48 ώρες, κατά τη διάρκεια των οποίων λαμβάνονταν δείγματα ανά τακτά χρονικά διαστήματα, τα οποία αναλύονταν για τον προσδιορισμό των ολικών αναγωγικών σακχάρων και της γλυκόζης. Από της αναλύσεις που έγιναν με τη μέθοδο DNS για κάθε δείγμα, προκύπτει η συγκέντρωση των TRS, όπως φαίνεται στο παρακάτω διάγραμμα.

Διάγραμμα 3-27. Μεταβολή της συγκέντρωσης ολικών αναγωγικών σακχάρων με το χρόνο για ενζυμικό φορτίο 9 mg/g και συγκέντρωση στερεών 15 % w/v για όλα τα δείγματα



Επιπλέον, από τις αναλύσεις που πραγματοποιήθηκαν στα δείγματα με τη μέθοδο GOD/PAP, προσδιορίστηκε η συγκέντρωση της γλυκόζης για κάθε χρόνο δειγματοληψίας, οπότε και προκύπτει το εξής διάγραμμα.

Διάγραμμα 3-28. Μεταβολή της συγκέντρωσης της γλυκόζης με το χρόνο για ενζυμικό φορτίο 9 mg/g και συγκέντρωση στερεών 15 % w/v για όλα τα δείγματα

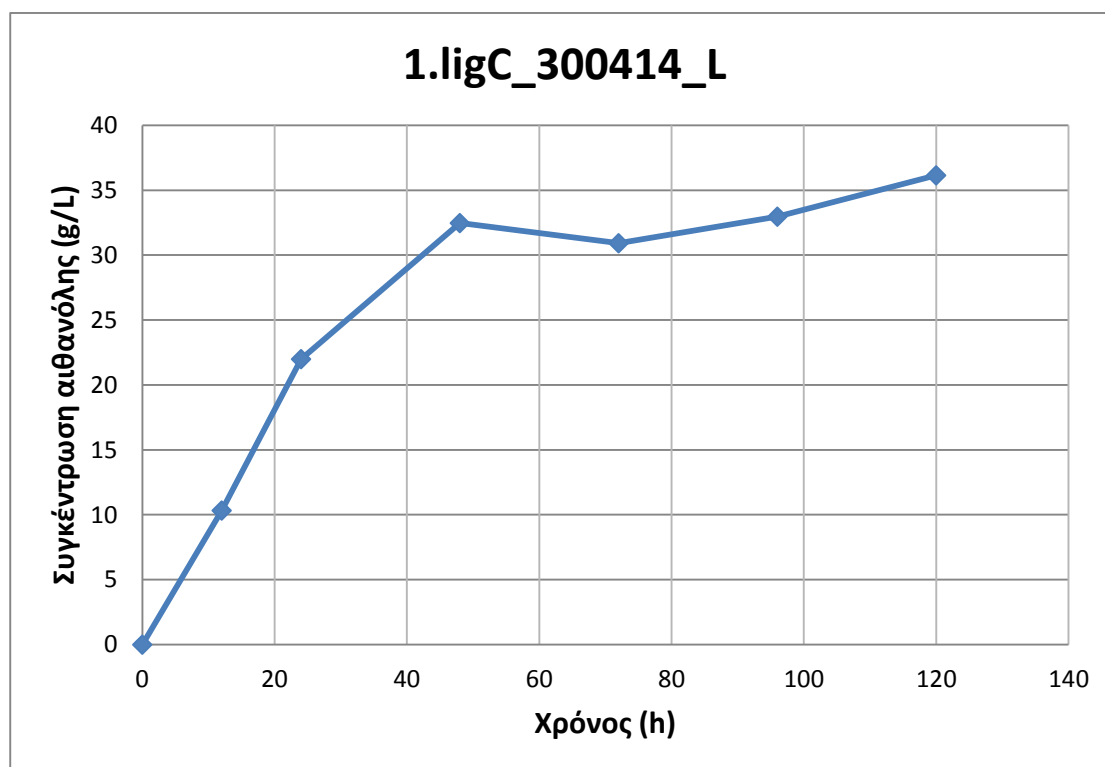


Σύμφωνα λοιπόν με τα διαγράμματα 3-27 και 3-28, διακρίνονται 3 δείγματα με βάση τις συγκεντρώσεις TRS και γλυκόζης, τα ligC_120614_L (δείγμα 7), ligC_171114_L (δείγμα 8) και ligC_300414_L (δείγμα 1). Τα υπόλοιπα δείγματα οδηγούν σε χαμηλότερες συγκεντρώσεις ολικών αναγωγικών σακχάρων και γλυκόζης μετά το τέλος της υδρόλυσης. Το δείγμα 7 εμφανίζει την υψηλότερη συγκέντρωση TRS, ενώ το δείγμα 8 παρουσιάζει μεγαλύτερη τελική συγκέντρωση γλυκόζης. Το δείγμα 1 καταλήγει σε ικανοποιητικές συγκεντρώσεις TRS (122,4 g/L) και γλυκόζης (66 g/L), που είναι όμως χαμηλότερες συγκριτικά με τα δύο προηγούμενα δείγματα. Συμπερασματικά, οι συνθήκες προκατεργασίας του υλικού ligC_171114_L, θεωρούνται βέλτιστες ως προς την απόδοση ζυμώσιμων σακχάρων, για την εφαρμογή σε υλικό τύπου Lignocel που θα υποστεί ενζυμική υδρόλυση και επακόλουθη ζύμωση.

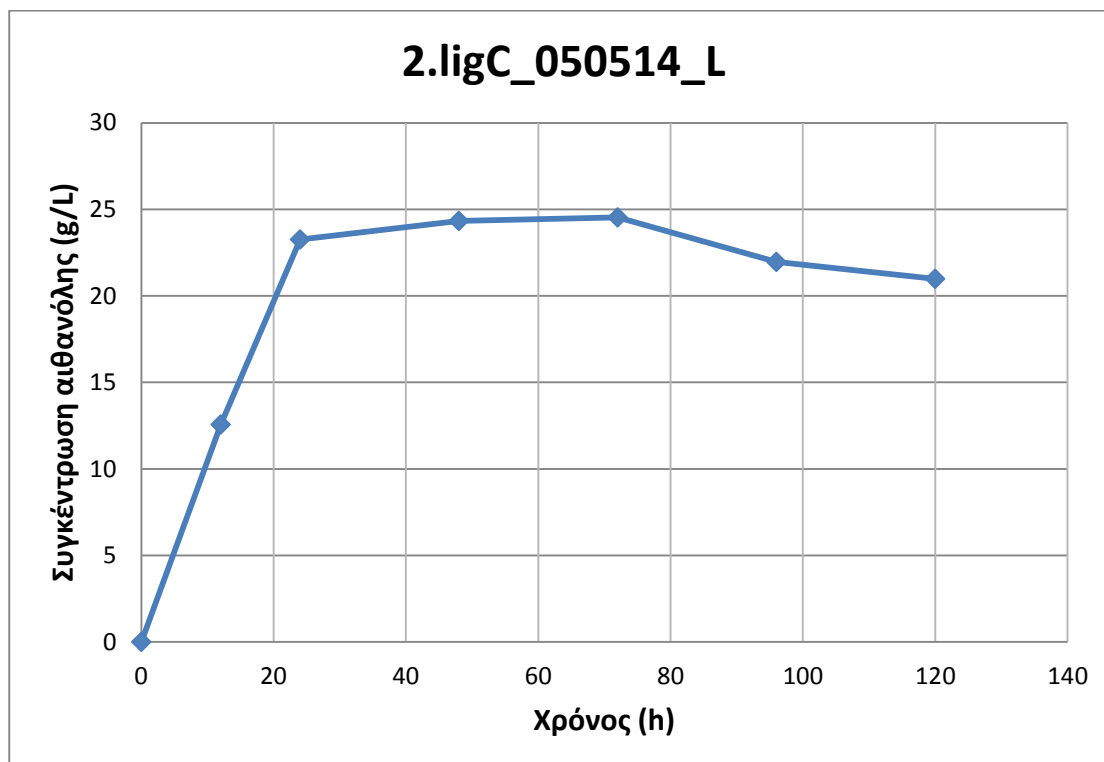
3.3.4. Αξιολόγηση των συνθηκών υγρής οξείδωσης ως προς την παραγωγή βιοαιθανόλης

Αναφορικά με την αξιολόγηση των συνθηκών υγρής οξείδωσης για την παραγωγή βιοαιθανόλης, πραγματοποιήθηκαν πειράματα ζυμώσεων για όλα τα υλικά Lignocel σε συγκέντρωση στερεών 17 % w/v, αφού είχε προηγηθεί ενζυμική υδρόλυση για 24 ώρες στη βέλτιστη ενζυμική συγκέντρωση των 9 mg/g Ξ.Β, όπως υπολογίστηκε προηγουμένως, χρησιμοποιώντας το ένζυμο Cellic[®] CTec2. Η ζύμωση διήρκησε 120 ώρες και ανά τακτά χρονικά διαστήματα, λαμβάνονταν δείγματα για τον προσδιορισμό της αιθανόλης. Σύμφωνα με τις μετρήσεις, κατασκευάζονται τα διαγράμματα που εκθέτονται παρακάτω και παρουσιάζουν τη μεταβολή της συγκέντρωσης της αιθανόλης με το χρόνο, για κάθε υλικό.

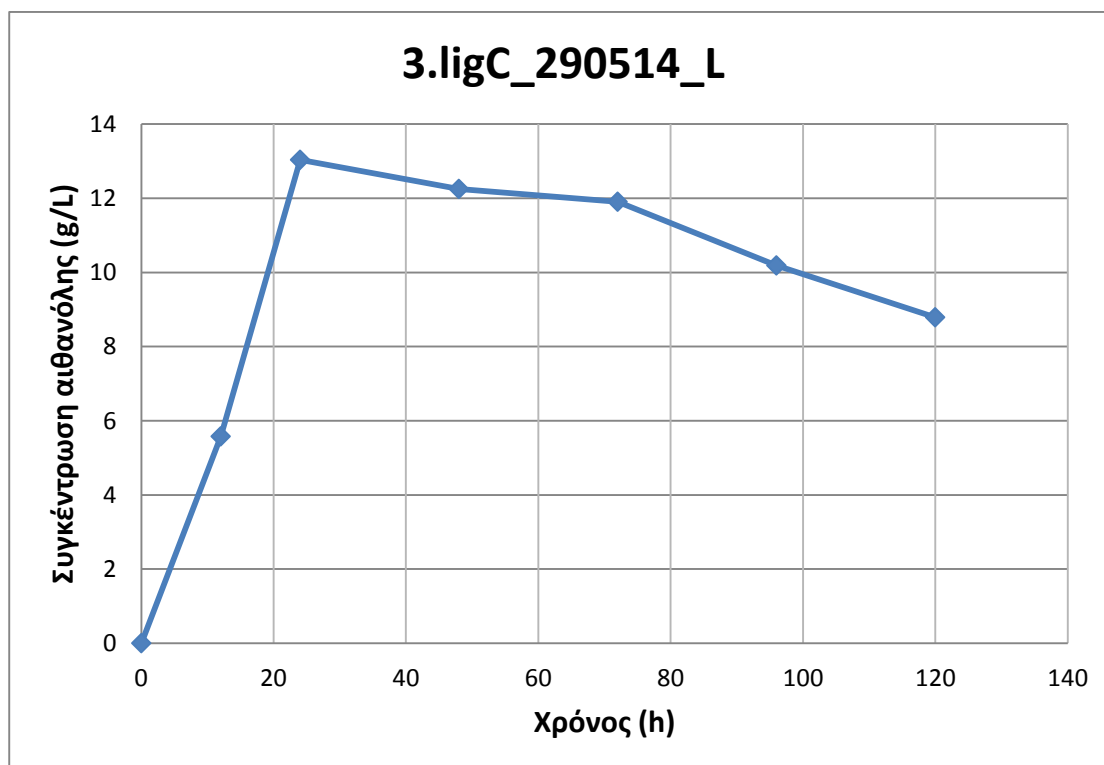
Διάγραμμα 3-29. Μεταβολή της συγκέντρωσης αιθανόλης με το χρόνο για το δείγμα 1 με συγκέντρωση στερεών 17%



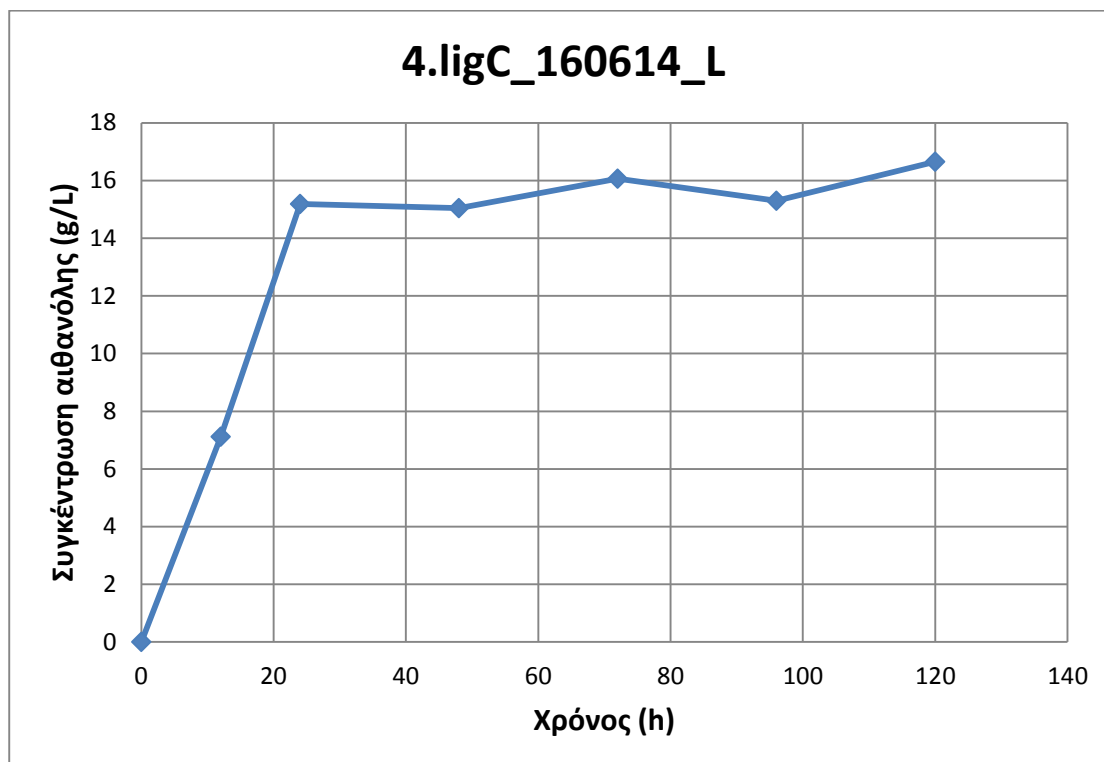
Διάγραμμα 3-30. Μεταβολή της συγκέντρωσης αιθανόλης με το χρόνο για το δείγμα 2 με συγκέντρωση στερεών 17%



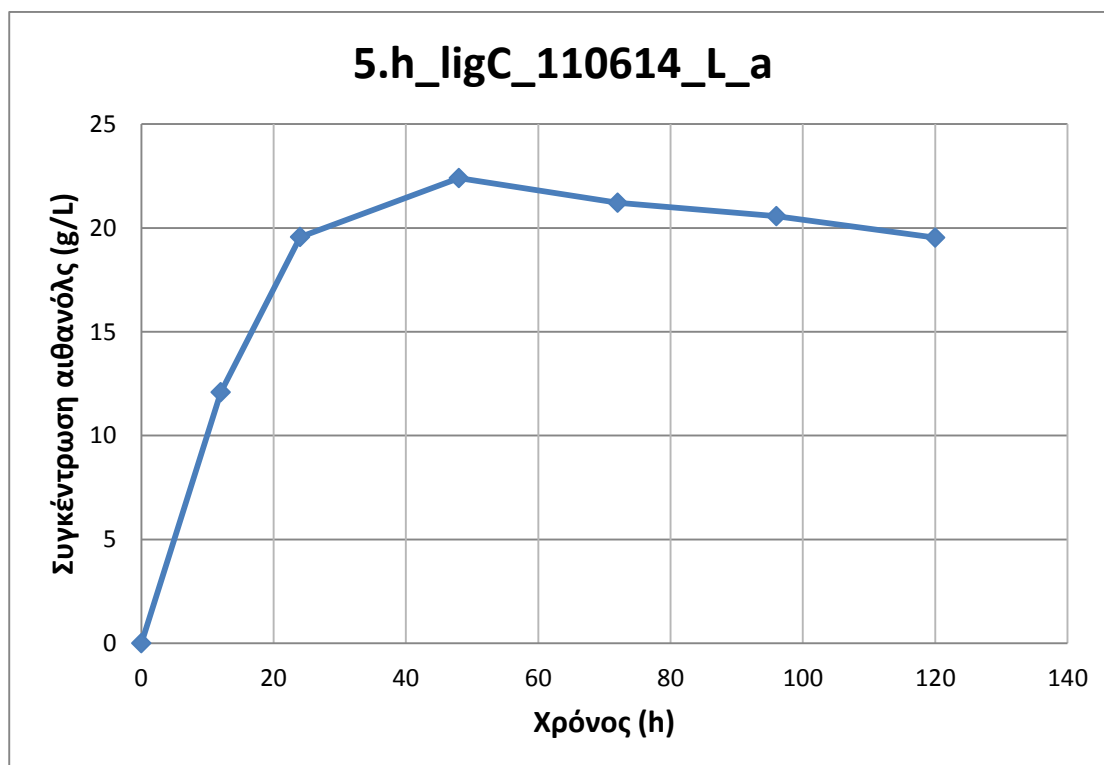
Διάγραμμα 3-31. Μεταβολή της συγκέντρωσης αιθανόλης με το χρόνο για το δείγμα 3 με συγκέντρωση στερεών 17%



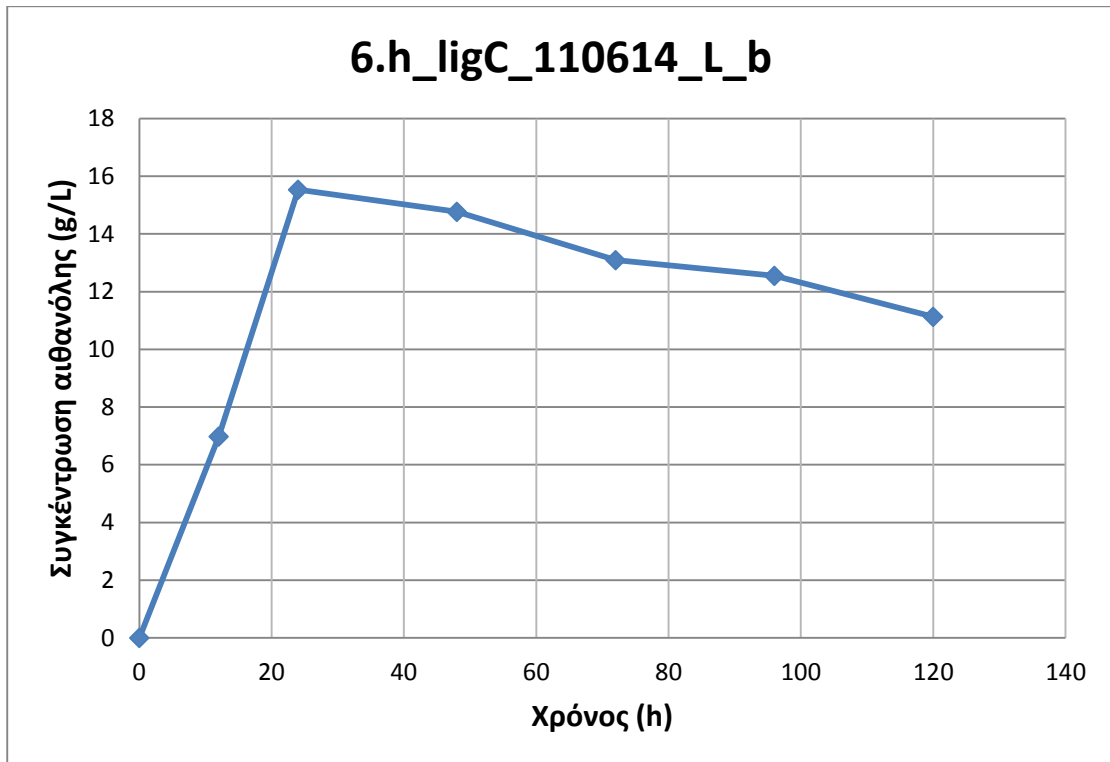
Διάγραμμα 3-32. Μεταβολή της συγκέντρωσης αιθανόλης με το χρόνο για το δείγμα 4 με συγκέντρωση στερεών 17%



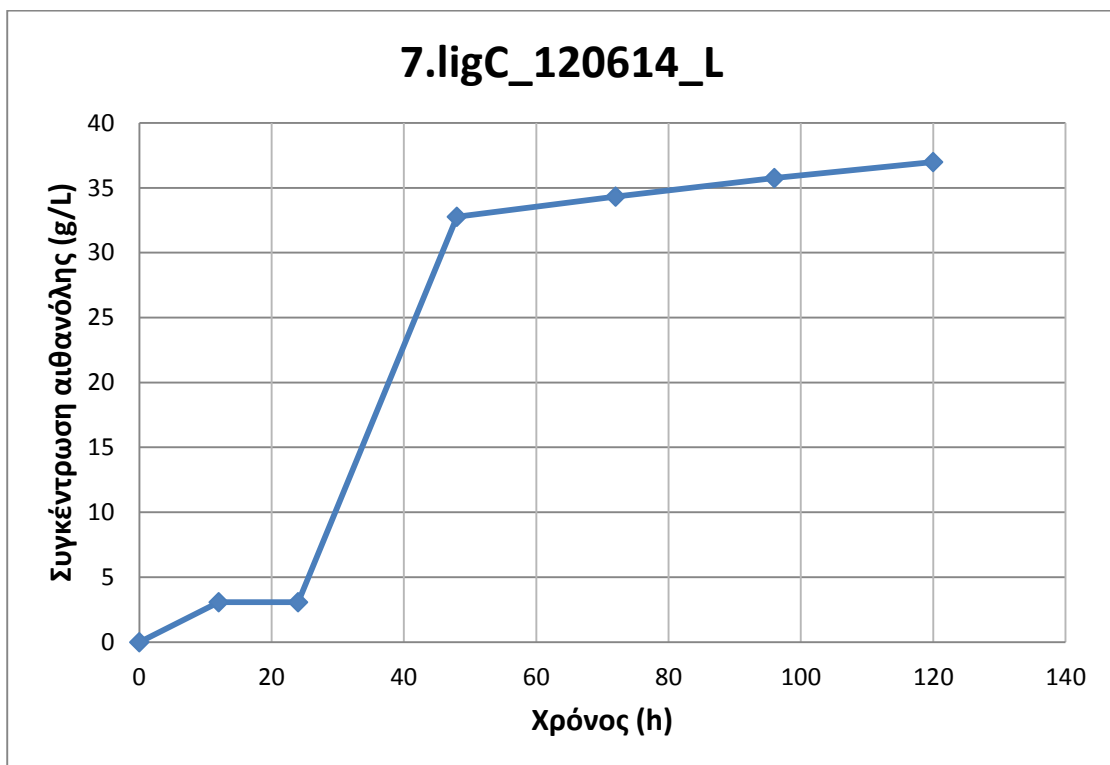
Διάγραμμα 3-33. Μεταβολή της συγκέντρωσης αιθανόλης με το χρόνο για το δείγμα 5 με συγκέντρωση στερεών 17%



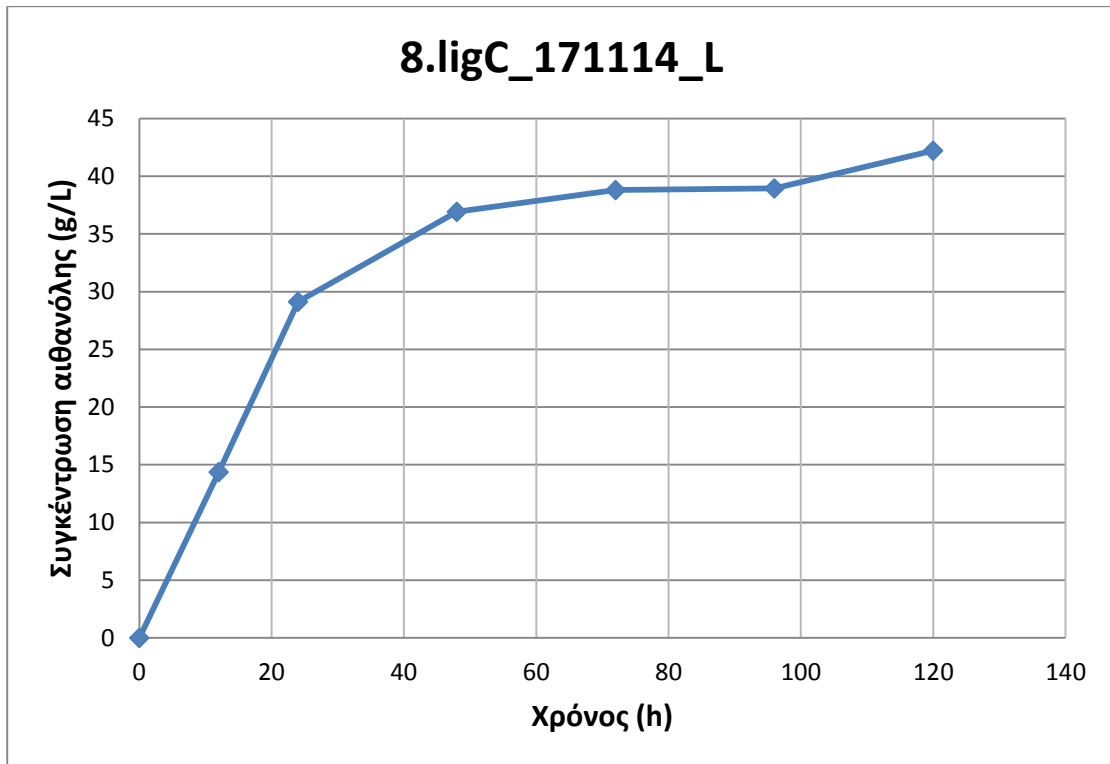
Διάγραμμα 3-34. Μεταβολή της συγκέντρωσης αιθανόλης με το χρόνο για το δείγμα 6 με συγκέντρωση στερεών 17%



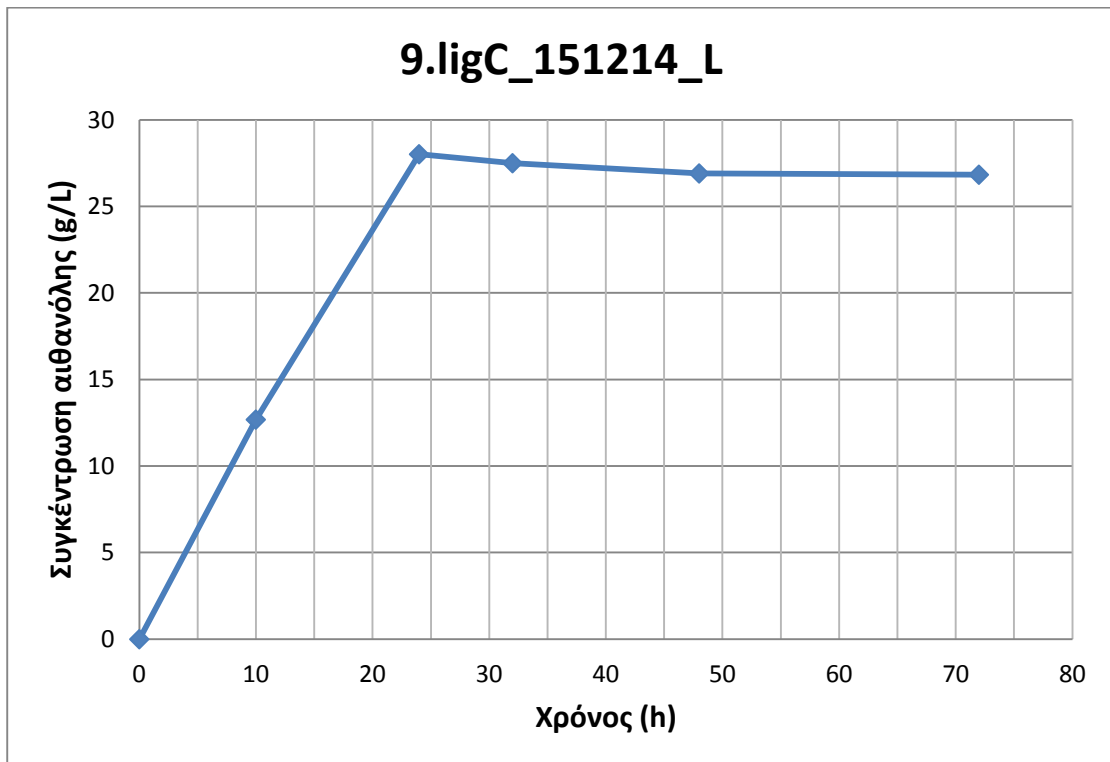
Διάγραμμα 3-35. Μεταβολή της συγκέντρωσης αιθανόλης με το χρόνο για το δείγμα 7 με συγκέντρωση στερεών 17%



Διάγραμμα 3-36. Μεταβολή της συγκέντρωσης αιθανόλης με το χρόνο για το δείγμα 8 με συγκέντρωση στερεών 17%



Διάγραμμα 3-37. Μεταβολή της συγκέντρωσης αιθανόλης με το χρόνο για το δείγμα 9 με συγκέντρωση στερεών 17%



Με βάση τα παραπάνω διαγράμματα μπορούν να εξαχθούν αρκετά συμπεράσματα. Αρχικά, η μέγιστη συγκέντρωση αιθανόλης που επιτυγχάνεται στα δείγματα 2, 3, 5 και 6, κινείται σε χαμηλά επίπεδα, αφού κυμαίνεται από 8,79 g/L (δείγμα 3) έως 20,98 g/L (δείγμα 2) και συνεπώς, δε θεωρούνται κατάλληλα για τη συγκεκριμένη διεργασία. Επιπλέον, τα δείγματα 4 και 9, επιτυγχάνουν γρήγορα τη μέγιστη συγκέντρωση αιθανόλης που μπορούν να παράγουν (περίπου στις 24 ώρες) και στη συνέχεια παραμένουν σταθερά. Παρόλα αυτά, η μέγιστη συγκέντρωση αιθανόλης στην οποία φτάνουν, δεν είναι αρκετή (16,65 g/L για το δείγμα 4 και 26,83 g/L για το δείγμα 9). Τέλος, τα δείγματα 1,7 και 8 επιτυγχάνουν υψηλή συγκέντρωση αιθανόλης με μέγιστα σημεία στα 36,17 g/L, 36,98 g/L και 42,23 g/L αντίστοιχα. Τα τρία αυτά δείγματα απαιτούν μεγαλύτερο χρονικό διάστημα για να φτάσουν στη μέγιστη συγκέντρωση αιθανόλης που παράγουν, περίπου 48 ώρες. Συμπερασματικά, οι συνθήκες επεξεργασίας του υλικού ligC_171114_L, θεωρούνται οι πιο κατάλληλες ως προς την παραγωγή βιοαιθανόλης, για προκατεργασία με υγρή οξείδωση, σε υλικό τύπου Lignocel, το οποίο θα υποβληθεί σε ενζυμική υδρόλυση και ζύμωση καθώς υπό αυτές τις συνθήκες, η ζύμωση του υλικού κατάφερε να ξεπεράσει το όριο του 4% w/w σε συγκέντρωση αιθανόλης στο τελικό προϊόν, γεγονός που αποτελεί απαραίτητη προϋπόθεση για να είναι μια διεργασία παραγωγής αιθανόλης βιώσιμη.

4. ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ

4. ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ

Για τη μελέτη της υδροθερμικής προκατεργασίας σε γεωργικό υπόλειμμα στελεχών αραβοσίτου (CS), πραγματοποιήθηκαν ενζυμικές υδρολύσεις και ζυμώσεις σε ποικίλες συνθήκες. Αρχικά, ερευνάται το βέλτιστο ενζυμικό φορτίο για τέσσερα εμπορικά ενζυμικά σκευάσματα : το ενζυμικό διάλυμα Celluclast[®] 1.5L (κυτταρινάση)- Novozyme[®] 188 (β-γλυκοζιδάση) (κωδικοποίηση HP1) και τα εμπορικά ένζυμα Cellic[®] CTec2 (κωδικοποίηση HP2), Cmax3[™] (κωδικοποίηση HP3) και Accellerase[®]1500 (κωδικοποίηση HP4). Πραγματοποιούνται ενζυμικές υδρολύσεις (με συγκέντρωση στερεών 3% w/v) για κάθε ένα, σε ενζυμικές συγκεντρώσεις 3, 6, 9 και 12 mg/g Ξ.Β και διαπιστώνεται πως και για τα τέσσερα παραπάνω ένζυμα η καταλληλότερη ενζυμική συγκέντρωση για χρήση σε υδρόλυση υδροθερμικά προκατεργασμένου CS είναι τα 9 mg/g Ξ.Β, καθώς αποδίδει τις υψηλότερες συγκεντρώσεις γλυκόζης για κάθε ένζυμο. Στη συνέχεια, γίνεται σύγκριση μεταξύ των κυτταρινολυτικών ενζύμων και διαπιστώνεται πως το ένζυμο Cellic[®] CTec2 σε ενζυμική συγκέντρωση 9 mg/g Ξ.Β, οδηγεί στα πιο ικανοποιητικά αποτελέσματα, έχοντας την υψηλότερη συγκέντρωση γλυκόζης 21,9 g/L μετά την υδρόλυση του CS. Τέλος, πραγματοποιείται ζύμωση ρευστοποιημένου CS σε υψηλή αρχική συγκέντρωση στερεών, της τάξεως του 24%. Η προϋδρόλυση που προηγήθηκε της ζύμωσης ήταν διάρκειας είτε 12 είτε 24 ωρών. Παρατηρήθηκε πως το CS ρευστοποιήθηκε τελείως έπειτα από 12 ώρες κατεργασίας, φτάνοντας σε συγκέντρωση γλυκόζης 84,29 g/L ενώ μετά από 24 ώρες υδρόλυσης οι διαφορές ήταν μικρές (91,03 g γλυκόζης /L). Η υδρόλυση της κυτταρίνης, με βάση τη γλυκόζη, ήταν 50,3 ή 54,3 % μετά από 12 και 24 ώρες ενζυμικής κατεργασίας αντίστοιχα. Έτσι, συμπεραίνεται πως 12 ώρες ρευστοποίησης και σακχαροποίησης είναι επαρκείς για την αποτελεσματική υδρόλυση της κυτταρίνης. Η συγκέντρωση της αιθανόλης ενισχύθηκε με την προσθήκη επιπλέον ενζύμου, στο ξεκίνημα της ζύμωσης κατά 17% και 14% , έπειτα από 12 και 24 ώρες σακχαροποίησης, αντίστοιχα. Με την προσθήκη αυτή, επιτεύχθηκε συγκέντρωση αιθανόλης μεγαλύτερη από το όριο του 4% w/w (41,5 και 41,9 g/L, μετά από 12 και 24 ώρες σακχαροποίησης αντίστοιχα), που αποτελεί βασική απαραίτητη προϋπόθεση για μια βιώσιμη διεργασία παραγωγής αιθανόλης.

Αναφορικά με τη μελέτη της προκατεργασίας απολιγνίνωσης, πραγματοποιήθηκαν ενζυμικές υδρολύσεις και ζυμώσεις, σε δύο υλικά που προέρχονται από υπόλειμμα αραβοσίτου. Το ένα έχει προκατεργαστεί αποκλειστικά με τη μέθοδο της απολιγνίνωσης (A), ενώ το δεύτερο έχει υποβληθεί σε συνδυασμό υδροθερμικής προκατεργασίας και απολιγνίνωσης (B). Ερευνάται λοιπόν η επίδραση του ενζυμικού φορτίου στην υδρόλυση των δύο υλικών και έπειτα από ενζυμικές υδρολύσεις (με συγκέντρωση στερεών 3% w/v) που έγιναν με χρήση του ενζύμου Cellic[®] CTec2 σε ενζυμικές συγκεντρώσεις 3, 6, 9 και 12 mg/g Ξ.B, διαπιστώνεται πως η καταλληλότερη τόσο για το υλικό A όσο και για το B είναι εκείνη των 9 mg/g Ξ.B οδηγώντας σε ικανοποιητικές συγκεντρώσεις γλυκόζης (26 και 29,3 g/L αντίστοιχα για κάθε υλικό). Επιπλέον γίνεται σύγκριση των δύο υλικών ως προς την απελευθέρωση ζυμώσιμων σακχάρων κατά την υδρόλυση και προκύπτει πως το υλικό B παράγει 11% περισσότερη γλυκόζη συγκριτικά με το A. Εν τέλει, πραγματοποιούνται ζυμώσεις των δύο υλικών (με συγκέντρωση στερεών 10% w/v), με και χωρίς προϋδρόλυση και τα αποτελέσματα συγκρίνονται ως προς την παραγωγή αιθανόλης. Προκύπτει πως η προϋδρόλυση του υλικού βελτιώνει αισθητά την παραγωγή αιθανόλης (περίπου 12% στο τέλος της ζύμωσης), ενώ είναι φανερό πως το υλικό B, έχοντας υποστεί προϋδρόλυση εμφανίζει την υψηλότερη συγκέντρωση αιθανόλης με τιμή 22,2 g/L. Συνοπτικά λοιπόν, συμπεραίνεται πως ο συνδυασμός των προκατεργασιών απολιγνίνωσης και υδροθερμικής οδηγεί σε αρκετά υψηλότερη απόδοση ζυμώσιμων σακχάρων αλλά και αιθανόλης και για το λόγο αυτό θεωρείται αποτελεσματικότερος συγκριτικά με την προκατεργασία μόνο με απολιγνίνωση.

Τέλος, πραγματοποιήθηκε μελέτη σε εννέα υλικά τύπου Lignocel, που έχουν υποστεί προκατεργασία υπό διαφορετικές συνθήκες υγρής οξειδωσης. Για τον προσδιορισμό της επίδρασης του ενζυμικού φορτίου στην υδρόλυση προκατεργασμένου Lignocel, πραγματοποιήθηκαν ενζυμικές υδρολύσεις (με συγκέντρωση στερεών 15% w/v) στα τρία υλικά με το υψηλότερο ποσοστό κυτταρίνης, που θεωρούνται αντιπροσωπευτικά του συνόλου, με χρήση του ενζύμου Cellic[®] CTec2 σε συγκεντρώσεις 6, 9 και 12 mg/g Ξ.B. Μετά από σύγκριση των αποτελεσμάτων, προκύπτει πως το βέλτιστο ενζυμικό φορτίο για χρήση σε ενζυμική υδρόλυση Lignocel προκατεργασμένου με υγρή οξειδωση είναι τα 9 mg/g Ξ.B, οδηγώντας σε υψηλές συγκεντρώσεις TRS και γλυκόζης (120,3 και 85,1 g/L αντίστοιχα) για το υλικό ligC_171114_L. Οι συγκεντρώσεις αυτές είναι και οι πιο ικανοποιητικές που επιτυγχάνονται μεταξύ όλων

των υλικών, μετά από ενζυμική τους υδρόλυση με 9 mg/g Cellic® CTec2 και έτσι το υλικό αυτό θεωρείται καταλληλότερο ως προς την απελευθέρωση ζυμώσιμων σακχάρων. Για την αξιολόγηση των εννέα υλικών ως προς την παραγωγή αιθανόλης, πραγματοποιούνται οι ζυμώσεις τους (με συγκέντρωση στερεών 17% w/v) και χρήση του ενζύμου HP2 στο βέλτιστο ενζυμικό φορτίο των 9 mg/g Ξ.Β. Σύμφωνα με τα αποτελέσματα, το υλικό ligC_171114_L παρουσιάζει και πάλι τα καλύτερα αποτελέσματα, έχοντας την υψηλότερη συγκέντρωση αιθανόλης 42,2 g/L. Συνοπτικά λοιπόν, οι συνθήκες επεξεργασίας του υλικού ligC_171114_L (P=40 bar, T=175 °C, σε διάλυμα αραιού H₂O με ακετόνη 50-50%, σε συνθήκες αέρα με 40% O₂), θεωρούνται οι πιο κατάλληλες, τόσο ως προς την παραγωγή ζυμώσιμων σακχάρων όσο και ως προς την παραγωγή βιοαιθανόλης, για προκατεργασία με υγρή οξείδωση, σε λιγνινοκυτταρινούχο υλικό, το οποίο θα υποβληθεί σε ενζυμική υδρόλυση και ζύμωση καθώς υπό αυτές τις συνθήκες, η ζύμωση του υλικού κατάφερε να ξεπεράσει το όριο του 4% w/w σε συγκέντρωση αιθανόλης στο τελικό προϊόν, γεγονός που αποτελεί απαραίτητη προϋπόθεση για τη βιωσιμότητα μιας διεργασίας παραγωγής αιθανόλης.

5. Βιβλιογραφία

Αθανασάκης Α. και Κουσούρης Θ. , 1999, Περιβάλλον και οικολογία στην εκπαίδευση, Εκδόσεις Δαρδάνος, Αθήνα.

Ευρωπαϊκή Επιτροπή, 2003, Επίσημη Εφημερίδα της Ευρωπαϊκής Ένωσης, Οδηγία 2003/30/ΕΚ, L123/42

Φλογαΐτη Ε. , 1993, Περιβαλλοντική Εκπαίδευση, Ελληνικές Πανεπιστημιακές Εκδόσεις, Αθήνα.

Χριστακόπουλος Π. και Τόπακας Ε. , 2013, Βιοτεχνολογία Παραγωγής Βιοκαυσίμων, Αθήνα.

Agbogbo F.K. and Coward-Kelly G., 2008, Cellulosic ethanol production using the naturally occurring xylose-fermenting yeast, *Pichia stipitis*, *Biotechnol. Lett.*, 30 (9), 1515–1524.

Anci, A., Saha, B.C., Kennedy, G.J., Cotta, M.A., 2013. Dilute phosphoric acid pretreatment of corn stover for enzymatic hydrolysis and efficient ethanol production by recombinant *Escherichia coli* FBR5 without detoxification. *Biores Technol.* 142, 312-319

- Balat M., Balat H., Oz C. , 2008, Progress in bioethanol processing, *Progress in Energy and Combustion Science*, 34, 551-573.
- Balat M., 2007, Global bio-fuel processing and production trends, *Energy Explor. Exploit.*, 25, 195–218.
- Berg C., 2004, *World Fuel Ethanol Analysis and Outlook*
- Cardona C.A., Sánchez O.J., 2007, Fuel ethanol production: Process design trends and integration opportunities, *Bioresource Technology*, 98 (12), 2415-2457.
- Chandel A., Chan E.S., Rudravaram R., Narasu M., Rao L., Ravindra P., 2007, Economics and environmental impact of bioethanol production technologies: an appraisal, *Biotechnology and Molecular Biology Reviews*, 2, 014-032.
- Demirbas, 2008, *The Importance of Bioethanol and Biodiesel from Biomass*, *Energy Sources*, Part B: Economics, Planning, and Policy, 3:2, 177-185.
- Demirbas A., 2009, Biofuels securing the planet's future energy needs, *Energy Conversion and Management*, 50(9), 2239-2249.
- Dien B.S., Cotta M.A., Jeffries T.W., 2003, Bacteria engineered for fuel ethanol production: current status, *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 63, 258–66.
- Galbe M. and Zacchi G., 2002, A review of the production of ethanol from softwood, *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 59, 618–628.

Galbe M. and Zacchi G., 2007, Pretreatment of lignocellulosic materials for efficient bioethanol production, *Advances in Biochemical Engineering/ Biotechnology*, 108, 41-65.

Goldemberg J., 2007, Ethanol for Sustainable Energy Future, *Science*, 9, 315, 808-810.

Gray K.A., Zhao L., Emptage M., 2006, *Bioethanol*, Current Opinion in Chemical Biology, 10(2), 141-146.

Hahn-Hägerdal B., Karhumaa K., Fonseca C., Spencer-Martins I., Gorwa-Grauslund M.F., 2007, Towards industrial pentose-fermenting yeast strains, *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 74, 937-953.

Hamelinck C.N., Van Hooijdonk G., Faaij A.P.C., 2005, Ethanol from lignocellulosic biomass: Techno-economic performance in short-, middle- and long-term, *Biomass and Bioenergy*, 28(4), 384-410.

Hayes D.J., 2009, An examination of biorefining processes, catalysts and challenges, *Catalysis Today*, 145(1-2), 138-151.

Holtzapple M., Cognata M., Shu Y. and Hendrickson C., 1990, Inhibition of *Trichoderma reesei* cellulase by sugars and solvents, *Biotechnol. Bioeng.*, 36 (3), 275-287.

Jeffries T.W., Grigoriev I.V., Grimwood J., Laplaza J.M., Aerts A., Salamov A., Schmutz J., Lindquist E., Dehal P., Shapiro H., Jin Y.S., Passoth V., Richardson P.M., 2007, Genome sequence of the lignocellulose-bioconverting and xylose-fermenting yeast *Pichia stipitis*, *Nat. Biotechnol.*, 25(3), 319–326.

Klinke H.B., Thomsen A.B., Ahring B.K., 2001, Potential inhibitors from wet oxidation of wheat straw and their effect on growth and ethanol production by *Thermoanaerobacter mathrani*, *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 57, 631–638.

Kristensen J.B., Börjesson J., Bruun M.H., Tjerneld F., Jørgensen H., 2007, Use of surface active additives in enzymatic hydrolysis of wheat straw lignocelluloses, *Enzyme and Microbial Technology*, 40(4), 888-895.

Kumar R., Singh S., Singh O.V., 2008, Bioconversion of lignocellulosic biomass: Biochemical and molecular perspectives, *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology*, 35 (5), 377-391.

Lachke A., 2002, Biofuel from D -xylose — The second most abundant sugar, *Resonance*, 5, 50-58.

Larsson S., Palmqvist E., Hahn-Hägerdal B., Tengborg C., Stenberg K., Zacchi G., Nilvebrant N.-O., 1999(a), The generation of fermentation inhibitors during dilute acid hydrolysis of softwood, *Enzyme Microbial Technol.*, 24, 151–159.

Larsson S., Reimann A., Nilvebrant N.-O., Jönsson L.J., 1999b, Comparison of different methods for detoxification of lignocellulose hydrolyzates of spruce, *Appl. Biochem. Biotechnol.*, 77–79, 91–103.

Lee J., 1997, Biological conversion of lignocellulosic biomass to ethanol, *Journal of Biotechnology*, 56, 1-24.

Lee S.K., Chou H., Ham T.S., Lee T.S., Keasling J.D., 2008, Metabolic engineering of microorganisms for biofuels production: from bugs to synthetic biology to fuels, *Current Opinion in Biotechnology*, 19(6), 556-563.

Lu, Y., Wang, Y., Xu, G., Chu, J., Zhuang, Y., Zhang, S., 2010. Influence of high solid concentration on enzymatic hydrolysis and fermentation of steam-exploded corn stover biomass. *Appl Biochem Biotechnol.* 160, 360-369.

Miller, G.L., 1959. Use of dinitrosalicylic acid reagent for determination of reducing sugar. *Anal. Chem.* 31, 426–428.

Murray D., 2005, Ethanol's potential: Looking beyond corn, *Eco- Economy Updates*, Earth Policy Institute.

Öhgren, K., Bura, R., Saddler, J., Zacchi, G., 2007. Effect of hemicellulose and lignin removal on enzymatic hydrolysis of steam pretreated corn stover. *Biores. Technol.* 98, 2503-2510

Pan X., Arato C., Gilkes N., Gregg D., Mabee W., Pye K., Xiao Z., Zhang X., Saddler J., 2005, Biorefining of softwoods using ethanol organosolv pulping: Preliminary evaluation of process streams for manufacture of fuel-grade ethanol and co-products, *Biotechnology and Bioengineering*, 90(4), 473-481.

Panagiotou G., Christakopoulos P., Olsson L., 2005a, Simultaneous saccharification and fermentation of cellulose by *Fusarium oxysporum* F3 - Growth characteristics and metabolite profiling, *Enzyme and Microbial Technology*, 36(5-6), 693-699.

Ress W. , 1998, Sustainable Development : Economic Myths and Ecological Realities, *Trumpeter*, (5)

Saha B.C. , 2003, *Hemicellulose bioconversion J. Ind. Microbiol. Biotechnol.* , 30, 279-291.

Saha, B.C., Yoshida, T., Cotta, M.A., Sonomoto, K., 2013. Hydrothermal pretreatment and enzymatic saccharification of corn stover for efficient ethanol production. *Ind Crop Prod.* 44, 367-372.

Sánchez O.J., Cardona C.A., 2008, Trends in biotechnological production of fuel ethanol from different feedstocks, *Bioresource Technology*, 99 (13), 5270-5295.

Saxena R.C., Adhikari D.K., Goyal H.B., 2009, Biomass-based energy fuel through biochemical routes: A review, *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, 13, 167–178.

Sluiter, A., 2005. Determination of structural carbohydrates and lignin biomass. Laboratory Analytical Protocol, National Renewable Energy Laboratory, Golden, CO.

Steele B., Raj S., Nghiem J., Stowers M., 2005, Enzyme recovery and recycling following hydrolysis of ammonia fiber explosion-treated corn stover, *Applied Biochemistry and Biotechnology - Part A, Enzyme Engineering and Biotechnology*, 124(1-3), 901-910.

Sun Y., Cheng J., 2002, *Hydrolysis of lignocellulosic materials for ethanol production: a review*, *Bioresource Technology*, 83, 1-11.

Szijártó N., Horan E., Zhang J., Puranen T., Siika-aho M., Viikari L., 2011, *Thermostable endoglucanases in the liquefaction of hydrothermally pretreated wheat straw*, 22-27

Tomás-Pejó E., Oliva J.M., Ballesteros M., 2008, Realistic approach for full-scale bioethanol production from lignocellulose: A review, *Journal of Scientific and Industrial Research*, 67(11), 874-84.

Tu M., Zhang X., Paice M., MacFarlane P., Saddler J.N., 2009, The potential of enzyme recycling during the hydrolysis of a mixed softwood feedstock, *Bioresource Technology*, Article in Press.

Wan, C., Li, Y., 2010. Microbial pretreatment of corn stover with *Ceriporiopsis subvermispota* for enzymatic hydrolysis and ethanol production. *Biores. Technol.* 101, 6398-6403.

Wheeler K., Janshekar H., Sakuma Y. , 1991, Ethyl alcohol In *Chemical Economics Handbook*, SRI International, USA.

Yourchisin D.M., van Walsum P.G., 2004, Comparison of microbial inhibition and enzymatic hydrolysis rates of liquid and solid fractions produced from pretreatment of biomass with carbonic acid and liquid hot water, *Appl. Biochem. Biotechnol.*, 113-116, 1073– 1086.

Xu, J., Thomsen, M.H., Thomsen, A.B., 2010. Investigation of acetic acid-catalyzed hydrothermal pretreatment on corn stover. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 86, 509-516.

Zaldivar J., Nielsen J., Olsson L., 2001, Fuel ethanol production from lignocellulose: a challenge for metabolic engineering and process integration, *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 56, 17-34.

Zhao, J., Xia, L., 2009. Simultaneous saccharification and fermentation of alkaline-pretreated corn stover to ethanol using a recombinant yeast strain. *Fuel Process Technol.* 90, 1193-1197.

Zu, S., Li, W., Zhang, M., Li, Z., Wang, Z., Jameel, H., Chang, H., 2014. Pretreatment of corn stover for sugar production using dilute hydrochloric acid followed by lime. *Biores Technol.* 152, 364-370