

**Τ.Ε.Ι. ΚΑΛΑΜΑΤΑΣ**  
**ΣΧΟΛΗ ΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑΣ ΓΕΩΠΟΝΙΑΣ**  
**ΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑ ΓΕΩΡΓΙΚΩΝ ΠΡΟΙΟΝΤΩΝ**



**ΠΤΥΧΙΑΚΗ ΕΡΓΑΣΙΑ**  
**ΘΕΜΑ: Μέθοδοι βελτίωσης παραγωγής βιοαιθανόλης από**  
**ζαχαρότευτλα**

**ΣΠΟΥΔΑΣΤΗΣ: ΤΣΙΓΝΟΠΟΥΛΟΣ ΧΡΗΣΤΟΣ**

**ΚΑΛΑΜΑΤΑ**

## ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ

### ΚΕΦΑΛΑΙΟ 1

|                                                                 |  |
|-----------------------------------------------------------------|--|
| <b>1. <u>Καύσιμα – Πηγές ενέργειας</u></b> .....σελ.1           |  |
| 1.1.1 Ιστορικά στοιχεία.....σελ.1                               |  |
| 1.1.2 Ταξινόμηση καυσίμων. ....σελ.2                            |  |
| <b>1.2 <u>Βιοκαύσιμα</u></b> .....σελ.3                         |  |
| 1.2.1 Κατηγορίες βιοκαυσίμων.....σελ.4                          |  |
| 1.2.2 Τα βιοκαύσιμα ως πηγές ενέργειας του μέλλοντος.....σελ.11 |  |
| <b>1.3 <u>Βιοαιθανόλη</u></b> .....σελ.12                       |  |
| 1.3.1 Γενικά.....σελ.12                                         |  |
| 1.3.2 Πηγές παραγωγής βιοαιθανόλης.....σελ.13                   |  |

### ΚΕΦΑΛΑΙΟ 2

|                                                                                         |  |
|-----------------------------------------------------------------------------------------|--|
| <b>2.1 <u>Ζαχαρότευτλα - Διαδικασία παραγωγής μελάσας</u></b> .....σελ.15               |  |
| 2.1.1 Ζαχαρότευτλα .....σελ.15                                                          |  |
| 2.1.2 Διαδικασία παραγωγής μελάσας.....σελ.17                                           |  |
| 2.1.3 Αλκοολική ζύμωση σακχάρων.....σελ.18                                              |  |
| 2.1.4 Παράγοντες που επηρεάζουν την αλκοολική ζύμωση από<br>μικροοργανισμούς.....σελ.20 |  |
| 2.1.4.1 Θερμοκρασία.....σελ.21                                                          |  |
| 2.1.4.2 Συγκέντρωση αιθανόλης.....σελ.22                                                |  |
| 2.1.4.3 Αντοχή σε ανασταλτικές ουσίες.....σελ.22                                        |  |
| 2.1.4.4 Εύρος τιμών πε-χα (pH).....σελ.23                                               |  |
| 2.1.4.5 Ειδικός ρυθμός ανάπτυξης (specific growth rate).....σελ.23                      |  |
| 2.1.4.6 Συγκέντρωση υποστρώματος – Οσμωτική πίεση.....σελ.24                            |  |
| 2.1.4.7 Παρουσία οξυγόνου.....σελ.24                                                    |  |
| 2.1.4.8 Θρεπτικά συστατικά.....σελ.25                                                   |  |
| 2.1.4.9 Βακτηριακές μολύνσεις.....σελ.26                                                |  |
| 2.1.4.10 Άλλα παραπροϊόντα μεταβολισμού.....σελ.26                                      |  |
| 2.1.4.11 Γενετική σταθερότητα.....σελ.27                                                |  |

|         |                                                                       |
|---------|-----------------------------------------------------------------------|
| 2.2     | Οργανισμοί για την παραγωγή βιοαιθανόλης από μελάσα.....σελ.27        |
| 2.2.1   | Ο ζυμομύκητας <i>Saccharomyces cerevisiae</i> .....σελ.27             |
| 2.2.2   | Το βακτήριο <i>Zymomonas mobilis</i> .....σελ.31                      |
| 2.2.3   | Άλλοι μικροοργανισμοί .....σελ.35                                     |
| 2.3     | Μέθοδοι βελτίωσης παραγωγής βιοαιθανόλης από μελάσα.....σελ. 36       |
| 2.3.1   | Γενετικά τροποποιημένοι μικροοργανισμοί.....σελ.36                    |
| 2.3.1.1 | Γενετική βελτίωση του <i>Saccharomyces cerevisiae</i> .....σελ.36     |
| 2.3.1.2 | Γενετική βελτίωση του <i>Zymomonas mobilis</i> .....σελ.37            |
| 2.3.1.3 | Γενετική βελτίωση του βακτηρίου <i>Escherichia coli</i> .....σελ.37   |
| 2.3.1.4 | Γενετική βελτίωση του βακτηρίου <i>Klebsiella oxytoca</i> .....σελ.37 |
| 2.3.2   | Χρήση νέων τεχνολογιών ζύμωσης.....σελ.38                             |
| 2.3.2.1 | Διεργασία διαλείποντος έργου.....σελ.38                               |
| 2.3.2.2 | Διεργασία ημι-διαλείποντος έργου.....σελ.39                           |
| 2.3.2.3 | Διεργασία συνεχούς έργου.....σελ.40                                   |
| 2.3.2.4 | Ακινητοποίηση κυττάρων (cell immobilization).....σελ.41               |
| 2.3.2.5 | Ζύμωση με την τεχνολογία ‘very high gravity’ (VHG)....σελ.42          |

### ΚΕΦΑΛΑΙΟ 3

|     |                                                                                   |
|-----|-----------------------------------------------------------------------------------|
|     | Συμπεράσματα – Συζήτηση – Προοπτικές.....σελ.45                                   |
| 3.1 | Βιοαιθανόλη – Πηγές παραγωγής και προοπτικές.....σελ.45                           |
| 3.2 | Στάδια παραγωγής βιοαιθανόλης.....σελ.46                                          |
| 3.3 | Παραπροϊόντα από τις διεργασίες παραγωγής βιοαιθανόλης –<br>Αξιοποίηση.....σελ.47 |
| 3.4 | Προοπτικές.....σελ.50                                                             |

## **ΚΕΦΑΛΑΙΟ 4**

|                          |               |
|--------------------------|---------------|
| <b>Βιβλιογραφία.....</b> | <b>σελ.52</b> |
|--------------------------|---------------|

## Κεφάλαιο 1ο ΕΙΣΑΓΩΓΗ

### 1.1 Καύσιμα – Πηγές ενέργειας

Ως καύσιμα χαρακτηρίζονται οι ουσίες που απελευθερώνουν ενέργεια κατά μία συμβατική (χημική) ή πυρηνική αντίδραση και η ενέργεια αυτή είναι εκμεταλλεύσιμη, δηλαδή μπορεί να μετατραπεί σε μηχανικό έργο από θερμικές μηχανές.

#### 1.1.1 Ιστορικά στοιχεία

Πριν από περίπου 2 εκατομμύρια χρόνια, ο *Homo erectus* ήταν ο πρώτος που χρησιμοποίησε το ξύλο ως καύσιμο υλικό. Σχεδόν σε όλη την ανθρώπινη ιστορία τα καύσιμα προέρχονταν από φυτά ή ζωικό λίπος, καθώς ήταν διαθέσιμα προς χρήση. Το κάρβουνο, ως παράγωγο του ξύλου, χρησιμοποιήθηκε ήδη από το 6000 π.Χ. για την τήξη των μετάλλων. Αργότερα εκτοπίστηκε από το “coke”, καθώς τα δάση άρχισαν να απεμπλουτίζονται κατά το 18<sup>ο</sup> αιώνα (Leakey R., 1994).

Ο άνθρακας πρωτοχρησιμοποιήθηκε ως καύσιμο στο 10.000 π.Χ. περίπου στην Κίνα. Με την ανάπτυξη της ατμομηχανής το 1769, ο άνθρακας καθιερώθηκε ως πηγή ενέργειας και η χρήση του εξαπλώθηκε. Τον 19<sup>ο</sup> αιώνα, το αέριο που εξαγόταν από τον άνθρακα χρησιμοποιούνταν για τη φωταγωγή των δρόμων του Λονδίνου. Τον 20<sup>ο</sup> αιώνα, η κύρια χρήση του ήταν η παραγωγή ηλεκτρικής ενέργειας, παρέχοντας το 2005 το 40% της παγκόσμιας ηλεκτρικής ενέργειας (World Coal Institute).



Εικόνα 1.1 Κύκλος διοξειδίου του άνθρακα (<http://co2now.org/Current-CO2/CO2-Now/global-carbon-emissions.html>)

Οι άνθρωποι άρχισαν να χρησιμοποιούν τα ορυκτά καύσιμα κατά τη Βιομηχανική Επανάσταση, καθώς ήταν πιο διαθέσιμα από τις καθιερωμένες πηγές, όπως τα έλαια φάλαινας, και η παραγωγή τους ήταν φτηνότερη. Σήμερα, οι σύγχρονες τάσεις κινούνται προς τα ανανεώσιμα καύσιμα, όπως τα βιοκαύσιμα (βλ. §1.1.2 και 1.2).

### **1.1.2 Ταξινόμηση καυσίμων**

Τα καύσιμα μπορούν να ταξινομηθούν σε κατηγορίες με ποικίλα κριτήρια. Ένας κοινός τρόπος ταξινόμησης είναι με βάση το είδος της αντίδρασης που πραγματοποιείται για την απελευθέρωση της αποθηκευμένης ενέργειας. Με βάση το κριτήριο αυτό τα καύσιμα ταξινομούνται σε:

#### **1. Χημικά ή συμβατικά καύσιμα**

Τα χημικά καύσιμα είναι ουσίες που απελευθερώνουν ενέργεια αντιδρώντας με ουσίες του περιβάλλοντός τους, κυρίως μέσω της διαδικασίας της οξείδωσης (οξειδοαναγωγική αντίδραση).

##### **a. Ορυκτά καύσιμα**

Τα ορυκτά καύσιμα είναι υδρογονάνθρακες, κυρίως άνθρακας και πετρέλαιο (υγρό ή φυσικό αέριο), που έχουν σχηματιστεί από απολιθωμένα υπολείμματα αρχαίων φυτών και ζώων έπειτα από έκθεσή τους σε συνθήκες υψηλής θερμοκρασίας και πίεσης, απουσία οξυγόνου, στο φλοιό της Γης για εκατομμύρια χρόνια. Πολλές φορές, στα ορυκτά καύσιμα εντάσσονται και φυσικές πηγές υδρογονανθράκων που δεν έχουν αποκλειστικά βιολογική προέλευση, όπως το πετρέλαιο άμμου. Τα ορυκτά καύσιμα, ανάλογα με τη φυσική τους κατάσταση, διακρίνονται σε:

- i. Στερεά καύσιμα (π.χ. λιγνίτης, λιθάνθρακας, ανθρακίτης)
- ii. Υγρά καύσιμα (π.χ. βενζίνη, κηροζίνη)
- iii. Αέρια καύσιμα (π.χ. υγραέριο, φυσικό αέριο)

##### **b. Βιοκαύσιμα**

Τα βιοκαύσιμα περιλαμβάνουν καύσιμα που περιέχουν ή προέρχονται από βιομάζα. Τα βιοκαύσιμα μπορούν να παραχθούν από οποιαδήποτε πηγή άνθρακα που μπορεί να αναπληρώνεται γρήγορα, π.χ. τα φυτά (για περισσότερες λεπτομέρειες βλ. §1.2).

## **II. Πυρηνικά καύσιμα**

Ως πυρηνικό καύσιμο θεωρείται κάθε υλικό που καταναλώνεται για την εξαγωγή πυρηνικής ενέργειας. Από τεχνικής άποψης αυτός ο ορισμός περιλαμβάνει όλα τα υλικά, επειδή κάθε υλικό, κάτω από κατάλληλες συνθήκες, μπορεί να απελευθερώσει πυρηνική ενέργεια. Παρόλα αυτά, τα μόνα υλικά που αναφέρονται ως πυρηνικά καύσιμα είναι εκείνα που παράγουν πυρηνική ενέργεια χωρίς να εκτεθούν σε ακραίες συνθήκες. Διακρίνονται σε:

### **a. Καύσιμα πυρηνικής διάσπασης**

Τα πιο κοινά πυρηνικά καύσιμα που χρησιμοποιούνται από τον άνθρωπο είναι τα βαρέα σχάσιμα στοιχεία που μπορούν να υποστούν αλυσιδωτές αντιδράσεις πυρηνικής διάσπασης σε έναν πυρηνικό αντιδραστήρα. Τα πιο κοινά καύσιμα πυρηνικής διάσπασης είναι το ουράνιο ( $^{235}\text{U}$ ) και το πλουτώνιο ( $^{239}\text{Pu}$ ) και οι διαδικασίες εξόρυξης, διύλισης, καθαρισμού, χρήσης και τελικής διάθεσης των υλικών αυτών συνθέτουν τον κύκλο των πυρηνικών καυσίμων. Χρησιμοποιούνται στην παραγωγή πυρηνικής ενέργειας και στα πυρηνικά όπλα.

### **b. Καύσιμα πυρηνικής σύντηξης**

Τα καύσιμα που παράγουν ενέργεια μέσω πυρηνικής σύντηξης δεν χρησιμοποιούνται προς το παρόν από τον άνθρωπο, αλλά είναι η κύρια πηγή καυσίμου των άστρων, των πιο ισχυρών ενεργειακών πηγών στη φύση. Τα καύσιμα πυρηνικής σύντηξης προέρχονται από ελαφριά άτομα, όπως το υδρογόνο, που συντήκονται εύκολα (Fewell M.P., 1995).

Τα καύσιμα, επίσης, χρησιμοποιούνται στα κύτταρα οργανισμών κατά τη διαδικασία που καλείται κυτταρική αναπνοή, όπου οργανικά μόρια οξειδώνονται και απελευθερώνουν αξιοποιήσιμη ενέργεια.

## **1.2 Βιοκαύσιμα**

Στα βιοκαύσιμα εντάσσονται τα καύσιμα που προέρχονται από βιολογική δέσμευση του άνθρακα (biological carbon fixation). Διακρίνονται σε (Demirbas, 2009):

- Καύσιμα προερχόμενα από μετατροπή βιομάζας
- Στερεή βιομάζα
- Υγρά καύσιμα
- Βιοαέρια

Παρόλο που τα ορυκτά καύσιμα προέρχονται από αρχαία βιολογική δέσμευση του άνθρακα, δε θεωρούνται βιοκαύσιμα, καθώς περιέχουν άνθρακα που δε συμμετέχει στον κύκλο του άνθρακα εδώ και χιλιάδες χρόνια.

Το 2010 η παγκόσμια παραγωγή βιοκαυσίμων έφτασε τα 105 τρισεκατομμύρια λίτρα, αυξήθηκε δηλαδή 17% σε σχέση με το 2009, και παρείχε το 2.7% των καυσίμων για οδική μεταφορά παγκοσμίως (κυρίως η βιοαιθανόλη και η βιοντίζελ)(Worldwatch Institute). Η παγκόσμια παραγωγή αιθανόλης έφτασε τα 86 τρισεκατομμύρια λίτρα το 2010, με τις ΗΠΑ και τη Βραζιλία να είναι πρωτοπόροι παραγωγοί κατέχοντας το 90% της συνολικής παραγωγής. Ο μεγαλύτερος παραγωγός βιοντίζελ είναι η ΕΕ, συνεισφέροντας κατά 53% στη συνολική παραγωγή βιοντίζελ το 2010 (Worldwatch Institute). Σύμφωνα με τη Διεθνή Υπηρεσία Ενέργειας, τα βιοκαύσιμα μπορούν εν δυνάμει να καλύψουν περισσότερο από το ¼ των παγκόσμιων αναγκών σε καύσιμα κίνησης μέχρι το 2050 (Platts).

Τα περισσότερα καύσιμα κίνησης είναι υγρά, καθώς τα οχήματα απαιτούν υψηλή ενεργειακή πυκνότητα, όπως αυτή που προσφέρουν τα υγρά και τα στερεά. Η πιο ανέξοδη διαδικασία παροχής ενέργειας υψηλής πυκνότητας είναι η χρήση μηχανής εσωτερικής καύσης. Οι μηχανές αυτές απαιτούν καθαρό καύσιμο προκειμένου να διατηρήσουν τη μηχανή καθαρή και να ελαχιστοποιήσουν τη μόλυνση του αέρα. Τέτοια καθαρά καύσιμα είναι συνήθως τα υγρά και τα αέρια. Έτσι τα υγρά ικανοποιούν τις απαιτήσεις της εύκολης μεταφοράς και της καθαρής καύσης.

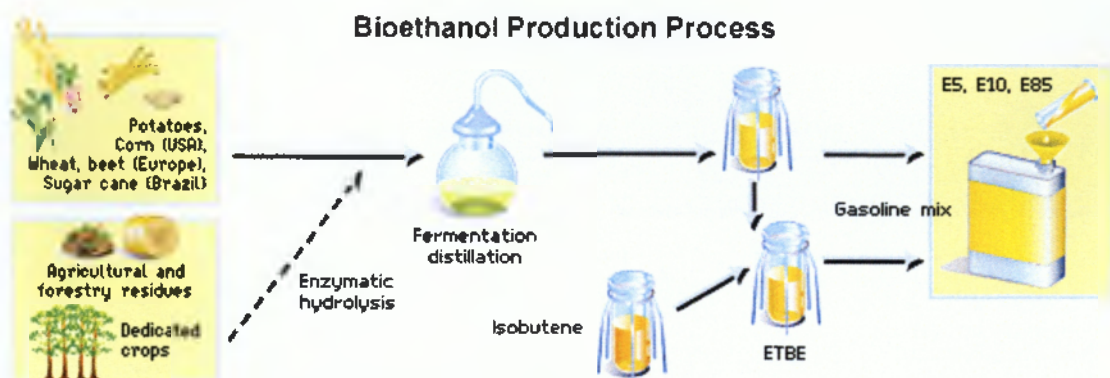
### 1.2.1 Κατηγορίες βιοκαυσίμων

Τα πρώτα βιοκαύσιμα που δημιουργήθηκαν είχαν ως πρώτη ύλη τη ζάχαρη, το άμυλο και τα φυτικά έλαια. Τα βιοκαύσιμα αυτά ονομάστηκαν **“βιοκαύσιμα πρώτης γενιάς”** και περιλαμβάνουν τις εξής κατηγορίες:

#### a) Βιοαλκοόλες

Οι βιολογικά παραγόμενες αλκοόλες, κυρίως η αιθανόλη, και λιγότερο η προπανόλη και η βουτανόλη, παράγονται με τη δράση μικροοργανισμών και ενζύμων μέσω της ζύμωσης σακχάρων και αμύλου (σχετικά εύκολα υποστρώματα), ή κυτταρίνης (δυσκολότερο υπόστρωμα). Τα σάκχαρα προς ζύμωση προέρχονται από σιτάρι, καλαμπόκι, ζαχαρότευτλο, ζαχαροκάλαμο, μελάσα και κάθε σάκχαρο ή προϊόν αμύλου από τα οποία μπορεί να προκύψει αλκοολούχο ποτό (πατάτα, υπολείμματα φρούτων, κ.ά.)(Εικόνα 1.2).

- Η βιοαιθανόλη είναι το πιο κοινό βιοκαύσιμο παγκοσμίως, ιδίως στη Βραζιλία. Οι μέθοδοι παραγωγής αιθανόλης περιλαμβάνουν ενζυμική πέψη (για απελευθέρωση των σακχάρων από τα άμυλα), ζύμωση των σακχάρων, απόσταξη και ξήρανση (βλ. § 1.3).
- Η βουτανόλη ( $C_4H_9OH$ ) σχηματίζεται από ABE ζύμωση (ακετόνη, βουτανόλη, αιθανόλη). Πειραματικές τροποποιήσεις της διαδικασίας δείχνουν υψηλά ενεργειακά οφέλη με τη βουτανόλη ως μοναδικό υγρό προϊόν. Η βιοβουτανόλη (καλείται και βιοβενζίνη) φέρεται να μπορεί να αντικαταστήσει απευθείας τη βενζίνη, καθώς μπορεί να χρησιμοποιηθεί κατευθείαν σε βενζινοκινητήρα, όπως το βιοντίζελ σε κινητήρες ντίζελ. Επίσης, έχουν τροποποιήσει το μεταβολισμό αμινοξέων της *Escherichia coli* με Γενετική Μηχανική για να παράγει βιοβουτανόλη (Evans, 2008).
- Η μεθανόλη μέχρι σήμερα παράγεται από το φυσικό αέριο, ένα μη-ανανεώσιμο ορυκτό καύσιμο. Μπορεί όμως να παραχθεί και από βιομάζα ως βιομεθανόλη. Η οικονομία της μεθανόλης είναι εναλλακτική της οικονομίας του υδρογόνου.



**Εικόνα 1.2** Διαδικασία παραγωγής βιοαιθανόλης (<http://wardsauto.com/news-and-analysis/global-auto-makers-crossroads-biofuels-world>)

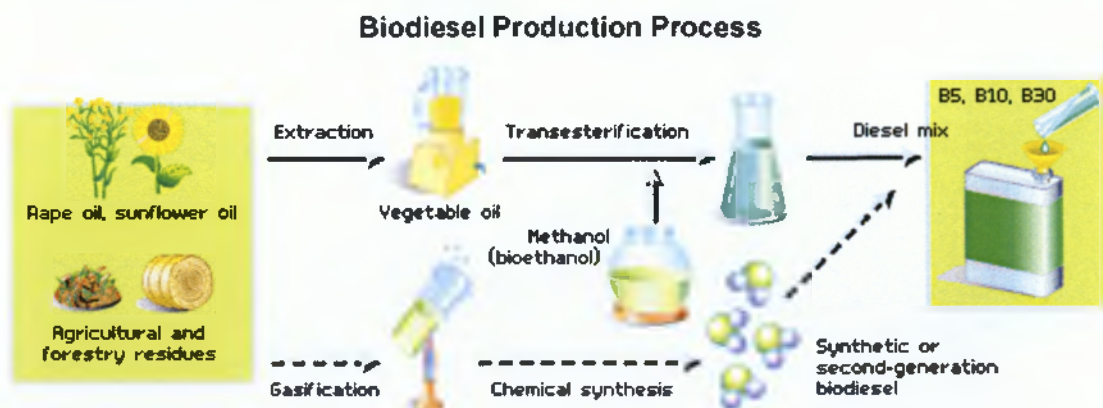
#### b) Βιοντίζελ

Η βιοντίζελ είναι το πιο κοινό βιοκαύσιμο στην Ευρώπη. Παράγεται από έλαια ή λίπη χρησιμοποιώντας trans-εστεροποίηση και είναι υγρό παρόμοιας χημικής σύστασης με την ορυκτή ντίζελ. Χημικά, αποτελείται κυρίως από μεθυλ- ή αιθυλ-εστέρες λιπαρών οξέων. Οι πρώτες ύλες για τη βιοντίζελ περιλαμβάνονται ζωικά λίπη, φυτικά έλαια, σόγια, ελαιοκράμβη, λινάρι,

ηλιοτρόπιο, φοινικέλαιο και φύκη (Εικόνα 1.3). Τα πλεονεκτήματα που προσφέρει είναι τα εξής:

- Μπορεί να χρησιμοποιηθεί σε κάθε βενζινοκινητήρα, όταν αναμειχθεί με ορυκτή ντίζελ.
- Η καθαρή βιοντίζελ (B100) είναι η ντίζελ με τις μικρότερες εκπομπές.
- Περιέχει μειωμένη ποσότητα άνθρακα και υψηλότερη υδρογόνου και οξυγόνου από την ορυκτή ντίζελ. Το γεγονός αυτό βελτιώνει την καύση της βιοντίζελ και μειώνει τις εκπομπές σωματιδίων από τον άκαυστο άνθρακα.
- Είναι ασφαλής στο χειρισμό και τη μετακίνηση, καθώς είναι τόσο βιοδιασπώμενη όσο και η ζάχαρη, 10 φορές λιγότερο τοξική από το επιτραπέζιο αλάτι και έχει υψηλό σημείο ανάφλεξης (148 °C) σε σχέση με την ορυκτή βενζίνη (52 °C) (Hempcar.org)

Στις ΗΠΑ, περισσότερα από το 80% των αστικών λεωφορείων και των φορτηγών χρησιμοποιούν ντίζελ. Η αναδυόμενη αγορά της αμερικάνικης βιοντίζελ παρουσίασε αύξηση 200% από το 2004 στο 2005 και τα επόμενα χρόνια η ανάγκη θα γίνεται επιτακτικότερη.



**Εικόνα 1.3** Διαδικασία παραγωγής βιοντίζελ (<http://wardsauto.com/news-and-analysis/global-auto-makers-crossroads-biofuels-world>)

### c) Πράσινη ντίζελ

Η πράσινη ντίζελ, γνωστή και ως ανανεώσιμη ντίζελ, είναι μια μορφή καύσιμης ντίζελ που προέρχεται από ανανεώσιμες πρώτες ύλες και όχι από ορυκτές πρώτες ύλες όπως στα περισσότερα καύσιμα ντίζελ. Οι πρώτες ύλες για την παραγωγή της προέρχονται από μία ποικιλία ελαίων συμπεριλαμβανομένων της Canola, των φυκών, της Jatropha και της Salicornia και λιπών. Χρησιμοποιεί κλασική κλασματική απόσταξη για την

επεξεργασία των ελαίων, αντίθετα με τη βιοντίζελ που χρησιμοποιεί trans-εστεροποίηση. Η πράσινη ντίζελ είναι ιδιαίτερα διαδεδομένη στην Ιρλανδία.

#### **d) Φυτικά έλαια**

Τα βρώσιμα φυτικά έλαια χωρίς τροποποιήσεις γενικά δε χρησιμοποιούνται ως καύσιμα, αλλά προτιμώνται άλλα χαμηλότερης ποιότητας. Όλο και περισσότερο αξιοποιούνται τα χρησιμοποιημένα φυτικά έλαια στην παραγωγή βιοντίζελ, κατόπιν επεξεργασίας, ή (σπανιότερα) μετά από απλή αφαίρεση του νερού και των σωματιδίων, και χρησιμοποιούνται ως καύσιμα. Τα καύσιμα αυτά είναι συμβατά με τις περισσότερες παλιές μηχανές ντίζελ, χωρίς να χρειάζονται μετατροπή.

Η διαδικασία επεξεργασίας περιλαμβάνει τα εξής στάδια: Αρχικά τα έλαια και τα λίπη μετατρέπονται σε υδρογονωμένα δίνοντας ένα υποκατάστατο της ντίζελ. Το προϊόν αυτό είναι μια ευθεία αλυσίδα υδρογονάνθρακα με υψηλό αριθμό κετανίου, με χαμηλή περιεκτικότητα σε αρωματικά και ομάδες θείου και χωρίς καθόλου οξυγόνο. Τα υδρογονωμένα έλαια μπορούν να αναμειχθούν με την ντίζελ σε όλες τις αναλογίες. Έχουν πολλά πλεονεκτήματα εν συγκρίσει με τη βιοντίζελ, συμπεριλαμβανομένης της καλής απόδοσης σε χαμηλές θερμοκρασίες, την έλλειψη προβλημάτων αστάθειας κατά την αποθήκευση και την απουσία ευαισθησίας σε προσβολή μικροβίων (Evans, NNFCC).

#### **e) Βιοαιθέρες**

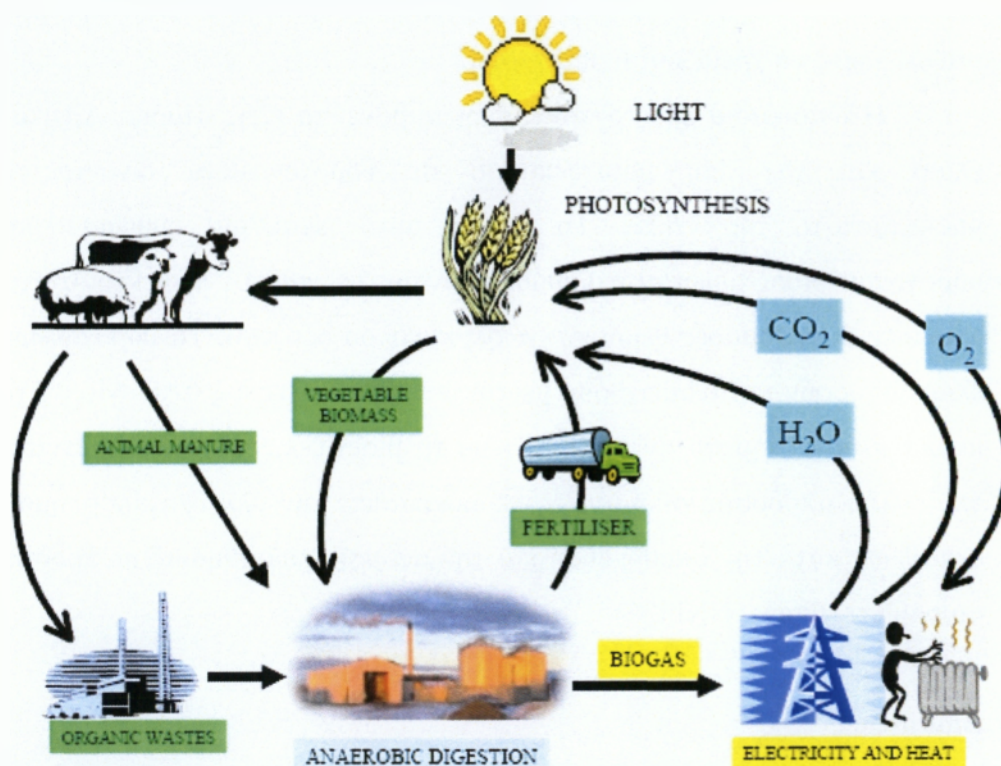
Οι βιοαιθέρες, επίσης αποκαλούμενοι και αιθέρες καυσίμων ή οξυγονωμένα καύσιμα, είναι αποδοτικές ενώσεις που δρουν ως ενισχυτές οκτανίων. Επίσης, ενισχύουν την απόδοση της μηχανής, καθώς μειώνουν σημαντικά τη φθορά του κινητήρα και τις τοξικές εκπομπές καυσαερίων. Τέλος, συνεισφέρουν στην ποιότητα του αέρα που αναπνέουμε μειώνοντας σε μεγάλο βαθμό τη συγκέντρωση του όζοντος στο επίπεδο του εδάφους (EU, Impact assessment, 2007).

#### **f) Βιοαέριο**

Το βιοαέριο είναι μεθάνιο παραγόμενο από τη διαδικασία αναερόβιας χώνεψης οργανικών υλικών από αναερόβιους μικροοργανισμούς (Redman,

2008). Παράγεται είτε από βιοαποικοδομήσιμα απόβλητα υλικά, είτε με τη χρήση ενεργειακών καλλιεργειών για συμπληρωματική απόδοση του φυσικού αερίου. Το στερεό παραπροϊόν, αφού ζυμωθεί, μπορεί να χρησιμοποιηθεί ως βιοκαύσιμο ή ως λίπασμα (Εικόνα 1.4).

Οι αγρότες μπορούν να παράγουν βιοαέριο από την κοπριά των αγελάδων τους. Επίσης, το βιοαέριο μπορεί να ανακτηθεί από μηχανικά συστήματα επεξεργασίας βιολογικών αποβλήτων. Να σημειωθεί εδώ ότι το βιοαέριο που παράγεται σε χώρους υγειονομικής ταφής από βιολογική χώνεψη είναι χαμηλότερης καθαρότητας.



Εικόνα 1.4 Κύκλος παραγωγής και χρήσης βιοαερίου.

(<http://agroindustriindonesia.blogspot.com/2011/01/development-of-biogas-as-potential-of.html>)

#### g) Βιοαέριο τύπου Syngas

Το βιοαέριο τύπου Syngas είναι ένα μείγμα μονοξειδίου του άνθρακα, υδρογόνου και υδρογονανθράκων παραγόμενο από τη μερική καύση βιομάζας, δηλαδή καύση υπό ανεπαρκή ποσότητα οξυγόνου. Πριν από την καύση, η βιομάζα ξηραίνεται και μερικές φορές πυρολύεται. Το μίγμα αερίων που προκύπτει, το syngas, είναι πιο αποδοτικό από την καύση του

επεξεργασία των ελαίων, αντίθετα με τη βιοντίζελ που χρησιμοποιεί trans-εστεροποίηση. Η πράσινη ντίζελ είναι ιδιαίτερα διαδεδομένη στην Ιρλανδία.

#### **d) Φυτικά έλαια**

Τα βρώσιμα φυτικά έλαια χωρίς τροποποιήσεις γενικά δε χρησιμοποιούνται ως καύσιμα, αλλά προτιμώνται άλλα χαμηλότερης ποιότητας. Όλο και περισσότερο αξιοποιούνται τα χρησιμοποιημένα φυτικά έλαια στην παραγωγή βιοντίζελ, κατόπιν επεξεργασίας, ή (σπανιότερα) μετά από απλή αφαίρεση του νερού και των σωματιδίων, και χρησιμοποιούνται ως καύσιμα. Τα καύσιμα αυτά είναι συμβατά με τις περισσότερες παλιές μηχανές ντίζελ, χωρίς να χρειάζονται μετατροπή.

Η διαδικασία επεξεργασίας περιλαμβάνει τα εξής στάδια: Αρχικά τα έλαια και τα λίπη μετατρέπονται σε υδρογονωμένα δίνοντας ένα υποκατάστατο της ντίζελ. Το προϊόν αυτό είναι μια ευθεία αλυσίδα υδρογονάνθρακα με υψηλό αριθμό κετανίου, με χαμηλή περιεκτικότητα σε αρωματικά και ομάδες θείου και χωρίς καθόλου οξυγόνο. Τα υδρογονωμένα έλαια μπορούν να αναμειχθούν με την ντίζελ σε όλες τις αναλογίες. Έχουν πολλά πλεονεκτήματα εν συγκρίσει με τη βιοντίζελ, συμπεριλαμβανομένης της καλής απόδοσης σε χαμηλές θερμοκρασίες, την έλλειψη προβλημάτων αστάθειας κατά την αποθήκευση και την απουσία ευαισθησίας σε προσβολή μικροβίων (Evans, NNFCC).

#### **e) Βιοαιθέρες**

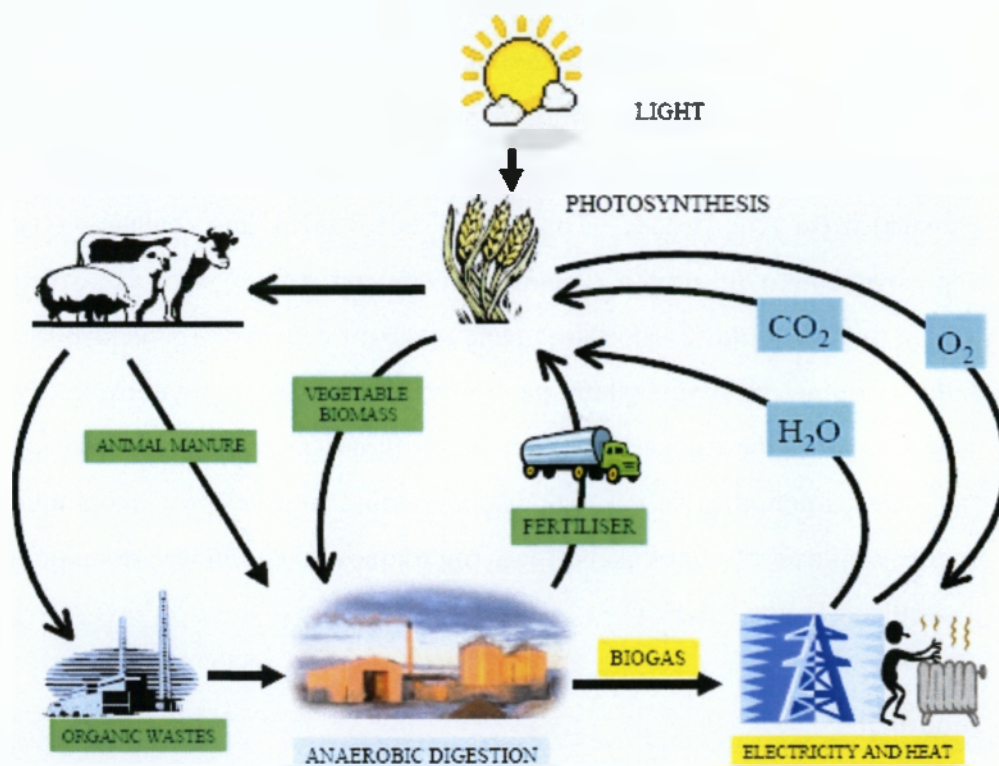
Οι βιοαιθέρες, επίσης αποκαλούμενοι και αιθέρες καυσίμων ή οξυγονωμένα καύσιμα, είναι αποδοτικές ενώσεις που δρουν ως ενισχυτές οκτανίων. Επίσης, ενισχύουν την απόδοση της μηχανής, καθώς μειώνουν σημαντικά τη φθορά του κινητήρα και τις τοξικές εκπομπές καυσαερίων. Τέλος, συνεισφέρουν στην ποιότητα του αέρα που αναπνέουμε μειώνοντας σε μεγάλο βαθμό τη συγκέντρωση του όζοντος στο επίπεδο του εδάφους (EU, Impact assessment, 2007).

#### **f) Βιοαέριο**

Το βιοαέριο είναι μεθάνιο παραγόμενο από τη διαδικασία αναερόβιας χώνευσης οργανικών υλικών από αναερόβιους μικροοργανισμούς (Redman,

2008). Παράγεται είτε από βιοαποικοδομήσιμα απόβλητα υλικά, είτε με τη χρήση ενεργειακών καλλιεργειών για συμπληρωματική απόδοση του φυσικού αερίου. Το στερεό παραπροϊόν, αφού ζυμωθεί, μπορεί να χρησιμοποιηθεί ως βιοκαύσιμο ή ως λίπασμα (Εικόνα 1.4).

Οι αγρότες μπορούν να παράγουν βιοαέριο από την κοπριά των αγελάδων τους. Επίσης, το βιοαέριο μπορεί να ανακτηθεί από μηχανικά συστήματα επεξεργασίας βιολογικών αποβλήτων. Να σημειωθεί εδώ ότι το βιοαέριο που παράγεται σε χώρους υγειονομικής ταφής από βιολογική χώνεψη είναι χαμηλότερης καθαρότητας.



Εικόνα 1.4 Κύκλος παραγωγής και χρήσης βιοαερίου.

(<http://agroindustriindonesia.blogspot.com/2011/01/development-of-biogas-as-potential-of.html>)

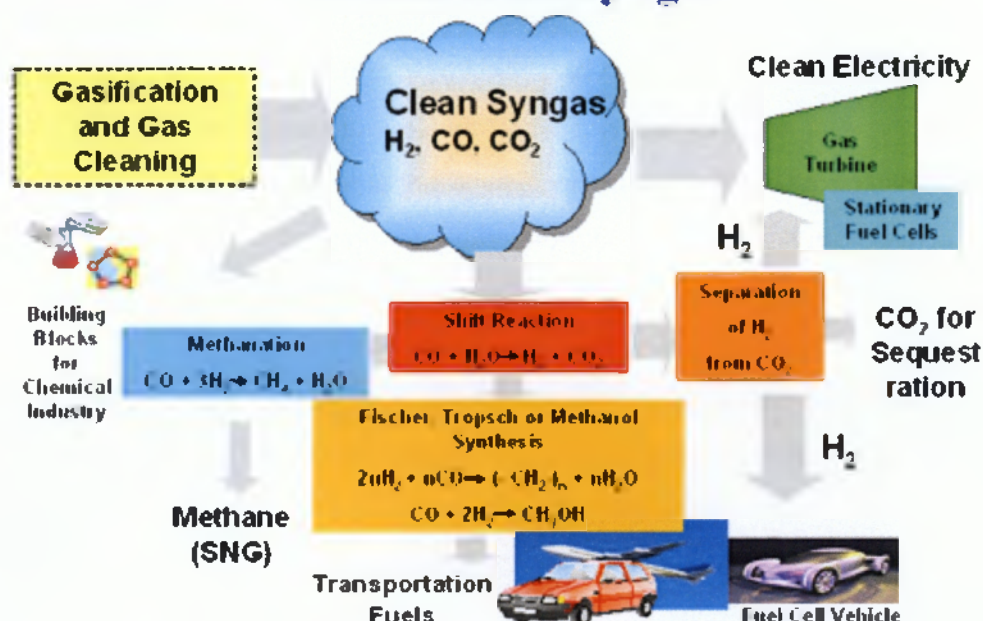
#### g) Βιοαέριο τύπου Syngas

Το βιοαέριο τύπο Syngas είναι ένα μείγμα μονοξειδίου του άνθρακα, υδρογόνου και υδρογονανθράκων παραγόμενο από τη μερική καύση βιομάζας, δηλαδή καύση υπό ανεπαρκή ποσότητα οξυγόνου. Πριν από την καύση, η βιομάζα ξηραίνεται και μερικές φορές πυρολύεται. Το μίγμα αερίων που προκύπτει, το syngas, είναι πιο αποδοτικό από την καύση του

πραγματικού βιοκαυσίμου και τα πλεονεκτήματά του είναι τα εξής (Εικόνα 1.5):

- Μπορεί να καεί απευθείας σε μηχανές εσωτερικής καύσης, τουρμπίνες, ή κυψέλες καυσίμου υψηλής θερμοκρασίας.
- Μπορεί να χρησιμοποιηθεί στην παραγωγή μεθανόλης, DME και υδρογόνου, ή να μετατραπεί σε υποκατάστατο της ντίζελ ή βενζίνη μέσω της διαδικασίας Fischer-Tropsch (αεριοποίηση σε θερμοκρασία  $>700^{\circ}\text{C}$ ).

## Products from Syngas



**Εικόνα 1.5** Προϊόντα από την επεξεργασία του αερίου τύπου syngas ([http://www.nctl.doe.gov/technologies/hydrogen\\_clean\\_fuels/hydrogen\\_rd.html](http://www.nctl.doe.gov/technologies/hydrogen_clean_fuels/hydrogen_rd.html)).

### h) Στερεά βιοκαύσιμα

Προέρχονται από υποστρώματα όπως ξύλο, πριονίδι, γρασίδι, οικιακά απόβλητα, κάρβουνο, γεωργικά απόβλητα (πλην των τροφίμων), ενεργειακές καλλιέργειες, καθώς και αποξηραμένη κοπριά. Όταν η ακατέργαστη βιομάζα είναι σε κατάλληλη μορφή (π.χ. καυσόξυλα) μπορεί να καεί απευθείας για την παραγωγή θερμότητας ή ατμού. Αντίθετα, στην ακατέργαστη βιομάζα σε ακατάλληλη μορφή (π.χ. πριονίδια, ροκανίδια, γρασίδι, αστικά απόβλητα ξύλου, γεωργικά υπολείμματα) προηγείται διαδικασία εμπλουτισμού της. Η διαδικασία αυτή περιλαμβάνει διαμερισματοποίηση της ακατέργαστης βιομάζας σε σωματίδια μεγέθους 1-3 cm και συμπύκνωση σε καύσιμο προϊόν.

Το προϊόν αυτό μεταφέρεται εύκολα και δίδεται σε συστήματα παραγωγής θερμότητας, όπως οι λέβητες.

Ένα παράγωγο των στερεών βιοκαυσίμων είναι το βιοκάρβουνο, το οποίο παράγεται από την πυρόλυση της βιομάζας. Το βιοκάρβουνο που παράγεται από γεωργικά απόβλητα μπορεί να υποκαταστήσει τον ξυλάνθρακα. Καθώς τα αποθέματα ξύλου μειώνονται, η εναλλακτική αυτή κερδίζει έδαφος. Για παράδειγμα, στη Λαϊκή Δημοκρατία του Κονγκό, οι ράβδοι βιομάζας (biomass briquettes) διατίθενται στην αγορά ως μια εναλλακτική λύση για το κάρβουνο, προκειμένου να προστατευτεί το Εθνικό Πάρκο Virunga από αποψίλωση των δασών του προς παραγωγή άνθρακα.

Ένα από τα πλεονεκτήματα των καυσίμων στερεής βιομάζας είναι ότι συχνά αποτελούν παραπροϊόν άλλων διαδικασιών, όπως της γεωργίας, της κτηνοτροφίας και της δασοκομίας. Θεωρητικά, λοιπόν, δεν υπάρχει ανταγωνισμός για παραγωγή τροφίμων ή καυσίμου, αλλά αυτό δεν ισχύει πάντα.

Ένα πρόβλημα που απαντάται κατά την καύση ακατέργαστης βιομάζας είναι η απελευθέρωση υψηλών ποσοτήτων ρυπαντών, όπως τα σωματίδια και οι πολυκυκλικοί αρωματικοί υδρογονάνθρακες (PAHs). Ακόμη και οι σύγχρονοι λέβητες δισκίων (pellet boilers) παράγουν πολλούς περισσότερους ρύπους από τους λέβητες ελαίου ή φυσικού αερίου. Τα δισκία από γεωργικά κατάλοιπα είναι χειρότερα από τα ξύλινα, παράγοντας περισσότερες εκπομπές διοξινών και χλωροφαινολών (Briens *et al.*, 2008). Αντίθετα με την παραπάνω μελέτη, πολλές έρευνες έχουν δείξει ότι τα καύσιμα από βιομάζα έχουν σημαντικά μικρότερη επίδραση στο περιβάλλον σε σχέση με τα ορυκτά καύσιμα.

### **Βιοκαύσιμα Δεύτερης Γενιάς**

Τα βιοκαύσιμα δεύτερης γενιάς είναι βιοκαύσιμα που παράγονται από ζώσα πρώτη ύλη. Πολλά βιοκαύσιμα δεύτερης γενιάς βρίσκονται υπό ανάπτυξη όπως η κυτταρική αιθανόλη, το καύσιμο από φύκη, το βιοϋδρογόνο, η βιομεθανόλη, το διμεθυλο-φορμαμίδιο (DMF), ο βιο-μεθυλ-αιθέρας (BioDME) και οι ντίζελ από βιοϋδρογόνο, ξύλο ή των Fischer-Tropsch.

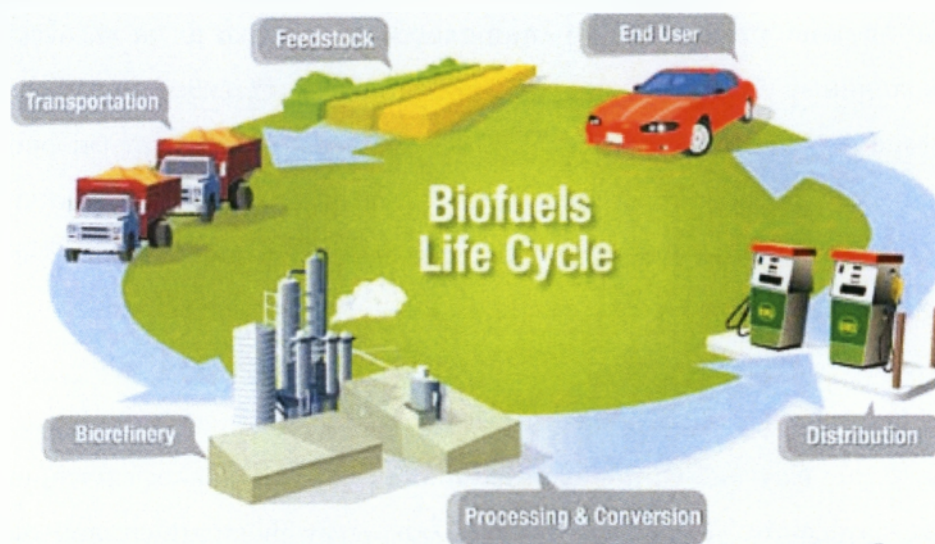
### 1.2.2 Τα βιοκαύσιμα ως πηγές ενέργειας του μέλλοντος

Πολλά θέματα κοινωνικής, οικονομικής και περιβαλλοντικής φύσης που σχετίζονται με την παραγωγή και τη χρήση βιοκαυσίμων έχουν συζητηθεί στα Μέσα Μαζικής Ενημέρωσης, αλλά και σε έγκριτα επιστημονικά περιοδικά. Τέτοια θέματα περιλαμβάνουν: την επίδραση του μετριασμού των τιμών του πετρελαίου, τη διαμάχη “τροφή ή καύσιμο”, τις δυνατότητες μείωσης της φτώχειας, τα επίπεδα εκπομπών διοξειδίου, την αειφόρο παραγωγή βιοκαυσίμων, την αποψίλωση των δασών και τη διάβρωση του εδάφους, την απώλεια βιοποικιλότητας, τις επιπτώσεις στους υδάτινους πόρους καθώς και το ενεργειακό ισοζύγιο. Στην πρώτη αναφορά της Διεθνούς Επιτροπής Πόρων για τα βιοκαύσιμα περιγράφονται οι παράγοντες που πρέπει να ληφθούν υπόψη κατά τη λήψη αποφάσεων σχετικά με τα πλεονεκτήματα ενός βιοκαυσίμων έναντι σε ένα άλλο (IRP, 2009). Η έκθεση καταλήγει στο συμπέρασμα ότι δεν αποδίδουν όλα τα βιοκαύσιμα αναλογικά με την επίδρασή τους στο κλίμα, την ενεργειακή ασφάλεια και τα οικοσυστήματα, και προτείνει ότι περιβαλλοντικοί και κοινωνικοί παράγοντες πρέπει να εκτιμηθούν για όλους τους κύκλους ζωής.

Παρότι υπάρχουν πολλά θέματα για την παραγωγή και τη χρήση βιοκαυσίμων, η ανάπτυξη νέων καλλιεργειών βιοκαυσίμων και βιοκαυσίμων δεύτερης γενιάς επιχειρεί να παρακάμψει αυτά τα θέματα. Πολλοί επιστήμονες και ερευνητές εργάζονται για την ανάπτυξη καλλιεργειών βιοκαυσίμων που απαιτούν λιγότερη έκταση και χρησιμοποιούν λιγότερους πόρους (π.χ. νερό) από τις τωρινές καλλιέργειες. Ορισμένοι υποστηρίζουν ότι τα φύκη αποτελούν πηγή βιοκαυσίμων που μπορούν να αξιοποιήσουν μη αξιοποιήσιμη αυτή τη στιγμή έκταση και λύματα από διάφορες βιομηχανίες. Τα φύκη είναι ικανά να αναπτυχθούν σε λύματα, αφήνοντας ανεπηρέαστα τις καλλιεργήσιμες εκτάσεις και το πόσιμο νερό που απαιτούνται σήμερα για την παραγωγή τροφής και καυσίμων. Επιπροσθέτως, τα φύκη δε συμμετέχουν στην ανθρώπινη τροφική αλυσίδα, και επομένως δε μας στερούν διατροφικούς πόρους.

Η επίδραση της βιομηχανίας βιοκαυσίμων στην τροφή είναι ακόμη υπό αμφισβήτηση. Σύμφωνα με έρευνα η παραγωγή βιοκαυσίμων προκάλεσε την αύξηση της τιμής των τροφίμων κατά 3-30% το 2008 (Mueller et al., 2008). Άλλη έρευνα υποστηρίζει ότι η επέκταση της αγοράς αιθανόλης το 2009 αύξησε τις τιμές του καλαμποκιού κατά 21% (Babcock, 2011). Τα φαινόμενα αυτά ώθησαν τους ερευνητές να αναπτύξουν καλλιέργειες βιοκαυσίμων και τεχνολογίες που θα

μειώνουν την επίδραση της ανάπτυξης της βιομηχανίας βιοκαυσίμων στην παραγωγή και το κόστος τροφίμων. Ένα πρώτο βήμα για την επίτευξη αυτού του στόχου είναι η ανάπτυξη καλλιεργειών κατάλληλων για κάθε περιοχή του κόσμου. Εάν κάθε περιοχή αξιοποιούσε μια συγκεκριμένη καλλιέργεια βιοκαυσίμων, η ανάγκη χρήσης και μεταφοράς ορυκτών καυσίμων από μέρος σε μέρος θα ελαχιστοποιηθεί. Επίσης, ορισμένες περιοχές του πλανήτη είναι ακατάλληλες για την παραγωγή καρπών που απαιτούν μεγάλες ποσότητες νερού και πλούσιο έδαφος. Για το λόγο αυτό, οι καλλιέργειες βιοκαυσίμων που υπάρχουν σήμερα, όπως είναι το καλαμπόκι, δεν είναι πρακτικές όταν εφαρμόζονται σε διαφορετικά περιβάλλοντα και περιοχές του πλανήτη.



**Εικόνα 1.6** Κύκλος ζωής βιοκαυσίμων αγροτικής προέλευσης σε παραγωγή μεγάλης κλίμακας (<http://climatelab.org/Biofuels>).

### 1.3 Βιοαιθανόλη

#### 1.3.1 Γενικά

Η καύσιμη αιθανόλη είναι τυπική αιθανόλη (αιθυλική αλκοόλη). Συχνότερα χρησιμοποιείται ως καύσιμο κινητήρων, κυρίως ως βιολογικό καύσιμο για τον εμπλουτισμό της βενζίνης. Η παγκόσμια παραγωγή αιθανόλης για καύσιμα μεταφοράς τριπλασιάστηκε από το 2000 ως το 2007 από 17 δις σε περισσότερα από 52 τρισεκατομμύρια λίτρα. Η βιοαιθανόλη χρησιμοποιείται ευρέως στη Βραζιλία και τις ΗΠΑ, και μαζί προσέφεραν το 88% της παγκόσμιας παραγωγής αιθανόλης το 2010 (Lichts , 2011).

Η βιοαιθανόλη είναι μια μορφή ανανεώσιμης πηγής ενέργειας που μπορεί να παραχθεί από γεωργικές πρώτες ύλες. Μπορεί να προκύψει από κοινές καλλιέργειες, όπως ζαχαροκάλαμο, πατάτα, μανιόκα και καλαμπόκι. Υπάρχει μεγάλη διαμάχη για την χρησιμότητα της αντικατάστασης της βενζίνης από βιοαιθανόλη. Οι ανησυχίες για την παραγωγή της σχετίζονται με την αύξηση των τιμών των τροφίμων εξαιτίας των μεγάλων καλλιεργήσιμων εκτάσεων που χρησιμοποιούνται για την παραγωγή της, καθώς επίσης και με το ισοζύγιο ενέργειας και ρύπανσης του κύκλου παραγωγής αιθανόλης, ιδίως από καλαμπόκι (Youngquist, 1997). Πρόσφατα επιτεύγματα παραγωγής αιθανόλης από κυτταρίνη μπορεί να άρουν κάποιες από αυτές τις ανησυχίες.

Η κυτταρινική αιθανόλη (cellulosic ethanol) είναι πολλά υποσχόμενη καθώς οι ίνες κυτταρίνης, κύριο και καθολικό συστατικό του κυτταρικού τοιχώματος των φυτών, μπορούν να παράγουν αιθανόλη (Inderwildi and King, 2009). Σύμφωνα με τη Διεθνή Υπηρεσία Ενέργειας, η κυτταρινική αιθανόλη μπορεί να παίξει καθοριστικό ρόλο για τη θέση των καυσίμων αιθανόλης στο ενεργειακό μέλλον.

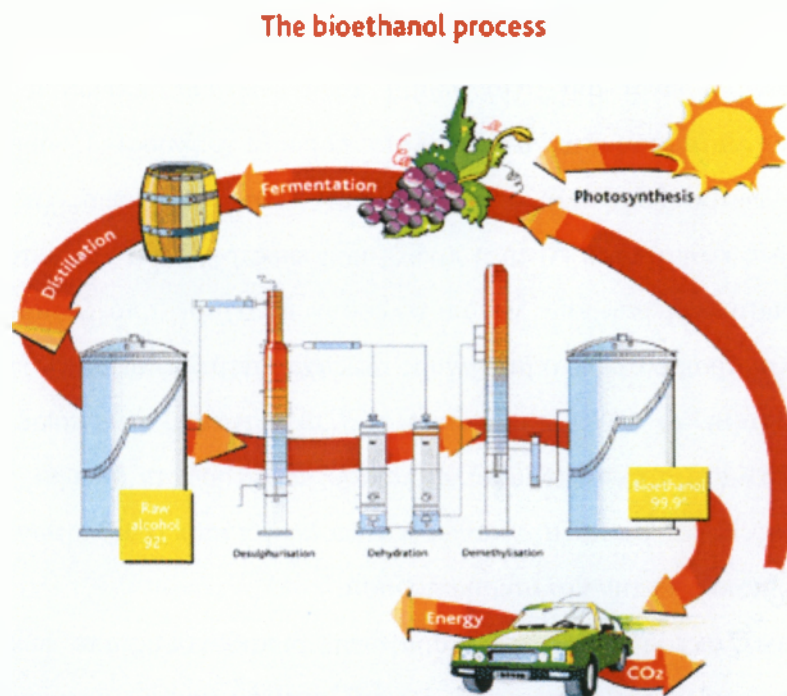
### **1.3.2 Πηγές παραγωγής βιοαιθανόλης**

Η αιθανόλη είναι μια ανανεώσιμη πηγή ενέργειας επειδή η παραγόμενη ενέργεια προέρχεται από έναν ανεξάντλητο πόρο (π.χ. ήλιος). Η δημιουργία της ξεκινά με τη φωτοσύνθεση που δημιουργεί την πρώτη ύλη, όπως τη ζάχαρη από ζαχαροκάλαμο ή καλαμπόκι. Αυτή η πρώτη ύλη επεξεργάζεται και μετατρέπεται σε αιθανόλη. Πρώτη ύλη μπορούν να αποτελέσουν η ζάχαρη από ζαχαροκάλαμο, τα υπολείμματα ζαχαροκάλαμου, ο μίσχανθος, τα ζαχαρότευτλα, το σόργο, το σιτάρι, το κριθάρι, η κάνναβη, το κενάφι, οι πατάτες, οι γλυκοπατάτες, η μανιόκα, ο ηλίανθος, τα φρούτα, η μελάσα, τα κοτσάνια καλαμποκιού, τα σιτηρά, τα άλευρα, τα άχυρα, το βαμβάκι, άλλες πηγές βιομάζας, καθώς και πολλοί τύποι αποβλήτων κυτταρίνης, ανάλογα με το ποιο έχει την καλύτερη απόδοση.

Μία εναλλακτική διαδικασία παραγωγής βιοαιθανόλης από φύκη βρίσκεται υπό ανάπτυξη. Αντί να καλλιεργούνται, να συλλέγονται και να ζυμώνονται, τα φύκη αναπτύσσονται παρουσία φωτός και παράγουν απευθείας αιθανόλη, η οποία συλλέγεται χωρίς τα φύκη να θανατώνονται. Λέγεται ότι η διαδικασία αυτή μπορεί να παράγει 6.000 γαλόνια/εκτάριο έναντι 400 γαλονιών/εκτάριο που παράγονται από το καλαμπόκι.

Προς το παρόν, οι διαδικασίες πρώτης γενιάς για την παραγωγή αιθανόλης από καλαμπόκι χρησιμοποιούν ένα μικρό μέρος του φυτού: τα κοτσάνια του καλαμποκιού αφαιρούνται από το φυτό, και μόνο το άμυλο, που αντιπροσωπεύει το 50% της ξηρής βιομάζας του κοτσανιού, μετατρέπεται σε βιοαιθανόλη. Δύο τύποι διαδικασιών δεύτερης γενιάς βρίσκονται υπό ανάπτυξη. Ο πρώτος τύπος χρησιμοποιεί ένζυμα και ζύμωση από ζυμομύκητα για να μετατρέψει τη φυτική κυτταρίνη σε αιθανόλη, ενώ ο δεύτερος τύπος χρησιμοποιεί την πυρόλυση για να μετατρέψει ολόκληρο το φυτό είτε σε υγρό βιο-έλαιο είτε σε αέριο τύπου syngas. Οι διαδικασίες δεύτερης γενιάς μπορούν επίσης να αξιοποιήσουν φυτά, όπως το γρασίδι, το ξύλο, ή γεωργικά υπολείμματα, όπως το άχυρο.

Τα βασικά βήματα για την παραγωγή βιοαιθανόλης σε μεγάλη κλίμακα είναι: μικροβιακή ζύμωση σακχάρων, απόσταξη, αφυδάτωση και αποδιάταξη (προαιρετικά) (Εικόνα 1.7). Μερικά φυτά απαιτούν να προηγηθεί σακχαροποίηση ή υδρόλυση υδατανθράκων (π.χ. κυτταρίνη και άμυλο) σε σάκχαρα πριν τη ζύμωση. Τα ένζυμα χρησιμοποιούνται για τη μετατροπή του αμύλου σε σάκχαρα.



**Εικόνα 1.7** Διαδικασία παραγωγής βιοαιθανόλης σε μεγάλη κλίμακα

([http://www.acciona-energia.com/activity\\_areas/bioethanol/bioethanol-.aspx?id=4](http://www.acciona-energia.com/activity_areas/bioethanol/bioethanol-.aspx?id=4))

## Κεφάλαιο 2ο

### 2.1 Ζαχαρότευτλα - Διαδικασία παραγωγής μελάσας

#### 2.1.1 Ζαχαρότευτλα

Το ζαχαρότευτλο (*Beta vulgaris* L.) ανήκει στην υποοικογένεια *Chenopodiaceae* και στην οικογένεια των *Amaranthaceae*. Είναι ένας διετής τύπος τεύτλου οι ρίζες του οποίου περιέχουν υψηλή συγκέντρωση σακχαρόζης, κάνοντάς το τη δεύτερη πιο σημαντική πηγή σακχάρων μετά το ζαχαροκάλαμο. Οι μεγαλύτεροι παραγωγοί ζαχαρότευτλου παγκοσμίως είναι η Γαλλία, οι Ηνωμένες Πολιτείες Αμερικής, η Ρωσία και η Γερμανία (32, 31, 29 και 26 εκατ. τόνοι αντίστοιχα, για το 2007). Η συνολική παγκόσμια παραγωγή το έτος 2007 ήταν 248εκατομμύρια τόνοι, καλλιεργούμενη σε 53 εκατ. στρέμματα. Από αυτά, 18 εκατ. στρέμματα καλλιεργήθηκαν στην Ευρωπαϊκή Ένωση και 5 εκατ. στρέμματα στις Η.Π.Α. (FAOSTAT 2009). Η μέση απόδοση της παραγωγής ζαχαρότευτλων στην Ελλάδα ανέρχεται στους 6 τόνους ανά στρέμμα, που είναι από τις υψηλότερες στην Ευρώπη, ενώ η παραγωγή για το 2007 ήταν 860.000 τόνοι από καλλιέργεια 140.000 στρεμμάτων.

Το ζαχαρότευτλο καλλιεργείται εμπορικά σε μια μεγάλη ποικιλία εύκρατων κλιμάτων. Κατά την ανάπτυξή του παράγεται μια μεγάλη (1-2 kg) ρίζα η οποία περιέχει 15-20% σακχαρόζη, επί χλωρού βάρους. Η σακχαρόζη και άλλες θρεπτικές ουσίες καταναλώνονται ώστε να παραχθούν τα άνθη και οι σπόροι του φυτού, εφόσον δεν θεριστεί τον πρώτο χρόνο. Στην εμπορική παραγωγή ζαχαρότευτλου, η ρίζα θερίζεται την πρώτη εποχή, κατά την οποία αποκτά το μέγιστο μέγεθος της. Στα περισσότερα εύκρατα κλίματα τα ζαχαρότευτλα φυτεύονται την άνοιξη και θερίζονται το φθινόπωρο. Μια περίοδος 100 ημερών καλλιέργειας αρκεί για να παραχθεί μια εμπορικώς βιώσιμη σοδειά ζαχαρότευτλων. Στα πιο θερμά κλίματα τα ζαχαρότευτλα μπορούν να καλλιεργηθούν το χειμώνα, φυτεύοντάς τα το φθινόπωρο και θερίζοντάς τα την άνοιξη.

Ο θερισμός των ζαχαρότευτλων γίνεται εξ' ολοκλήρου με μηχανικά μέσα. Η θεριστική μηχανή κόβει το πάνω –μη σακχαρούχο– μέρος του φυτού. Στη συνέχεια συλλέγει τη ρίζα από το έδαφος ενώ συγχρόνως αφαιρεί από αυτήν το περίσσιο χώμα. Μια μηχανή μπορεί να καλύψει ταυτόχρονα 6 σειρές. Οι ρίζες αφήνονται συνήθως στο χωράφι σε στοίβες και κατόπιν παραδίδονται στο εργοστάσιο, όπου δεν πρέπει να

αποθηκεύονται για πολύ καιρό, καθώς έτσι μεταβάλλονται τα μόρια της σακχαρόζης και υποβαθμίζεται ποιοτικά σαν πρώτη ύλη.

Το ζαχαρότευτλο μπορεί να καλλιεργηθεί μόνον κάθε τρία χρόνια στο ίδιο χωράφι λόγω της επιβίωσης ριζών στο έδαφος. Οι σοδιές εξαρτώνται άμεσα από τις κλιματικές συνθήκες. Γενικώς οι σοδιές είναι ικανοποιητικές σε πολλά εύκρατα κλίματα, αλλά και σε τροπικά, καθώς το ζαχαρότευτλο είναι ένα φυτό που αντέχει στη ζέστη. Άλλο χαρακτηριστικό του ζαχαρότευτλου είναι η αντοχή του στην αλατότητα και στην ξηρασία σε σύγκριση με άλλα φυτά. Το γεγονός αυτό το κάνει ιδιαίτερα προσαρμόσιμο στις κλιματικές αλλαγές (Streibig *et al*, 2009). Παρόλα αυτά, η καλλιέργεια ζαχαρότευτλων είναι πιο ενεργοβόρος και πιο απαιτητική σε χημικά και κατ' επέκταση πιο ακριβή, σε σύγκριση με το ζαχαροκάλαμο.

Το ζαχαρότευτλο καλλιεργείται κυρίως για την κάλυψη των αναγκών του πληθυσμού σε διατροφή και άλλα προϊόντα, καθώς και για την παραγωγή ζωοτροφών. Ωστόσο, τα τελευταία χρόνια χρησιμοποιείται και σαν πρώτη ύλη για την παραγωγή βιοαιθανόλης. Η Γαλλία είναι ο μεγαλύτερος παραγωγός βιοαιθανόλης από ζαχαρότευτλα στον κόσμο. Το 2003, το 80% (62.000 τόνοι) της παραγόμενης βιοαιθανόλης στη Γαλλία προήλθε από ζαχαρότευτλα και το υπόλοιπο από άλλα δημητριακά φυτά.

Από ένα στρέμμα ζαχαρότευτλα παράγονται 900 kg σακχάρου και περίπου 500 λίτρα αιθανόλης. Ο λόγος της παραγόμενης ενέργειας από τη βιοαιθανόλη προς την καταναλισκόμενη ενέργεια για την παραγωγή της από ζαχαρότευτλο ισούται με 1.76, απόδοση που υπερβαίνει την αντίστοιχη του σιταριού και του καλαμποκιού (ΚΑΠΕ, 2006; Rutz and Janssen, 2007; FAO, 2008; Βερύκιος, 2005).

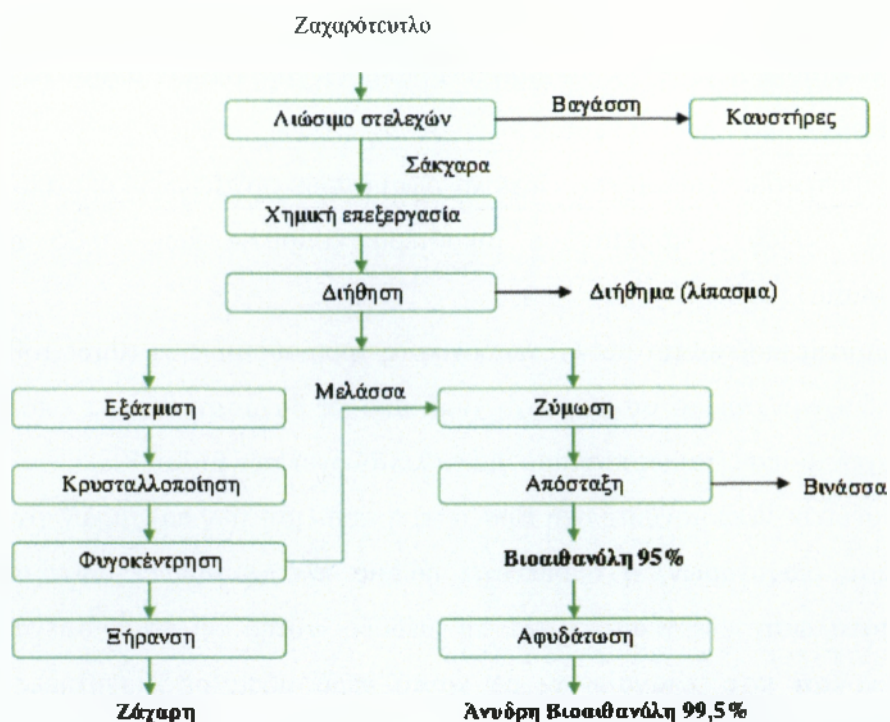


**Εικόνα 2.1** Βολβός ζαχαρότευτλου.

### 2.1.2 Διαδικασία παραγωγής μελάσας

Τα στάδια παραγωγής ζάχαρης, παραπροϊόν της οποίας αποτελεί η μελάσα, είναι τα εξής:

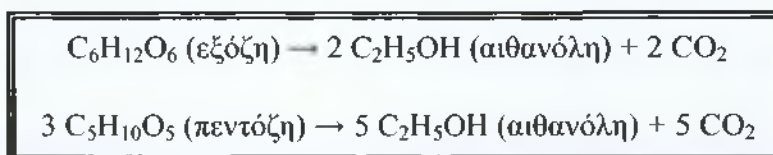
- Το ζαχαρότευτλο καθαρίζεται ώστε να αφαιρεθούν οργανικά υλικά από τον αγρό και στη συνέχεια κόβεται σε μικρότερα κομμάτια των 20-25 εκατοστών (προεργασία).
- Τα κομμάτια εισάγονται σε 4-7 διαδοχικούς τριπλούς μύλους (three roll mills) οι οποίοι διαχωρίζουν το σακχαρούχο χυμό από τη βαγάση (ινώδες υπόλειμμα), η οποία χρησιμοποιείται ως καύσιμο για τη λειτουργία των μύλων.
  - Σε μερικές νέες μονάδες στη Βραζιλία, η εκχύλιση των σακχάρων γίνεται με τη χρήση διαχυτήρων, η οποία έχει κάποια πλεονεκτήματα όσον αφορά την κατανάλωση ενέργειας. Κατά τη μέθοδο αυτή, τα τεμαχισμένα καλάμια πλένονται κατ' επανάληψιν με καυτό νερό μέσα σε διαχυτήρες και έτσι απελευθερώνονται τα σάκχαρα.
- Το προϊόν συμπιέζεται σε έναν στεγνωτήρα και έτσι παράγεται η βαγάση που οδηγείται στους καυστήρες.
- Ο σακχαρούχος χυμός αναμιγνύεται με οξείδιο του ασβεστίου ( $\text{CaO}$ ) ώστε να ρυθμιστεί το pH στο 7. Αυτή η ανάμιξη εμποδίζει τη διάσπαση της σακχαρόζης σε γλυκόζη και φρουκτόζη ενώ απομακρύνει και κάποιες ακαθαρσίες.
- Το υδαρές σακχαρούχο διάλυμα περνάει από περιστροφικό φίλτρο κενού απ' όπου ανακτάται ζάχαρη, ενώ το διήθημα διατίθεται ως λίπασμα.
- Το διάλυμα συμπυκνώνεται σε εξατμιστήρες πολλαπλών βαθμίδων και η περιεκτικότητά του σε σάκχαρα αυξάνεται από 14-16% σε 50-58%.
- Το σιρόπι αυτό συμπυκνώνεται κι άλλο ώσπου γίνεται υπερκορεσμένο και τελικά κρυσταλλοποιείται κατά την ψύξη. Η κρυσταλλοποίηση οδηγεί σε ένα μείγμα καθαρών κρυστάλλων ζάχαρης και μελάσας.
- Η μελάσα απομακρύνεται με φυγοκέντρωση, ενώ οι κρύσταλλοι καθαρίζονται με προσθήκη ατμού και στη συνέχεια ξηραίνονται από ρεύμα αέρος.
- Η μελάσα υπόκειται σε περαιτέρω επεξεργασία, όπως παστεριοποίηση και συνεχή προσθήκη  $\text{CaO}$  για αφαίρεση ακαθαρσιών, και τελικά μπορεί να διατεθεί για αλκοολική ζύμωση καθώς περιέχει τουλάχιστον 48% σάκχαρα, κυρίως σακχαρόζη, αλλά και σημαντικά ποσά γλυκόζης και φρουκτόζης και μπορεί να ζυμωθεί για την παραγωγή βιοαιθανόλης. (Deurwaarder and Reith, 2006; Pandey, 2009) (Εικόνα 2.2).



**Εικόνα 2.2** Διάγραμμα ροής σταδίων παραγωγής βιοαιθανόλης και ζάχαρης από ζαχαρότευτλο (BNDES and CGEE, 2008).

### 2.1.3 Αλκοολική ζύμωση σακχάρων

Η αλκοολική ζύμωση είναι η βιολογική διαδικασία κατά την οποία σάκχαρα, όπως η γλυκόζη, η φρουκτόζη και η σακχαρόζη, μετατρέπονται σε κυτταρική ενέργεια, παράγοντας ως παραπροϊόντα αιθανόλη και διοξείδιο του άνθρακα. Οι αντιδράσεις που περιγράφουν συνοπτικά τη ζύμωση των εξοζών και των πεντοζών είναι οι εξής:



Ο καταβολισμός των σακχάρων από τους μικροοργανισμούς γίνεται απουσία οξυγόνου, οπότε η διεργασία χαρακτηρίζεται ως αναερόβια. Στη βιομηχανική παραγωγή βιοαιθανόλης ο μικροοργανισμός που χρησιμοποιείται κατά κόρον είναι ο *Saccharomyces cerevisiae*, ένα από τα πολλά είδη σακχαρομυκήτων -ζυμομυκήτων (ζύμες). Άλλα είδη ζύμης που χρησιμοποιούνται είναι τα *Saccharomyces uvarum* (*carlsbergensis*), *Saccharomyces pastorianus*, *Schizosaccharomyces pombe* και

*Kluyveromyces lactis*. Επίσης, το βακτήριο *Zymomonas mobilis* παρουσιάζει πολλές δυνατότητες και αποτελεί αντικείμενο εντονότατης έρευνας τα τελευταία χρόνια. Το υπόστρωμα που προτιμάται είναι τα σάκχαρα που προέρχονται από σακχαρούχες ή αμυλούχες πρώτες ύλες. Οι μικροοργανισμοί αυτοί μπορούν να μεταβολίσουν εύκολα τους δισακχαρίτες και τις εξόζες, ωστόσο εκδηλώνουν αδυναμία καταβολισμού της κελλοβιόζης και των πεντοζών που προκύπτουν από την υδρόλυση της λιγνοκυτταρινικής βιομάζας. Άλλα βακτήρια και μη συμβατικές ζύμες μπορούν να μεταβολίσουν εξίσου εξόζες και πεντόζες, με χαμηλή όμως απόδοση. Επιπλέον, η αποτελεσματικότητά τους περιορίζεται από παράγοντες, όπως είναι η υψηλή συγκέντρωση αιθανόλης, οι υψηλές θερμοκρασίες, το χαμηλό pH, κ.ά.

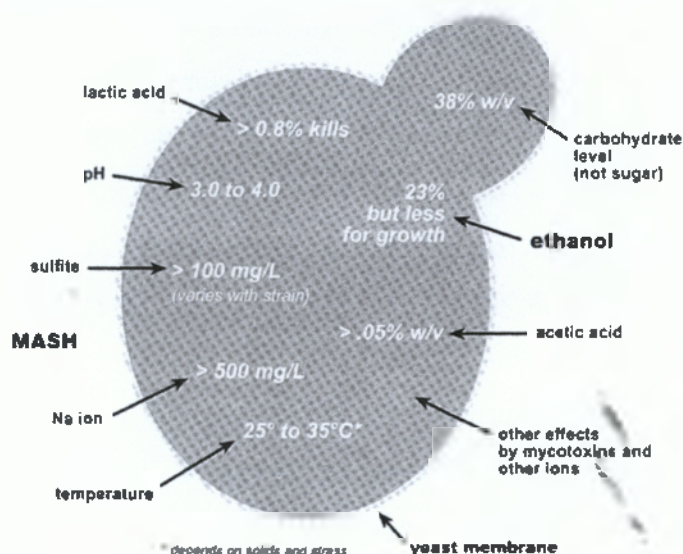
Προκειμένου να υπερκεραστούν αυτά τα εμπόδια, γίνονται προσπάθειες γενετικής τροποποίησης των μικροοργανισμών με την τεχνολογία ανασυνδυασμένου DNA.

Στη βιομηχανική παραγωγή βιοαιθανόλης, η ζύμωση πραγματοποιείται σε αντιδραστήρες διαλείποντος (batch) ή συνεχούς (continuous) έργου. Οι συνήθεις θερμοκρασίες ζύμωσης είναι 25-35°C, ενώ η διάρκεια ζύμωσης (σε batch διεργασίες) μπορεί να ποικίλει μεταξύ 6 και 72 ωρών, ανάλογα με τη σύνθεση του υποστρώματος, τον τύπο, την πυκνότητα και τη δραστηριότητα των μικροοργανισμών. Το τελικό διάλυμα, τυπικά περιέχει αιθανόλη σε ποσοστό 8-14% κατ' όγκο. Επίσης, από τη ζύμωση παράγεται ως παραπροϊόν διοξείδιο του άνθρακα. Το παραγόμενο αέριο περιέχει 90% CO<sub>2</sub> κατ' όγκο, καθώς και αξιόλογη ποσότητα αιθανόλης σε ατμό, η οποία ανακτάται με μία διαδικασία που ονομάζεται scrubbing. Προτού αυτό το αέριο απελευθερωθεί στην ατμόσφαιρα πρέπει να αφαιρεθούν τα αρωματικά συστατικά. Εναλλακτικά, το CO<sub>2</sub> μπορεί να δεσμευτεί και να χρησιμοποιηθεί στην παρασκευή αναψυκτικών ή στην βελτιωμένη ανάκτηση πετρελαίου. Τεχνικές που αποσκοπούν στην αύξηση της αποτελεσματικότητας της ζύμωσης περιλαμβάνουν ανακύκλωση ή ακινητοποίηση των κυττάρων των μικροοργανισμών, καθώς και ζύμωση σακχαρούχου διαλύματος μεγάλης συγκέντρωσης με την τεχνολογία 'very high gravity' (VHG). Τέλος, η ζύμωση των σακχάρων μπορεί να διεξαχθεί ταυτόχρονα με τη διαδικασία της υδρόλυσης των αμυλούχων ή των κυτταρινούχων υλών. Αυτή η μέθοδος που ονομάζεται SSF (Simultaneous Saccharification and Fermentation) και βρίσκεται ακόμα σε πειραματικό στάδιο (Deurwaarder and Reith, 2006; Pandey, 2009).

## 2.1.4 Παράγοντες που επηρεάζουν την αλκοολική ζύμωση από μικροοργανισμούς

Τα μεγέθη που περιγράφουν την ζυμωτική ικανότητα των μικροοργανισμών είναι η απόδοση σε αιθανόλη και η παραγωγικότητα. Η **απόδοση** (yield) περιγράφει το ποσό αιθανόλης που παράγεται ανά μονάδα υποστρώματος που καταναλώνεται από τον μικροοργανισμό, και εκφράζεται συνήθως σε μονάδες μάζας (gr/gr), ή ως ποσοστό της θεωρητικής απόδοσης. Θεωρητικά, από 1 gr εξόζης ή πεντόζης παράγονται 0,511 gr αιθανόλης και 0,489 gr CO<sub>2</sub>. Ωστόσο, πρακτικά η απόδοση είναι πάντα μικρότερη της θεωρητικής (π.χ. 90-95% για τις ζύμες), καθώς ο μικροοργανισμός καταναλώνει ένα μέρος του υποστρώματος για τη σύνθεση νέας βιομάζας και για τη συντήρηση των κυττάρων του. Για το βακτήριο *Escherichia coli* και τον *S. cerevisiae* αυτές οι τιμές είναι περίπου ίσες με 0.054 και 0.018 gr γλυκόζης/gr ξηρής κυτταρικής μάζας ανά ώρα, αντίστοιχα (Demirbas, 2005; Roehr, 2001). Η **παραγωγικότητα** (productivity) εκφράζεται σε γραμμάρια αιθανόλης ανά λίτρο ανά ώρα.

Αυτά τα χαρακτηριστικά επηρεάζονται από διάφορους παράγοντες, με τους σημαντικότερους να είναι: η θερμοκρασία, η συγκέντρωση αιθανόλης και η παρουσία ανασταλτικών ουσιών. Όταν αυτοί οι παράγοντες δρουν μεμονωμένα, είναι εφικτός ο έλεγχός τους, έως ένα βαθμό. Ο συνδυασμός τους όμως δημιουργεί συνθήκες που είναι δύσκολο να ελεγχθούν στον αντιδραστήρα. Άλλες παράμετροι επιρροής είναι το pH, ο ρυθμός ανάπτυξης, η συγκέντρωση του υποστρώματος, η οσμωτική πίεση, η παρουσία οξυγόνου, τα θρεπτικά συστατικά, οι βακτηριακές μολύνσεις, άλλα παραπροϊόντα μεταβολισμού και η γενετική σταθερότητα του μικροοργανισμού.



**Εικόνα 2.3** Ανασταλτικοί παράγοντες που επηρεάζουν την αλκοολική ζύμωση στον *Saccharomyces cerevisiae* (Ingledew, 1999).

#### 2.1.4.1 Θερμοκρασία

Γενικά, οι ζυμωτικοί μικροοργανισμοί είναι μεσόφιλοι και αποδίδουν καλύτερα σε θερμοκρασίες 30-38°C. Σε θερμοκρασίες πάνω από 46-48°C οι μικροοργανισμοί παύουν να αναπτύσσονται διότι τα ένζυμα που καταλύουν όλες τις βιοχημικές αντιδράσεις του κυττάρου μετουσιώνονται και απενεργοποιούνται. Αντίστοιχα, σε θερμοκρασίες κάτω των 20°C η δράση των ενζύμων επιβραδύνεται τόσο, ώστε να μην μπορούν να υποστηρίξουν την ανάπτυξη, η οποία τελικά σταματά. Μικροοργανισμοί με αυξημένη αντοχή σε υψηλές θερμοκρασίες είναι επιθυμητοί για τους εξής λόγους (Hettenhaus, 1998; Roehr, 2001):

- Υψηλή θερμοκρασία ζύμωσης αυξάνει εκθετικά το ρυθμό ανάπτυξης και την παραγωγικότητα, ενώ μειώνει τη διάρκεια ζύμωσης.
- Το ιξώδες του ζυμού μειώνεται με την αύξηση της θερμοκρασίας. Συνεπώς, απαιτείται λιγότερη ενέργεια για τη διατήρηση κατάλληλης ανάδευσης.
- Το λειτουργικό κόστος μειώνεται λόγω της αυξημένης παραγωγικότητας ανά μονάδα όγκου του αντιδραστήρα, καθώς μειώνεται και το κόστος εξοπλισμού ψύξης.
- Τα λειτουργικά κόστη μειώνονται διότι λιγότερη ενέργεια απαιτείται για τη διατήρηση επιθυμητής θερμοκρασίας ζύμωσης και την ανάκτηση αιθανόλης
- Η διαλυτότητα του οξυγόνου και άλλων αερίων στον πολτό της ζύμωσης μειώνεται με την αύξηση της θερμοκρασίας. Αυτό το φαινόμενο υποστηρίζει τη διαμόρφωση και τη μακροπρόθεσμη διατήρηση των αναερόβιων συνθηκών. Η βέλτιστη θερμοκρασία για ακραίους θερμοφίλους οργανισμούς κυμαίνεται μεταξύ 66 και 69°C, και σε αυτές τις θερμοκρασίες η διαλυτότητα του O<sub>2</sub> στο μέσο είναι 80% χαμηλότερη απ' ότι στους 30°C.
- Υποστρώματα με μικρή διαλυτότητα σε θερμοκρασίες περιβάλλοντος θα επιδεικνύουν μεγαλύτερη διαλυτότητα σε βέλτιστες θερμοκρασίες ζύμωσης. Έτσι, η διαθεσιμότητα του υποστρώματος δεν θα αποτελεί πλέον περιοριστική παράμετρο του ρυθμού της διαδικασίας
- Ελαττώνεται το ενδεχόμενο μόλυνσης καθώς λιγότεροι οργανισμοί επιβιώνουν σε υψηλές θερμοκρασίες
- Η διαδικασία της ενζυμικής υδρόλυσης (σακχαροποίηση) – η οποία διεξάγεται σε θερμοκρασία ως και 55°C – μπορεί να συνδυαστεί με τη ζύμωση, με περαιτέρω μείωση του κόστους και της ανασταλτικής δράσης της γλυκόζης.

#### 2.1.4.2 Συγκέντρωση αιθανόλης

Η πλειονότητα των οργανισμών δεν μπορεί να αντέξει σε συγκεντρώσεις αιθανόλης άνω του 10-15% (w/v), λόγω της τοξικής δράσης της. Αύξηση της συγκέντρωσης αιθανόλης στην εκθετική φάση ανάπτυξης της καλλιέργειας έχει ως αποτέλεσμα τη μείωση του ρυθμού ανάπτυξης (πιθανώς λόγω επίδρασης στην πρωτεϊνική σύνθεση), μείωση της κυτταρικής βιωσιμότητας (λόγω ανεπανόρθωτης αλλοίωσης των ενζύμων) και σε μικρότερο βαθμό μείωση της παραγωγικότητας της ίδιας της αιθανόλης (Roehr, 2001). Η αιθανόλη σε υψηλές συγκεντρώσεις φαίνεται να μεταβάλλει το βαθμό πολικότητας της κυτταρικής μεμβράνης και του κυτοπλάσματος, προκαλώντας αυξημένη ρευστότητα της μεμβράνης. Η μεμβράνη γίνεται περισσότερο διαπερατή από πρωτόνια, οπότε αυξάνεται η εισροή πρωτονίων και η απαίτηση ενέργειας για τη διατήρηση του ενδοκυτταρικού pH, ενώ μπορεί να προκληθεί μέχρι και διακοπή της ανάπτυξης (Devantier *et al.*, 2005). Τα φωσφολιπίδια της πλασματικής μεμβράνης παίζουν σημαντικό ρόλο στο μηχανισμό αντοχής. Υψηλές συγκεντρώσεις ακόρεστων λιπαρών οξέων, βιταμίνες και πρωτεΐνες στη μεμβράνη ενισχύουν την αντοχή στην αιθανόλη. Άλλοι παράγοντες όπως η σύνθεση του υποστρώματος, η ενδοκυτταρική συγκέντρωση αιθανόλης, η οσμωτική πίεση και η θερμοκρασία, μπορούν να επηρεάσουν την αντοχή στην αιθανόλη, η οποία φυσικά εξαρτάται και από το είδος του μικροοργανισμού (Banat *et al.*, 1998). Γενικά, υψηλότερη θερμοκρασία μειώνει την αντοχή. Σε θερμοκρασίες άνω των 35°C η βιωσιμότητα των μικροοργανισμών ελαττώνεται σε συγκεντρώσεις αιθανόλης 10% (w/v) (Hettenhaus, 1998). Η ανάπτυξη μικροοργανισμών με αυξημένες αντοχές στην αιθανόλη θα επιτρέπει τελικά διαλύματα με υψηλότερες συγκεντρώσεις αιθανόλης, γεγονός που οδηγεί σε μείωση του κόστους της απόσταξης (Olofsson *et al.*, 2008). Επίσης, ένας τρόπος μείωσης της συγκέντρωσης αιθανόλης είναι η παράλληλη απόσταξή της κατά τη διάρκεια της ζύμωσης (Τόσης, 2008).

#### 2.1.4.3 Αντοχή σε ανασταλτικές ουσίες

Οι αναστολές της ζύμωσης μπορούν να ταξινομηθούν σε τρεις κατηγορίες (Hettenhaus, 1998):

- Συστατικά που προκύπτουν από την υδρόλυση της βιομάζας: σε αυτά περιλαμβάνονται οργανικά οξέα, όπως το οξικό, το γλυκουρονικό και το γαλακτουρονικό οξύ από την ημικυτταρίνη, καθώς και φαινολικές ενώσεις από τη

λιγνίνη. Το πιο ανασταλτικό συστατικό για τα βακτήρια και τις ζύμες είναι το οξικό οξύ. Η διαλυμένη λιγνίνη αποτελεί επίσης έναν παράγοντα.

- Ενώσεις που σχηματίζονται από την αποδόμηση των προϊόντων της προεπεξεργασίας και της υδρόλυσης της βιομάζας: η φουρφουράλη από την ξυλόζη και η υδροξυ-μεθυλο-φουρφουράλη (HMF) από τη γλυκόζη είναι τα πιο σημαντικά. Επιπλέον εδώ ανήκει και ένα σύνολο αλδεϋδών, οξέων και αλκοολών από την αποδόμηση της λιγνίνης, των σακχάρων και των πρωτεϊνών.
- Συστατικά από άλλες πηγές: ιόντα μετάλλων από τη διάβρωση του εξοπλισμού, θειώδη άλατα, διοξείδιο του θείου και γαλακτικό οξύ.

Όλα αυτά τα συστατικά είναι τοξικά για τους μικροοργανισμούς. Οργανικά συστατικά μικρού μοριακού βάρους ή άλατα μπορούν να διαπεράσουν την κυτταρική μεμβράνη, ενώ ενώσεις μεγάλου μοριακού βάρους επηρεάζουν τη δραστηριότητα των μεταφορέων σακχάρων και ιόντων στην κυτταρική μεμβράνη. Γενικά, οι μικροοργανισμοί που ζυμώνουν πεντόζες αναστέλλονται περισσότερο απ' ό,τι οι μικροοργανισμοί που ζυμώνουν εξόζες. Ωστόσο, είναι απαραίτητο ένα στάδιο μείωσης της τοξικότητας πριν από τη ζύμωση (Klinke *et al.*, 2004).

#### **2.1.4.4 Εύρος τιμών πε-χα (pH)**

Τα περισσότερα βακτήρια αναπτύσσονται σε ένα εύρος τιμών pH 6,5 με 7,5, ενώ οι ζύμες σε pH 3,5-5. Η δυνατότητα μείωσης του pH κάτω από 4 ελαττώνει τις απώλειες λόγω βακτηριακής μόλυνσης και τις απαιτήσεις αποστείρωσης του εξοπλισμού. Ωστόσο, το χαμηλό pH επηρεάζει δυσμενώς την περίπτωση διεξαγωγής ταυτόχρονης σακχαροποίησης και ζύμωσης, καθώς οι κυτταρινάσες αποδίδουν καλύτερα σε pH ίσο με 5. Χαμηλότερο pH επιφέρει μετουσίωση της πρωτεΐνης, εξαρτήσει της διάρκειας, της θερμοκρασίας και της αντοχής στην αιθανόλη. (Hettenhaus, 1998).

#### **2.1.4.5 Ειδικός ρυθμός ανάπτυξης (specific growth rate)**

Ο ειδικός ρυθμός ανάπτυξης ( $\mu$ ) ορίζεται ως η αύξηση της κυτταρικής μάζας ανά μονάδα κυτταρικής μάζας ανά μονάδα χρόνου. Εξαρτάται από πολλές άλλες παραμέτρους, όπως θρεπτικά συστατικά, ανασταλτικές ουσίες, pH και θερμοκρασία. Ένας υψηλός ειδικός ρυθμός ανάπτυξης είναι επιθυμητός (Hettenhaus, 1998).

#### 2.1.4.6 Συγκέντρωση υποστρώματος – Οσμωτική πίεση

Σταδιακή αύξηση της αρχικής συγκέντρωσης υποστρώματος επιφέρει ως ένα βαθμό αύξηση της απόδοσης σε αιθανόλη, της τελικής συγκέντρωσης αιθανόλης, της παραγωγικότητας και της ανάπτυξης των μικροοργανισμών. Από ένα σημείο όμως και έπειτα, η υπερβολική συγκέντρωση σακχάρων επιφέρει τα αντίθετα αποτελέσματα, λόγω αυξημένης οσμωτικής πίεσης σε συνδυασμό με αυξημένη θερμοκρασία από την επώαση. Η ημιπερατή μεμβράνη που περιβάλλει το κύτταρο πρέπει να είναι ικανή να αντέχει στις αλλαγές της οσμωτικής πίεσης, ειδάλλως το κύτταρο μπορεί να υποστεί σοβαρές βλάβες ή και να θανατωθεί. Τα κύτταρα μπορούν να ‘εκραγούν’ σε ένα υποτονικό διάλυμα, όπου το εξωκυτταρικό υγρό είναι αραιότερο απ’ ό,τι το ενδοκυτταρικό. Αντίθετα, σε ένα υπερτονικό διάλυμα, τα κύτταρα συρρικνώνονται λόγω της διαφοράς στην οσμωτική πίεση. Συνεπώς, η αντοχή στην οσμωτική πίεση αποτελεί έναν από τους παράγοντες που περιορίζουν τη μέγιστη συγκέντρωση υποστρώματος (Hettenhaus, 1998; Banat *et al.*, 1998). Η συγκέντρωση σακχάρων που χρησιμοποιείται συνήθως είναι 20-24% κατά βάρος. Συγκεντρώσεις άνω των 300 gr/l εφαρμόζονται στην τεχνολογία ‘very high gravity’ (VHG) (Wang *et al.*, 1999).

#### 2.1.4.7 Παρουσία οξυγόνου

Η επιρροή του οξυγόνου στην αποτελεσματικότητα της ζύμωσης είναι πολύπλοκη. Υπερβολική παροχή  $O_2$  μπορεί να αναστείλει τη ζύμωση πολλών ζυμών, ενώ περιορισμένη παροχή ενισχύει τη ζύμωση σε άλλα είδη. Υπάρχουν τέσσερα σημαντικά μεταβολικά φαινόμενα που σχετίζονται με το οξυγόνο, και εκδηλώνονται ανάλογα με το είδος του μικροοργανισμού (Mousdale, 2008):

- Φαινόμενο Kluyver : ορισμένες ζύμες μπορούν να μεταβολίσουν σημαντικούς δισακχαρίτες (μαλτόζη, κελλοβίοζη) μόνο κάτω από αερόβιες συνθήκες και δεν μπορούν να παράγουν αιθανόλη κάτω από οποιοδήποτε βαθμό αναερόβιωσης.
- Φαινόμενο Pasteur : αναστολή του ρυθμού κατανάλωσης σακχάρων παρουσία  $O_2$ , αύξηση της κυτταρικής ανάπτυξης και μείωση του ρυθμού της ζύμωσης .
- Φαινόμενο Crabtree : συνέχιση σχηματισμού αιθανόλης παρουσία  $O_2$  σε υψηλούς ρυθμούς ανάπτυξης ή όταν παρέχεται περίσσεια σακχάρων.
- Φαινόμενο Custers : αναστολή της ζύμωσης απουσία  $O_2$  – εκδηλώνεται μόνο από μικρό αριθμό ειδών ζύμης, ικανών να ζυμώνουν γλυκόζη σε αιθανόλη υπό πλήρως αεροβικές συνθήκες.

Ο βέλτιστος συνδυασμός φαινοτύπων για έναν αποτελεσματικό μικροοργανισμό θα ήταν:

- Θετικός κατά Pasteur, δεδομένης της αποτελεσματικής χρήσης της γλυκόζης και άλλων σακχάρων για ανάπτυξη, όταν τα επίπεδα  $O_2$  είναι σχετικά υψηλά.
- Θετικός κατά Crabtree, για υψηλούς ρυθμούς παραγωγής αιθανόλης, με παροχή άφθονων ζυμώσιμων σακχάρων όσο το δυνατόν συντομότερα κατά τη διεξαγωγή της ζύμωσης.
- Αρνητικός κατά Custers, δηλαδή μη επιρροή σε αυξομειούμενα και ενίοτε χαμηλά επίπεδα  $O_2$ .
- Αρνητικός κατά Kluyver, για μεγαλύτερο εύρος ζυμώσιμων σακχάρων.

#### 2.1.4.8 Θρεπτικά συστατικά

Για βέλτιστη ζύμωση, οι ζύμες απαιτούν θρεπτικές ουσίες για την παραγωγή ενέργειας και τη σύνθεση κυτταρικών πολυμερών. Οι σχετικές απαιτήσεις σε θρεπτικά που δεν χρησιμοποιούνται στη σύνθεση αιθανόλης βρίσκονται σε αναλογία με τα κύρια συστατικά του κυττάρου. Αυτά περιλαμβάνουν άνθρακα, οξυγόνο, άζωτο και υδρογόνο. Μικρές ποσότητες φωσφόρου, θείου, καλίου και μαγνησίου πρέπει επίσης να παρέχονται. Επίσης, μέταλλα (K, Na, Mg, Ca, Zn, Fe, Mn, Cu, Co), πεπτόνη, βιταμίνες, νουκλεϊκά οξέα και αμινοξέα απαιτούνται σε ιχνοποσοτήτες. Οι σημαντικότεροι αναπτυξιακοί παράγοντες γιατί ζύμες είναι οι βιταμίνες: βιοτίνη (B7), παντοθενικό οξύ (B5), ινοσιτόλη, θειαμίνη (B1), νιασίνη (B3) και φολικό οξύ (B9) (Roehr, 2001).

Η πρόσθεση βιταμινών στο θρεπτικό μέσο έχει σαν αποτέλεσμα την αύξηση της απόδοσης σε αιθανόλη, της παραγωγικότητας και της βιωσιμότητας των κυττάρων. Επιπλέον, το άζωτο θεωρείται ως ένα από τα πιο σημαντικά στοιχεία, καθώς ωφελεί σε μεγάλο βαθμό στην ανάπτυξη των μικροοργανισμών, στην αντοχή σε υψηλές συγκεντρώσεις αιθανόλης και στην αποτελεσματικότητα της ζύμωσης, ειδικά στην τεχνολογία 'very high gravity', όπου έχουμε μεγάλες συγκεντρώσεις υποστρώματος. (Alfengore *et al.*, 2002). Έχει αποδειχθεί, επίσης, ότι αυξημένες δόσεις μαγνησίου στον προς ζύμωση ζωμό ελαττώνει τις επιπτώσεις της μεγάλης θερμοκρασίας και της τοξικότητας της αιθανόλης στα κύτταρα των μικροοργανισμών, διατηρώντας τη δομική και λειτουργική ακεραιότητα της κυτταρικής μεμβράνης (Birch and Walker, 2000).

Πολλές πρώτες ύλες για την παραγωγή βιοαιθανόλης παρέχουν όλα τα απαραίτητα θρεπτικά συστατικά. Επιπρόσθετη παροχή θρεπτικών μπορεί να απαιτείται κατά περίπτωση. Τα θρεπτικά μπορεί να παρέχονται ως μεμονωμένα συστατικά, όπως αμμωνιακά άλατα και φωσφορικό κάλιο, είτε από φθηνές πηγές, όπως ‘corn steep liquor’ (Roehr, 2001).

#### 2.1.4.9 Βακτηριακές μολύνσεις

Ένα από τα κύρια προβλήματα στη συνεχή παραγωγή αιθανόλης είναι η επικράτηση βακτηριακών μολύνσεων από τα βακτήρια του γαλακτικού οξέος (lactic acid bacteria – LAB). Συνήθως, το 60% των μολύνσεων προκαλείται από είδη του γένους *Lactobacilli*, όπως τα *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *delbrueckii*, *L. acidophilus*, *L. paracasei* subsp. *paracasei* και *L. brevis*. Άλλα επιβλαβή βακτήρια αποτελούν είδη των *Pediococcus* και *Leuconostoc*. Αυτά τα βακτήρια μολύνουν τη διαδικασία της ζύμωσης από τον *Saccharomyces cerevisiae* και ανταγωνίζονται επιθετικά για τα θρεπτικά στοιχεία, επηρεάζοντας τη βιωσιμότητα του κύριου μικροοργανισμού και μειώνοντας την απόδοση σε αιθανόλη. Επιπλέον, το γαλακτικό και το οξικό οξύ, τα δύο κύρια προϊόντα από τη ζύμωση γλυκόζης από τα βακτήρια του γαλακτικού οξέος, εμποδίζουν την ανάπτυξη του *S. cerevisiae* σε επίπεδα του 2,5% (κ.β.) και 0,6% (κ.β.) αντίστοιχα. Προκειμένου να ελεγχθεί η βακτηριακή μόλυνση, χρησιμοποιούνται ακριβώς αντιβιοτικά, όπως πενικιλίνη και virginiamycin. Ωστόσο, αναπτύσσεται αντίσταση από τα βακτήρια και δημιουργούνται προβληματικές καταστάσεις που μπορούν να αναστείλουν τη συνεχή διεργασία. Ακόμη, η χρήση τέτοιων αντιβιοτικών μπορεί να απελευθερώσει τοξικές ουσίες στο περιβάλλον, μέσω του απόβλητου νερού, ή ακόμα χειρότερα, στο κατάλοιπο της απόσταξης το οποίο θα καταναλωθεί αργότερα ως ζωοτροφή. Συνεπώς, διεξάγονται έρευνες για την παραγωγή φυσικών αντιμικροβιακών παραγόντων, όπως τα λεγόμενα ‘hop acids’ που συνιστούν μια ενδιαφέρουσα δυνατότητα (Cyt, 2006).

Εξίσου ανασταλτικά δρουν και μυκοτοξίνες προερχόμενες από δημητριακά που φέρουν μολύνσεις από διάφορα είδη μυκήτων, όπως τα *Aspergillus*, *Penicillium*, *Fusarium*, *Claviceps* και *Acremonium* (Mousdale, 2008).

#### 2.1.4.10 Άλλα παραπροϊόντα μεταβολισμού

Ένα ποσοστό 4-5% του υποστρώματος καταναλώνεται από τις ζύμες σε χημικές αντιδράσεις για σχηματισμό ουσιών, όπως γλυκερίνη, ηλεκτρικό οξύ και

οξικό άλας. Έχει θεωρηθεί ότι εάν αυτές οι αντιδράσεις μπορούσαν να ‘εξουδετερωθούν’, η απόδοση σε αιθανόλη θα αυξάνονταν κατά 2,7%. Η παραγωγή γλυκερίνης μπορεί να περιοριστεί μέσω μιας προσπάθειας ρύθμισης της οξειδοαναγωγικής ισορροπίας μέσα στα κύτταρα, κάτω από συγκεκριμένες συνθήκες μικρο-οξυγόνωσης. Επίσης, τα βακτήρια εκτός από αιθανόλη, παράγουν και άλλα παραπροϊόντα όπως ανώτερες αλκοόλες (βουτανόλη, ισοπροπυλική αλκοόλη, 2,3-βουτανοδιόλη), οργανικά οξέα (οξικό οξύ, μυρμηγκικό οξύ, γαλακτικά οξέα), κετόνες (ακετόνη), πολυόλες (αραβιτόλη, γλυκερίνη, ξυλιτόλη) και αέρια (μεθάνιο, υδρογόνο, CO<sub>2</sub>), τα οποία επηρεάζουν αρνητικά την απόδοση σε αιθανόλη (Cyt, 2006; Roehr, 2001).

#### **2.1.4.11 Γενετική σταθερότητα**

Οι ζύμες αρχικά προσαρμόζονται στο υπόστρωμα και μετά από τον εγκλιματισμό τους, η παραγωγή αιθανόλης αυξάνεται. Η ικανότητα των τροποποιημένων μικροοργανισμών να παραμένουν γενετικά σταθεροί έπειτα από πλήθος γενεών, είναι απαραίτητη για τη διασφάλιση σταθερής απόδοσης. Ανασυνδυασμένα στελέχη, στα οποία η τροποποίηση έχει γίνει στο χρωμόσωμα, γενικά επιδεικνύουν καλή γενετική σταθερότητα μετά από πολλές γενιές που προκύπτουν σε διάστημα αρκετών μηνών. Οργανισμοί που τροποποιούνται με εισαγωγή ξένου DNA σε οποιοδήποτε άλλο μέρος του κυττάρου, όπως στο πλασμίδιο, παρουσιάζουν μεγαλύτερη γενετική αστάθεια μετά από ημέρες ή εβδομάδες λειτουργίας. Αυτό συνήθως καταλήγει σε μία σταδιακή πτώση της απόδοσης (Hettenhaus, 1998).

### **2.2 Οργανισμοί για την παραγωγή βιοαιθανόλης από μελάσα**

Όπως αναφέρθηκε και προηγουμένως, στη βιομηχανική παραγωγή βιοαιθανόλης, η αλκοολική ζύμωση πραγματοποιείται από μικροοργανισμούς, ζύμες, βακτήρια και μύκητες. Στην ενότητα αυτή θα αναφερθούν οι κυριότεροι και πιο συχνά χρησιμοποιούμενοι μικροοργανισμοί στη βιομηχανία παραγωγής βιοαιθανόλης.

#### **2.2.1 Ο ζυμομύκητας *Saccharomyces cerevisiae***

Ο *Saccharomyces cerevisiae* αποτελεί έναν από τους πιο ενδεδειγμένους ερευνηθέντες ευκαρυωτικούς οργανισμούς στη μοριακή και κυτταρική βιολογία.

Ανήκει στο γένος των σακχαρομυκήτων (*saccharomyces*) του βασιλείου των μυκήτων (*fungi*). Η συστηματική του κατάταξη είναι η εξής:

Βασίλειο: Mycota

Συνομοταξία: Ascomycota

Υποσυνομοταξία: Saccharomycotina

Ομοταξία: Saccharomycetes

Τάξη: Saccharomycetales

Οικογένεια: Saccharomycetaceae

Γένος: *Saccharomyces*

Είδος: *S. cerevisiae*



Είναι μονοκύτταρος οργανισμός ωοειδούς σχήματος, μήκους 10μm και πλάτους 5μm , ο οποίος πολλαπλασιάζεται με εκβλάστηση (budding). Πιστεύεται ότι απομονώθηκε αρχικά από τη φλούδα των σταφυλιών, και γενικώς θεωρείται ως το πιο χρήσιμο είδος ζύμης, καθώς χρησιμοποιείται από τα αρχαία χρόνια για την παρασκευή ψωμιού και αλκοολούχων ποτών. Είναι επίσης σημαντικό το γεγονός ότι ο *S. cerevisiae* έχει αναγνωριστεί από τον αμερικανικό οργανισμό τροφίμων και φαρμάκων (FDA) ως ένας γενικά ασφαλής οργανισμός (GRAS – generally regarded as safe).

Η παραγωγή βιοαιθανόλης από ζύμωση με τον *S. cerevisiae* επηρεάζεται άμεσα από την παρουσία ή όχι οξυγόνου. Ο *S. cerevisiae* μπορεί να μεταβολίσει σάκχαρα όπως η γλυκόζη, είτε εξ' ολοκλήρου σε CO<sub>2</sub> και νερό παρουσία οξυγόνου (αεροβίωση), είτε σε αιθανόλη και CO<sub>2</sub> απουσία οξυγόνου (αναεροβίωση). Κατά την αεροβίωση, η γλυκόζη οξειδώνεται πλήρως και απελευθερώνεται όλη η βιοχημική ενέργεια που περιέχεται στο μόριό της. Αυτή η ενέργεια χρησιμοποιείται από τον σακχαρομύκητα ώστε να επιβιώσει, να αναπτυχθεί και να πολλαπλασιαστεί. Έτσι κάτω από αερόβιες συνθήκες παράγεται περισσότερη βιομάζα και ελάχιστη αιθανόλη. Στην αναεροβίωση, η οξείδωση της γλυκόζης είναι ελλιπής, οπότε παράγεται πολύ λιγότερη ενέργεια και η ζύμη πολλαπλασιάζεται ελάχιστα, αλλά παράγεται σημαντική ποσότητα αιθανόλης. Η ανάπτυξη της ζύμης τελικώς σταματά, διότι συστατικά απαραίτητα για την ανάπτυξη του κυττάρου, όπως ακόρεστα λιπαρά οξέα και στερόλες, δεν μπορούν να συντεθούν χωρίς την παρουσία οξυγόνου. Συνεπώς, ο *S. cerevisiae* αποδίδει καλύτερα υπό μικροαερόβιες συνθήκες, με παροχή

συγκεκριμένων μικρο-ποσοτήτων οξυγόνου, οι οποίες τυπικά κυμαίνονται μεταξύ 0,05 και 0,1 mm Hg ως πίεση οξυγόνου. Υψηλότερες από αυτές τιμές θα προωθήσουν την κυτταρική ανάπτυξη εις βάρος της παραγωγικότητας σε αιθανόλη (φαινόμενο Pasteur) (Roehr, 2001). Ωστόσο, έχει αποδειχθεί ότι η παραγωγή βιοαιθανόλης κάτω από αερόβιες συνθήκες είναι εφικτή, δεδομένων υψηλών συγκεντρώσεων γλυκόζης (>250 g/l) στο διάλυμα ζύμωσης (φαινόμενο Crabtree). (Mousdale, 2008; Τόσης, 2008).

Η ικανότητα του *S. cerevisiae* να παράγει μεγάλα ποσά αιθανόλης από αρκετά είδη σακχάρων, τον καθιστά ως το πιο διαδεδομένο και εμπορικό είδος ζύμης που χρησιμοποιείται στη βιομηχανική παραγωγή βιοαιθανόλης από σάκχαρα ή άμυλο. Τα σάκχαρα τα οποία μπορεί να μεταβολίσει ταχέως είναι τα εξής: γλυκόζη, φρουκτόζη, σακχαρόζη, γαλακτόζη, μαννόζη και μαλτόζη. Επίσης μπορεί να μεταβολίσει βραδέως τους δισακχαρίτες τρεχαλόζη και ισομαλτόζη, τους τρισακχαρίτες ραφινόζη και μαλτοτριόζη, την πεντόζη ριβόζη και το γλυκουρονικό οξύ. Αντιθέτως, δεν μπορεί να μεταβολίσει την κελλοβιόζη, τη λακτόζη, την ξυλόζη (εκτός από μια ελάχιστη αναγωγή σεξυλιτόλη), τη ραμνόζη, τη σορβόζη και την μαλτοτετραόζη (Mousdale, 2008). Ο *S.cerevisiae* μπορεί να αναπτύσσεται και να ζυμώνει σε θερμοκρασίες 28-35°C και pH 3,5 έως 6 (Cyr, 2006). Συνήθως παράγει 10-15% (v/v) αιθανόλη με παραγωγικότητα περίπου 2,5 gr/l ανά ώρα. Η απόδοσή του σε αιθανόλη μπορεί να ξεπεράσει τα 0,45g/g γλυκόζης κάτω από βέλτιστες συνθήκες, ενώ έχει υψηλό ρυθμό ανάπτυξης, ως και 1,3g/gκυτταρικής μάζας ανά ώρα. Επίσης, χαρακτηρίζεται από μεγάλη αντοχή σε υψηλές συγκεντρώσεις αιθανόλης ως και 100g/l. Επιπλέον, έχει αποδειχθεί ανθεκτικός σε ανασταλτικούς παράγοντες, γεγονός που τον καθιστά κατάλληλο για ζύμωση λιγνινοκυτταρινούχων υλών (Hettenhaus, 1998; Olofsson *et al.*, 2008). Ειδικότερα, όσον αφορά τα κωνοφόρα δέντρα, τα οποία περιέχουν πολύ περισσότερη μαννόζη απ' ότι ξυλόζη, ο *S. cerevisiae* πλεονεκτεί έναντι του 'ανταγωνιστή' του *Zygomonas mobilis*, αφού μπορεί να ζυμώσει ταχέως, όπως αναφέρθηκε, μαννόζη και γαλακτόζη (Galbe and Zacchi, 2002).

Η μετατροπή της σακχαρόζης σε αιθανόλη περιλαμβάνει δύο στάδια: ενζυματική υδρόλυση και κατόπιν ζύμωση των απλών σακχάρων. Η υδρόλυση της σακχαρόζης σε γλυκόζη και φρουκτόζη καταλύεται από το ένζυμο ιμπερτάση (invertase), το οποίο περιέχεται στη ζύμη, σύμφωνα με την εξής αντίδραση:



Έπειτα, πραγματοποιείται αλκοολική ζύμωση της γλυκόζης και της φρουκτόζης προς παραγωγή αιθανόλης και CO<sub>2</sub>, καταλυόμενη από ένα άλλο ένζυμο της ζύμης, που καλείται ζυμάση (zymase). Η ζύμωση περιγράφεται συνοπτικά από την εξής αντίδραση:

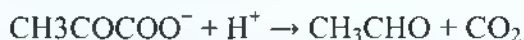


Η ζυμάση αποτελεί ουσιαστικά το μείγμα των ενζύμων που καταλύουν τις επιμέρους αντιδράσεις της αλκοολικής ζύμωσης. Αναλυτικότερα, η ζύμωση της γλυκόζης έχει ως εξής (Εικόνα 2.4):

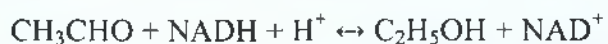
Αρχικά, η γλυκόζη μετατρέπεται σε πυροσταφυλικό οξύ μέσω της γλυκολυτικής οδού (οδός Embden-Meyerhoff) σύμφωνα με την απλουστευμένη αντίδραση:

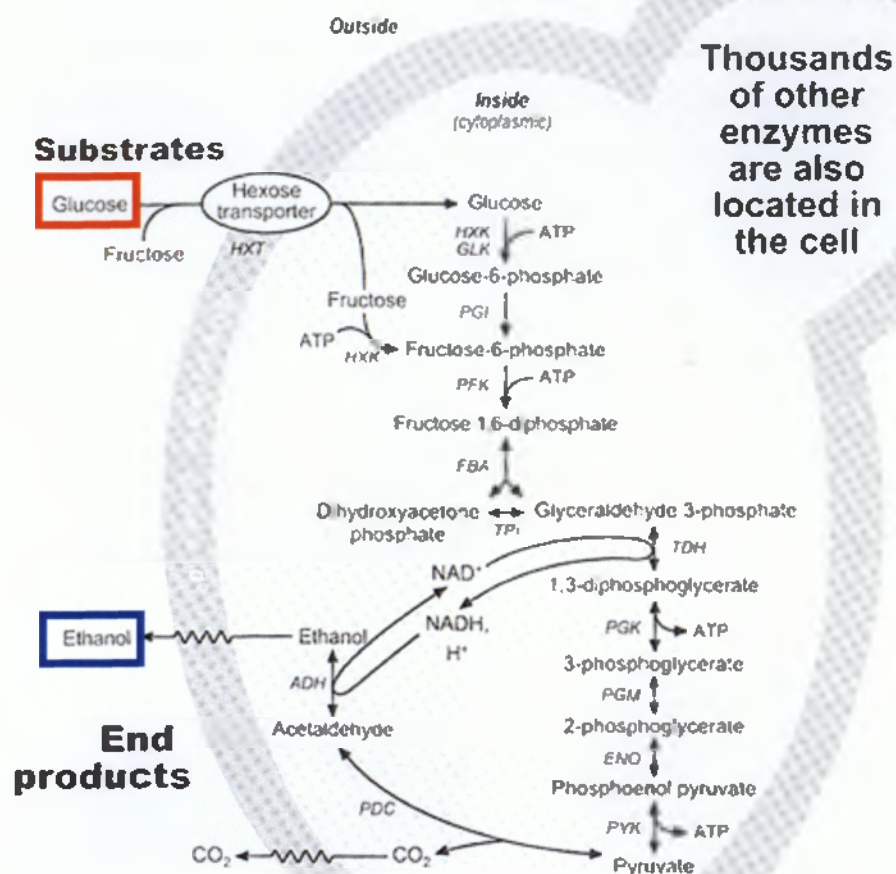


Η αντίδραση αυτή έχει σαν καθαρό αποτέλεσμα την αποθήκευση ενέργειας με τη μετατροπή 2 μορίων ADP σε 2 μόρια ATP. Επίσης έχουμε αναγωγή 2 μορίων NAD<sup>+</sup> και παραγωγή 2 μορίων νερού. Στη συνέχεια, γίνεται αποκαρβοξυλίωση του πυροσταφυλικού οξέος προς ακεταλδεΐδη, που καταλύεται από το ένζυμο ‘αποκαρβοξυλάση του πυροσταφυλικού οξέος’ που έχει σαν συνένζυμο την πυροφωσφορική θειαμίνη:



Τελικά, η ακεταλδεΐδη ανάγεται προς αιθανόλη από το ένζυμο αλκοολική δεϋδρογονάση, με συνένζυμο NADH (Γεωργάτσος, 2001):





**Εικόνα 2.4** Αντιδράσεις αλκοολικής ζύμωσης της γλυκόζης (κόκκινο πλαίσιο) προς παραγωγή αιθανόλης (μπλε πλαίσιο) στον *Saccharomyces cerevisiae* (Boulton *et al.*, 1996; Pretorius, 2000).

### 2.2.2 Το βακτήριο *Zymomonas mobilis*

Το *Zymomonas mobilis* είναι ένα αρνητικό κατά Gram βακτήριο το οποίο ανήκει στο γένος *Zymomonas*. Είναι ραβδοειδούς σχήματος μήκους 2-6 μm και πλάτους 1-1,4 μm. Το πρώτο στέλεχος απομονώθηκε πρώτη φορά το 1911 από τους Baker και Hillier, οι οποίοι του απέδωσαν την “ασθένεια του μηλίτη οίνου” (cider sickness), κατά την οποία το βακτήριο αναπτύσσεται στον αποθηκευμένο μηλίτη και παράγει μεγάλες ποσότητες ακαταλεβήτης, η οποία αλλοιώνει τη γεύση του. Στη συνέχεια απομονώθηκαν και άλλα στελέχη από μηλίτες, ζύθο, χυμό σακχαροκάλαμου, χυμό φοινικόδεντρου και μέλι (Κεφαλά, 2003).

Όπως και ο *S. cerevisiae*, έτσι και αυτό θεωρείται ως γενικά ασφαλής οργανισμός (GRAS). Το *Z. mobilis* μελετάται ως αιθανολοπαραγωγός οργανισμός από τα μέσα της δεκαετίας του '70, λόγω των ασυνήθιστων φυσιολογικών και βιοχημικών χαρακτηριστικών του. Σήμερα χρησιμοποιείται για την παραγωγή βιοαιθανόλης από βιομηχανικές μονάδες, όπως η Arkenol και η DuPont/Broin στις Η.Π.Α., και Iogen στον Καναδά (Μικροβιόκοσμος, 2008). Έχει αναφερθεί πως η τεχνολογία παραγωγής αιθανόλης με χρήση του *Z. mobilis* αποτελεί μια πραγματικότητα και πως θα αντικαταστήσει την τεχνολογία των ζυμών στην εμπορική παραγωγή βιοαιθανόλης (Duff and Murray, 1996). Η συστηματική του κατάταξη έχει ως εξής:

Βασίλειο: Bacteria

Συνομοταξία: Proteobacteria

Ομοταξία:  $\alpha$ -Proteobacteria

Τάξη: Sphingomonadales

Οικογένεια: Sphingomonadaceae

Γένος: *Zymomonas*

Είδος: *Z. mobilis*

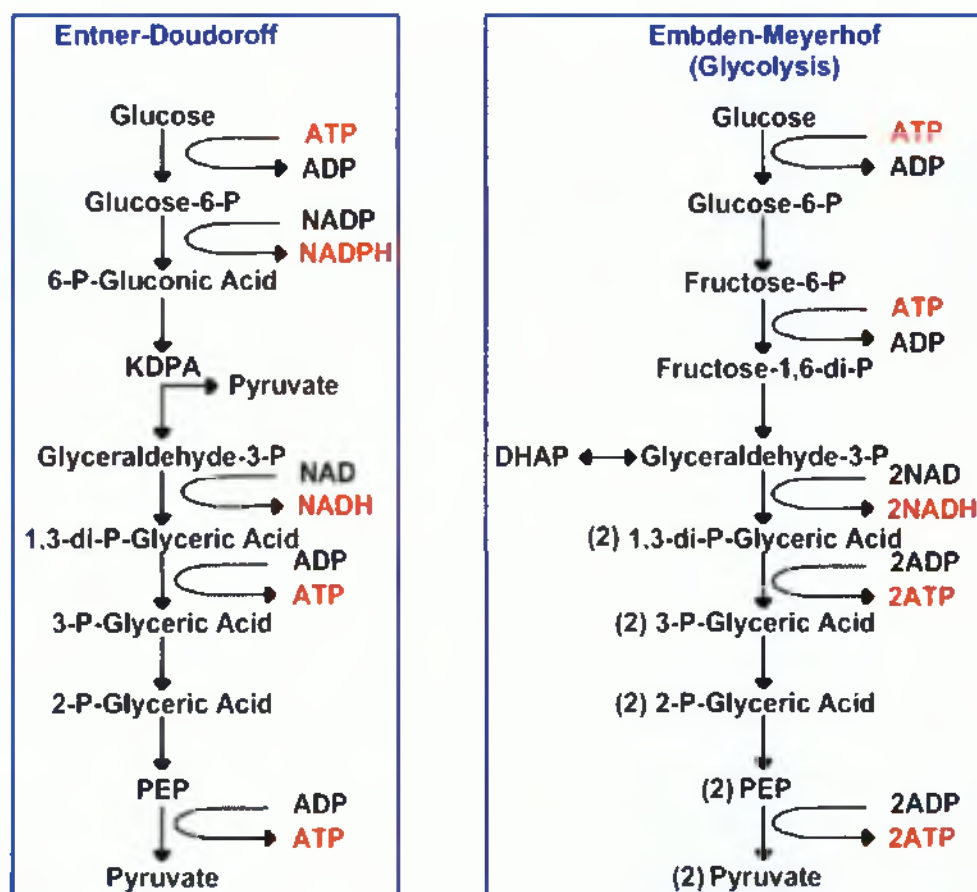


Το *Z. mobilis* είναι ένας αεροανεκτικός οργανισμός (προαιρετικά αερόβιος/αναερόβιος), δηλαδή το οξυγόνο δεν απαιτείται ούτε βελτιώνει την ανάπτυξη. Ο μεταβολισμός του γίνεται αυστηρώς με ζύμωση, ωστόσο, η παραγωγή αιθανόλης είναι εφικτή και σε αερόβιες συνθήκες, εφόσον το βακτήριο δεν επιδεικνύει το φαινόμενο Pasteur (Roehr, 2001).

Το *Z. mobilis* πλεονεκτεί έναντι του *S. cerevisiae* και γενικά των ζυμών σε αρκετούς τομείς. Εμφανίζει απλές ζυμωτικές απαιτήσεις και παράγει καθαρότερο προϊόν σε πολύ υψηλές συγκεντρώσεις χωρίς ιδιαίτερη αναστολή. Επίσης, οι ρυθμοί παραγωγικότητας είναι 2,5 με 5 φορές μεγαλύτεροι απ' ό,τι στις ζύμες, ενώ η απόδοση σε αιθανόλη αγγίζει το θεωρητικό μέγιστο (0,49-0,5 g/g γλυκόζης), 5-10% υψηλότερη από ζύμωση με τον *S. cerevisiae* (Mousdale, 2008; Μικροβιόκοσμος, 2008).

Αυτά τα πλεονεκτήματα οφείλονται στο εξής ιδιαίτερο χαρακτηριστικό του *Z. mobilis*: αν και αναερόβιος οργανισμός, ζυμώνει μέσω της οδού Entner-Doudoroff, (Εικόνα 2.5) η οποία γενικά χρησιμοποιείται μόνο από υποχρεωτικώς αερόβια

βακτήρια. Είναι ανίκανο να αποκτήσει ενέργεια με άλλους τρόπους, καθώς στερείται ενζύμων που απαιτούνται στην γλυκολυτική οδό Embden-Meyerhof-Parnas (Εικόνα 2.5) και στον κύκλο του τρικαρβοξυλικού οξέος. Ο μεταβολισμός της γλυκόζης μέσω της οδού Entner-Doudoroff παράγει 1 μόριο ATP ανά μόριο γλυκόζης, ενώ οι ζύμες μεταβολίζουν τη γλυκόζη αναερόβια μέσω της γλυκόλυσης, αποκτώντας 2 μόρια ATP ανά μόριο γλυκόζης. Αυτή η χαμηλή ενεργειακή απόδοση αναγκάζει το βακτήριο σε υψηλότερους ρυθμούς κατανάλωσης γλυκόζης και παραγωγής αιθανόλης στην προσπάθεια να συντηρήσει την ανάπτυξη. Επίσης, συσσωρεύεται λιγότερη βιομάζα, καθώς περισσότερη γλυκόζη διοχετεύεται για την επιτυγχάνονται με ελάχιστη έκλυση θερμότητας, μια σημαντική παράμετρος που πρέπει να ελεγχθεί στην περίπτωση ζύμωσης μεγάλης κλίμακας από ζύμες. Η οδός Entner-Doudoroff αποτελεί τη βάση για τη δυνατότητα του *Z. mobilis* ως ένα βιομηχανικά σημαντικό μικροοργανισμό.



**Εικόνα 2.5** Η χαμηλή ενεργειακή απόδοση μέσω της οδού Entner-Doudoroff (1 μόριο ATP) αναγκάζει το βακτήριο σε υψηλότερους ρυθμούς κατανάλωσης γλυκόζης και παραγωγής αιθανόλης στην προσπάθεια να συντηρήσει την ανάπτυξη.

Ένα ακόμα πλεονέκτημα του *Z. mobilis* είναι ότι κατά τη ζύμωση δεν 'χάνεται' υπόστρωμα γλυκόζης για την παραγωγή παραπροϊόντων (γλυκερίνη και ανώτερες αλκοόλες), όπως συμβαίνει με τις ζύμες. Επιπλέον, οι βέλτιστες θερμοκρασίες για τον οργανισμό κυμαίνονται μεταξύ 30 και 40°C, σημαντικό γεγονός, όσον αφορά την περίπτωση ταυτόχρονης σακχαροποίησης και ζύμωσης (Duff and Murray, 1996; Mousdale, 2008; Roehr, 2001; Μικροβίος, 2008).

Τα πλεονεκτήματα του *Zygomonas mobilis* δεν σταματούν εδώ. Το *Z. mobilis* επιδεικνύει αντοχή σε υψηλές συγκεντρώσεις αιθανόλης που ξεπερνούν το 13% (w/v). Αυτό οφείλεται στο γεγονός ότι η λιπιδική μεμβράνη του βακτηρίου παρουσιάζει μεγάλη περιεκτικότητα σε οπανοειδή και βαξενικό οξύ. Όπως συμβαίνει και με τις στερόλες των ευκαρυωτών, αυτές οι ενώσεις δρουν ως μεμβρανικοί σταθεροποιητές, ισχυροποιώντας τις δυνάμεις Van der Waals μεταξύ των λιπιδίων, ώστε να μειώνεται η διαπερατότητα της μεμβράνης σε μικρά μόρια (Κεφαλά, 2003). Η πλασματική μεμβράνη έχει μια φωσφολιπιδική σύνθεση, με κύριο συστατικό την φωσφατιδυλοαιθανολαμίνη και μικρότερα ποσά φωσφατιδυλγλυκερόλης, καρδιολιπίνης, διμεθυλ-φωσφατιδυλοαιθανολαμίνης και φωσφατιδυλοχολίνης. Σε περιβάλλοντα με υψηλές συγκεντρώσεις αιθανόλης και γλυκόζης συμβαίνει μείωση της φωσφατιδυλοαιθανολαμίνης και της φωσφατιδυλγλυκερόλης και αύξηση της φωσφατιδυλοχολίνης (microbewiki.kenyon.edu). Επιπλέον, η αναστολή από το υπόστρωμα δεν είναι σοβαρή για αυτό το βακτήριο, όπως έχει δείχθει. Όλα τα στελέχη αναπτύσσονται σε 20% (w/v) γλυκόζη, ενώ η ανάπτυξη μερικών στελεχών μπορεί να συνεχιστεί μέχρι και σε 40% (w/v) γλυκόζη, αφού περάσουν μια μεγάλη φάση εφησυχασμού (Roehr, 2001; Κεφαλά, 2003).

Τέλος, ένα βασικό πλεονέκτημα των κυττάρων του *Z. mobilis* για τη βιομηχανική παραγωγή αιθανόλης, είναι η ικανότητά τους να παρουσιάζουν κροκίδωση. Έτσι αποφεύγεται το δαπανηρό στάδιο της φυγοκέντρωσης για το διαχωρισμό των κυττάρων από το υπερκείμενο (Κεφαλά, 2003).

Τα πλεονεκτήματα του *Z. mobilis* έρχεται να αντισταθμίσει μια σειρά μειονεκτημάτων. Το κύριο μειονέκτημά του είναι ότι, σε αντίθεση με άλλα βακτήρια, μπορεί να μεταβολίσει μόνο γλυκόζη, φρουκτόζη και σακχαρόζη. Πιο συγκεκριμένα, όλα τα στελέχη του βακτηρίου μπορούν να ζυμώσουν γλυκόζη, αλλά μόνο το 50% από αυτά μπορεί να μετατρέψει τη σακχαρόζη σε γλυκόζη. Η αδυναμία ζύμωσης

πεντοζών από τον 'άγριο' τύπο του βακτηρίου, περιόρισε αρχικά την εμπορική του χρήση.

Οι ειδικοί ρυθμοί κατανάλωσης σακχάρων και παραγωγής αιθανόλης είναι μέγιστοι όταν χρησιμοποιείται ως υπόστρωμα η γλυκόζη. Αντίθετα, παρατηρείται μειωμένη κυτταρική ανάπτυξη κατά τη ζύμωση φρουκτόζης ή σακχαρόζης. Η χρήση της σακχαρόζης προκαλεί παραγωγή υπερβολικής ποσότητας ανεπιθύμητων παραπροϊόντων, όπως λεβάνη και σορβιτόλη, κάτι που αυξάνει τη βιομάζα και περιορίζει την παραγωγή αιθανόλης. Ακόμη, αναστολή στη ζύμωση δημιουργεί και η παραγωγή άλλων παραπροϊόντων, όπως το οξικό, το μυρμηγκικό, το γαλακτικό ή το προπιονικό οξύ, καθώς και υψηλότερες συγκεντρώσεις οξυγόνου και διοξειδίου του άνθρακα. Ωστόσο, η αιθανόλη από μόνη της φαίνεται να είναι ο μεγαλύτερος ανασταλτικός παράγοντας λόγω της επιρροής της στην πλασματική μεμβράνη, καθώς αυξάνει τη διαπερατότητά της επιτρέποντας την απώλεια κάποιων συνενζύμων της γλυκολυτικής οδού Entner-Douduroff.

Ένα ακόμη μειονέκτημα είναι ότι το *Z. mobilis* δεν παρουσιάζει καμία ανθεκτικότητα σε υψηλές οσμωτικές πιέσεις, που προέρχονται από υψηλές συγκεντρώσεις αλάτων, ενώ παρουσιάζει μικρότερη αντοχή σε αναστολές που προέρχονται από την υδρόλυση της λιγνοκυτταρινικής βιομάζας, γεγονός που καθιστά απαραίτητο ένα στάδιο αποτοξίνωσης πριν από τη ζύμωση. Τέλος, οι βέλτιστες τιμές pH για το *Z. mobilis* κυμαίνονται από 4 έως 5, οπότε το μέσο πρέπει να αποστειρώνεται όταν χρησιμοποιείται αυτός ο μικροοργανισμός (Mousdale, 2008; Olofsson et al., 2008; Roehr, 2001; Κεφαλά, 2003; microbewiki.kenyon.edu)

Η απάντηση στο ποιος οργανισμός, το *Z. mobilis* ή ο *S. cerevisiae*, είναι καταλληλότερος για τη βιομηχανική παραγωγή βιοαιθανόλης, πρέπει να αποφασιστεί με βάση την ευκολία μεταχείρισης. Η υψηλή απόδοση σε αιθανόλη και η χαμηλή παραγωγή βιομάζας από το *Z. mobilis* αντισταθμίζεται από την αναγκαιότητα αποστείρωσης του μέσου της καλλιέργειας. Επομένως, από οικονομική σκοπιά, γενικά προτιμάται ο *S. cerevisiae* (Roehr, 2001).

### 2.2.3 Άλλοι μικροοργανισμοί

Άλλα παραδείγματα αιθανολοπαραγωγών μικροοργανισμών που ερευνώνται εντατικά από τους επιστήμονες, είναι: τα βακτήρια *Escherichia coli*, *Bacillus subtilis*, *Bacillus stearothermophilus*, *Klebsiella oxytoca*, *Erwinia chrysanthemi*, *Clostridium sporogenes*, *Clostridium indolis*, *Leuconostoc mesenteroids*, *Streptococcus lactis* και

οι μύκητες *Kluyveromyces marxianus*, *Pichia stipitis*, *Pachysolen tanophilus* και *Candida shehatae*.

### 2.3 Μέθοδοι βελτίωσης παραγωγής βιοαιθανόλης από μελάσα

Προκειμένου να αυξηθεί η απόδοση της διαδικασίας παραγωγής βιοαιθανόλης εφαρμόζονται μέθοδοι που βελτιώνουν είτε την αντοχή και παραγωγικότητα των χρησιμοποιούμενων μικροοργανισμών, είτε τη μέθοδο ζύμωσης.

#### 2.3.1 Γενετικά τροποποιημένοι μικροοργανισμοί

Η βιοτεχνολογία έρχεται να δώσει λύσεις σε προβλήματα που περιορίζουν την αποτελεσματικότητα της ζύμωσης και αποτελεί το κλειδί για ανταγωνιστική παραγωγή βιοαιθανόλης στο μέλλον. Η γενετική τροποποίηση των μικροοργανισμών αποσκοπεί βραχυπρόθεσμα στη βελτίωση της απόδοσης και της παραγωγικότητας, και ειδικότερα στην επίτευξη ταυτόχρονης χρησιμοποίησης μεγάλης ποικιλίας σακχάρων, με μια συνολική απόδοση της τάξης του 90%. Επίσης, στοχεύεται μείωση της αναστολής της δράσης των οργανισμών από διάφορους παράγοντες, όπως π.χ. η αιθανόλη. Μακροπρόθεσμα, αναμένεται η επίτευξη ζύμωσης αρχικά σε θερμοκρασίες 50 με 65°C, και αργότερα σε θερμοκρασίες τουλάχιστον 70°C. Ακόμη, στοχεύεται μείωση του pH σε τιμές 3,5 με 4 με σκοπό τη μείωση μολύνσεων, καθώς και πλήρης εξάλειψη αναστολών και πρόσθεση αξίας μέσω παραγωγής παραπροϊόντων. Η επεξεργασία του γενετικού υλικού είναι ευκολότερη στα βακτήρια απ' ό τι στις ζύμες. Σήμερα, χρησιμοποιούνται ανασυνδυασμένα στελέχη των *Saccharomyces cerevisiae*, *Zymomonas mobilis*, *Escherichia coli*, *Klebsiella oxytoca* και *Erwinia chrysanthemi*. Στην επόμενη γενιά ανήκουν τα *Bacillus stearothermophilus*, *Clostridium* και *Lactobacillus*, ικανά να ζυμώνουν σε θερμοκρασίες πολύ υψηλές σε σύγκριση με τις ζύμες (Hettenhaus, 1998; Roehr, 2001).

##### 2.3.1.1 Γενετική βελτίωση του *Saccharomyces cerevisiae*

Τα γενετικά τροποποιημένα στελέχη του *S. cerevisiae* παράγουν συνήθως 10-15% (v/v) αιθανόλη σε pH 3,5-4,5 στους 32-38°C, με παραγωγικότητα ως και 4,5 g L<sup>-1</sup> h<sup>-1</sup>. Αντέχουν σε συγκεντρώσεις αιθανόλης ως και 20% (v/v) στους 30°C, ενώ εμφανίζουν υψηλή αντοχή στην οσμωτική πίεση σε συγκέντρωση σακχάρων ως και 38% (w/v), χωρίς να προκαλείται βλάβη στη ζύμη. Μειονέκτημα αποτελεί η γενετική αστάθεια η οποία όμως αποφεύγεται με τροποποιημένα χρωμοσώματα, οπότε και

επιδεικνύεται σταθερή απόδοση σε πολλαπλούς κύκλους, υπερβαίνοντας τις χίλιες ώρες χωρίς μείωση της ζυμωτικής ικανότητας (Hettenhaus, 1998).

#### **2.3.1.2 Γενετική βελτίωση του *Zymomonas mobilis***

Τα ανασυνδυασμένα στελέχη έχουν υψηλή αντοχή στην αιθανόλη (περίπου 11% v/v) στους 32°C. αναπτύσσονται σχετικά γρήγορα και επιδεικνύουν καλή παραγωγικότητα. Το εύρος τιμών του pH είναι 5 ως 6 και η απόδοση σε μη ασηπτικές συνθήκες είναι αμφισβητήσιμη. Άλλο μειονέκτημα των νέων στελεχών είναι η υψηλή ευαισθησία σε ουσίες-αναστολείς που ελευθερώνονται κατά την προεπεξεργασία (π.χ. οξικό οξύ), αλλά και η εκδήλωση φαινοτυπικής αστάθειας. Τέλος, η θερμοκρασία περιορίζεται στους 35°C και ο οργανισμός είναι ευαίσθητος σε περιορισμό υποστρώματος (Hettenhaus, 1998; Mousdale, 2008; Κεφαλά, 2003).

#### **2.3.1.3 Γενετική βελτίωση του βακτηρίου *Escherichia coli***

Μια σειρά από τυχαίες μεταλλάξεις οδήγησαν στην εμφάνιση του στελέχους KO11 του βακτηρίου *E. coli*, το οποίο κατείχε το οπερόνιο PET από το βακτήριο *Z. mobilis*. Το οπερόνιο PET περιέχει τα γονίδια που κωδικοποιούν την παραγωγή της αλκοολικής αφυδρογονάσης (*adhB*) και πυρουβικής αποκαρβοξυλάσης (*pdc*) που ελέγχουν τα δύο τερματικά βήματα για την μετατροπή του πυρουβικού οξέος σε αιθανόλη. Το στέλεχος KO11 παρουσιάζει υψηλή παραγωγικότητα και ανάπτυξη, περίπου δύο φορές περισσότερο από τις ζύμες. Επίσης, μπορεί να μετατρέψει πλήρως γλυκόζη, ξυλόζη και αραβινόζη σε αιθανόλη με υψηλές αποδόσεις. Πλεονέκτημα επίσης αποτελεί και η ύπαρξη εμπειρίας χειρισμού του *E. coli* σε βιομηχανική κλίμακα. Κύριο μειονέκτημά του είναι ότι η κοινή γνώμη το θεωρεί παθογόνο μικροοργανισμό. Επιπλέον, το στέλεχος εμφανίζει ευαισθησία στη θερμοκρασία και μικρή αντοχή στην αιθανόλη. Στους 30°C θα επιβιώσει αλλά δεν θα αναπτυχθεί σε 7-8% (v/v) αιθανόλη (Hettenhaus, 1998; Olofsson et al., 2008).

#### **2.3.1.4 Γενετική βελτίωση του βακτηρίου *Klebsiella oxytoca***

Το βακτήριο *K. oxytoca* απομονώθηκε από μύλους χαρτοπολτού και χαρτιού και αναπτύσσεται γύρω από άλλες πηγές από ξύλο. Μπορεί να μεταβολίσει εξόζες και πεντόζες, και να χρησιμοποιήσει κελλοβιόζη και κελλοτριόζη, αλλά δεν εκκρίνει ενδογλουκανάση. Μια ερευνητική ομάδα του πανεπιστημίου της Φλόριδας ενσωμάτωσε στο στέλεχος *K. oxytoca* M5A1 πλασμίδιο που περιείχε το οπερόνιο

PET. Αυτό οδήγησε σε αυξημένη παραγωγή αιθανόλης από γλυκόζη (94-98% της θεωρητικής τιμής). Οι βέλτιστες συνθήκες είναι  $\text{pH} < 5$  και θερμοκρασία ίση με  $35^\circ\text{C}$ . Το *K. oxytoca* είναι ιδανικό βακτήριο για συστήματα SSF (Mousdale, 2008).

### 2.3.2 Χρήση νέων τεχνολογιών ζύμωσης

Η βιομηχανική παραγωγή βιοαιθανόλης μπορεί να διεξαχθεί με την εφαρμογή τριών κύριων μεθόδων ζύμωσης: διεργασία διαλείποντος (batch), ημι-διαλείποντος (fed batch) και συνεχούς (continuous) έργου. Οι διεργασίες διαλείποντος και συνεχούς έργου είναι αυτές που χρησιμοποιούνται ευρέως. Η ανακύκλωση των κυττάρων μπορεί να εφαρμοστεί επωφελώς σε οποιαδήποτε από αυτές τις μεθόδους, αλλά το υπόστρωμα πρέπει να είναι ελεύθερο από αδιάλυτα υλικά, τα οποία θα μπορούσαν να συσσωρευτούν μαζί με τα κύτταρα κατά τη φυγοκέντρωση σε ποσά μη αποδεκτά για το σύστημα. Όλα αυτά τα συστήματα έχουν κάποια πλεονεκτήματα αλλά και μειονεκτήματα. Ο τύπος της διεργασίας πρέπει να επιλέγεται σύμφωνα με τα χαρακτηριστικά του υποστρώματος, το επενδυτικό και το λειτουργικό κόστος. Η παραγωγικότητα και η απόδοση είναι επίσης σημαντικοί παράγοντες για την επιλογή του συστήματος. Ως ιδανική διεργασία για τη βιομηχανική παραγωγή θεωρείται αυτή που απαιτεί ελάχιστο κόστος και παρουσιάζει μέγιστη ανάκτηση προϊόντος. Άλλες μέθοδοι που βελτιώνουν την παραγωγή είναι η τεχνολογία ακινητοποίησης των κυττάρων και η τεχνολογία 'very high gravity' (VHG).

#### 2.3.2.1 Διεργασία διαλείποντος έργου

Σήμερα η βιοαιθανόλη παράγεται κυρίως με την ίδια μέθοδο που αναπτύχθηκε για τη βιομηχανική παραγωγή αλκοολούχων ποτών, πριν από τουλάχιστον εκατό χρόνια. Αυτή η μέθοδος βασίζεται στην απλή ζύμωση κατά παρτίδες (batch) των πλούσιων σε υδατάνθρακες υποστρωμάτων. Κατά τη μέθοδο αυτή, το υπόστρωμα και τα κύτταρα που αναπτύχθηκαν ξεχωριστά, τροφοδοτούνται στον αντιδραστήρα μαζί με τα απαιτούμενα θρεπτικά συστατικά και ένζυμα. Συνήθως, ο χρόνος που απαιτείται για την πλήρη κατανάλωση του υποστρώματος είναι 36 με 48 ώρες. Η θερμοκρασία διατηρείται στους  $10-30^\circ\text{C}$  και το αρχικό  $\text{pH}$  προσαρμόζεται στην τιμή 4,5. Αναλόγως με τη φύση του υποστρώματος, η αποτελεσματικότητα της μετατροπής κυμαίνεται μεταξύ 90 και 95% της θεωρητικής τιμής, με τελική συγκέντρωση αιθανόλης 10-16% (w/v). Υπάρχει μια συγκεκριμένη περίοδος αντίδρασης για την καλλιέργεια, κατά την οποία οι συγκεντρώσεις των

κυττάρων, του υποστρώματος (υδατάνθρακες, θρεπτικά άλατα, βιταμίνες) και των προϊόντων μεταβάλλονται. Αυτή η ταχεία ανάπτυξη επιβραδύνεται κατά το τέλος της περιόδου καλλιέργειας, με το ρυθμό να προσεγγίζει μηδενική τιμή. Μετά από 50-60 ώρες το ζυμωμένο υλικό οδηγείται προς απόσταξη. Έπειτα, ο αντιδραστήρας πλένεται, αποστειρώνεται και ανατροφοδοτείται με μια νέα παρτίδα. Ο χρόνος που 'χάνεται' κατά το άδειασμα, τον καθαρισμό και την πλήρωση του αντιδραστήρα, ευθύνεται για τη μείωση του ενεργού όγκου του αντιδραστήρα κατά 20%.

Σε μια προσπάθεια αύξησης της παραγωγικότητας αλλά και διατήρησης της απλότητας της διαδικασίας, έχει εφαρμοστεί ανακύκλωση των κυττάρων σε πολλές περιπτώσεις. Όταν η ζύμωση στην πρώτη παρτίδα έχει τελειώσει, η ζύμη ανακτάται και επαναχρησιμοποιείται στην επόμενη παρτίδα. Αυτή η τεχνική ελαττώνει το χρόνο ολοκλήρωσης της ζύμωσης κατά 60-70%, σε σχέση με τις παραδοσιακές μεθόδους. Αυτό συμβαίνει διότι μειώνεται η λανθάνουσα φάση στην επόμενη παρτίδα, παρέχοντας μια μεγάλη ποσότητα εμβολίου. Επίσης, η αυξημένη αρχική συγκέντρωση βιομάζας στην επόμενη παρτίδα ελαττώνει την ανάγκη κατανάλωσης υποστρώματος για κυτταρική ανάπτυξη, βελτιώνοντας την απόδοση σε αιθανόλη (Roehr, 2001; Cyr, 2006).

Συνήθως, χρησιμοποιούνται αρκετοί αντιδραστήρες οι οποίοι λειτουργούν διαδοχικά προκειμένου να παρέχεται συνεχής ροή στο σύστημα απόσταξης. Η συνολική παραγωγικότητα αυτής της διαδικασίας είναι περίπου 1.8-2,5 kg αιθανόλης ανά m<sup>3</sup> ανά ώρα. Προκειμένου να αυξηθεί η αποτελεσματικότητα της ζύμωσης, εφαρμόζεται η μέθοδος 'Melle Boiot' στα περισσότερα αποστακτήρια της Βραζιλίας. Αυτή η μέθοδος περιλαμβάνει ανάκτηση μέσω φυγοκέντρωσης της ζωντανής ζύμης από το ζυμωμένο διάλυμα και επανεμβολιασμό της σε άλλους αντιδραστήρες (Roehr, 2001; Cyr, 2006).

### **2.3.2.2 Διεργασία ημι-διαλείποντος έργου**

Αυτή η μέθοδος θεωρείται ως ένας συνδυασμός των διεργασιών διαλείποντος και συνεχούς έργου, και είναι πολύ δημοφιλής στη βιομηχανία της βιοαιθανόλης. Σε αυτή τη μέθοδο το θρεπτικό διάλυμα που περιέχει υπόστρωμα, καλλιέργεια ζύμης, απαιτούμενα μέταλλα και βιταμίνες, τροφοδοτείται περιοδικά καθ' όλη τη διεργασία, ενώ η εκροή γίνεται ασυνεχώς. Ο στόχος αυτού του συστήματος είναι να περιοριστεί η αναστολή λόγω υψηλών συγκεντρώσεων υποστρώματος ή αιθανόλης. Η διαδικασία ξεκινά όπως η μέθοδος διαλείποντος έργου, αλλά με έναν όγκο σημαντικά μικρότερο

από το μέγιστο ενεργό όγκο του αντιδραστήρα. Όταν επιτευχθεί επαρκής πυκνότητα εμβολίου, ξεκινά μια στρατηγική τροφοδοσίας. Πολλές διαφορετικές τεχνικές τροφοδοσίας μπορούν να εφαρμοστούν. Ένας τρόπος είναι η τροφοδοσία του θρεπτικού διαλύματος με σταθερό ρυθμό ωσότου μέγιστος όγκος πληρωθεί. Επίσης, τροφοδοσία κατά εκθετικό τρόπο που ακολουθεί τις απαιτήσεις της βιομάζας μπορεί να δώσει αποτελεσματικότερη μετατροπή υποστρώματος σε προϊόν. Ένας τρίτος τρόπος τροφοδοσίας των θρεπτικών στον αντιδραστήρα, γίνεται μέσω ενός συστήματος ελέγχου. Η συγκέντρωση των σακχάρων μπορεί να μετρηθεί από παράγοντες όπως ο ρυθμός παραγωγής CO<sub>2</sub>. Όταν λοιπόν η συγκέντρωση των σακχάρων πέσει κάτω από ένα συγκεκριμένο επίπεδο, η αντλία τροφοδοσίας ενεργοποιείται και παρέχει το απαιτούμενο ποσό υποστρώματος.

Η μέθοδος ημι-διαλείποντος έργου προτιμάται όταν η εφαρμογή συνεχούς διεργασίας είναι αδύνατη (π.χ. λόγω μετάλλαξης ή μόλυνσης των μικροοργανισμών) ή όταν η λειτουργία διαλείποντος έργου καταλήγει σε χαμηλές τιμές παραγωγικότητας (Roehr, 2001; Cyt, 2006).

### **2.3.2.3 Διεργασία συνεχούς έργου**

Η συνεχής ζύμωση εξαλείφει τον μη παραγωγικό χρόνο αδράνειας της μεθόδου batch, που περιλαμβάνει όπως είπαμε άδειασμα, καθαρισμό, αποστείρωση, πλήρωση του αντιδραστήρα, καθώς και το χρόνο της λανθάνουσας φάσης του κύκλου ανάπτυξης των κυττάρων. Το υπόστρωμα, η καλλιέργεια και άλλα θρεπτικά συστατικά τροφοδοτούνται συνεχώς σε έναν αναδευόμενο αντιδραστήρα. Τα σάκχαρα καταναλώνονται κατά μεγάλο μέρος, ενώ αιθανόλη και νέα κυτταρική μάζα παράγονται. Το προϊόν που αφαιρείται συνεχώς από το άνω μέρος του αντιδραστήρα, περιέχει αιθανόλη, κύτταρα και υπολειμματικά σάκχαρα. Ο όγκος διατηρείται σταθερός. Επίσης, παρέχεται αέρας προκειμένου να διατηρηθεί η κυτταρική ανάπτυξη. Η λειτουργία του αντιδραστήρα γίνεται υπό στατικές συνθήκες, οπότε η θερμοκρασία και η συγκέντρωση του διαλύματος είναι ομοιόμορφη παντού. Στον βιοαντιδραστήρα, νέα κύτταρα γεννιούνται συνεχώς, αλλά και αφαιρούνται συνεχώς. Στατικές συνθήκες εγγυώνται ίσους ρυθμούς ανάπτυξης και αφαίρεσης των κυττάρων, με αποτέλεσμα σταθερή συγκέντρωση βιομάζας. Μια κυτταρική πυκνότητα ίση με 10-12 g/L θεωρείται τυπική. Η συνολική παραγωγικότητα για έναν απλό αντιδραστήρα C.S.T.R. (που χρησιμοποιεί ζύμη υψηλής παραγωγικότητας) είναι περίπου 6g L<sup>-1</sup> h<sup>-1</sup> αιθανόλη, η οποία είναι τριπλάσια της μέσης

παραγωγικότητας μιας batch διεργασίας. Επιπλέον, εφόσον οι μικροοργανισμοί παραμένουν συνεχώς στην εκθετική φάση ανάπτυξης, αυξάνεται η εξαρτώμενη από το χρόνο παραγωγικότητα. Αυτό επιτρέπει μεγαλύτερη παραγωγή ανά μονάδα όγκου του σκεύους, οπότε η μείωση του κόστους μπορεί να αξιοποιηθεί στην κατασκευή αντιδραστήρων μικρότερου μεγέθους.

Έχειδειχθεί ότι χαμηλοί ρυθμοί ζύμωσης συνδέονται με τον κυτταρικό θάνατο που προκαλεί η έλλειψη οξυγόνου. Η απαίτηση σε οξυγόνο μπορεί να εξαλειφθεί με την πρόσθεση συγκεκριμένων ουσιών (π.χ. Tween 80, εργοστερόλη, λινολεϊκό οξύ) στο μέσο της ζύμωσης, ή με αναπαραγωγή της ζύμης παρουσία οξυγόνου πριν από την αναερόβωση. Επίσης, βέλτιστη παραγωγικότητα ζύμωσης επιτυγχάνεται με τροφοδοσία γλυκόζης συγκέντρωσης 10% (Roehr, 2001).

Η πιο απλή εκδοχή συνεχούς ζύμωσης περιλαμβάνει έναν μόνο αντιδραστήρα (single-stage continuous fermentation – SSCF). Η πιο σύνθετη μορφή είναι η συνεχής ζύμωση πολλαπλών βαθμίδων (multi-stage continuous fermentation – MSCF). Η ανακύκλωση της βιομάζας στο πρώτο στάδιο του συστήματος MSCF μετριάξει τη χρήση του υποστρώματος για παραγωγή βιομάζας. Επιπλέον, τα κύτταρα που εξέρχονται από το σύστημα έχουν ήδη ρυθμιστεί με φυσικό τρόπο ώστε να αντέχουν σε υψηλές συγκεντρώσεις αιθανόλης οπότε και θα είναι ανθεκτικότερα κατά τη διαδικασία (Cyt, 2006).

#### **2.3.2.4 Ακίνητοποίηση κυττάρων (cell immobilization)**

Η ακίνητοποίηση είναι ένας γενικός όρος που χρησιμοποιείται για να περιγράψει τον περιορισμό ενός βιοκαταλύτη μέσα ή πάνω σε ένα υλικό στήριξης. Τα συστήματα ακίνητοποιημένων βιοκαταλυτών αποτελούνται από δύο στοιχεία: το φορέα ακίνητοποίησης (ανόργανο, οργανικό, φυσικό ή συνθετικό μέσο) και τους βιοκαταλύτες. Ο όρος βιοκαταλύτης, όπως ήδη ορίστηκε αναφέρεται σε βιολογικές δομές που εμφανίζουν ενζυμική δραστηριότητα. Περιλαμβάνει από ένα απλό ένζυμο, έως ένα ζωντανό κύτταρο (μικροβιακό, φυτικό ή ζωικό) με το σύνολο των ενζύμων του. Ο ακίνητοποιημένος βιοκαταλύτης εκμεταλλεύεται τα φυσικά χαρακτηριστικά του υλικού στήριξης, ενώ διατηρεί τη βασική βιοχημική δραστηριότητα του ελεύθερου καταλύτη και βελτιώνει την αποδοτικότητά του. Η ακίνητοποίηση συχνά μιμείται αυτό που συμβαίνει στη φύση όπου κύτταρα αναπτύσσονται σε επιφάνειες ή μέσα σε φυσικές δομές. Πολλοί μικροοργανισμοί έχουν την ιδιότητα να προσκολλώνται σε διάφορα είδη επιφανειών. Η ανάκτηση των ακίνητοποιημένων

κυττάρων επιτυγχάνεται με φίλτρα, με φυγοκέντρηση ή με κατακρήμνιση (Παπανικολάου, 2006).

Έχουν παρατηρηθεί διάφορες επιπτώσεις στην αύξηση, την φυσιολογία και την μεταβολική δραστηριότητα των ακινητοποιημένων κυττάρων *S. cerevisiae*, σε σχέση με τα ελεύθερα. Πιο συγκεκριμένα συγκριτικές μελέτες ανάμεσα σε ακινητοποιημένα και ελεύθερα κύτταρα, αναφέρουν αύξηση των αποθηκευτικών και των δομικών πολυσακχαριτών, μεταβολές στον ρυθμό αύξησης, αύξηση στην πρόσληψη του υποστρώματος και στην απόδοση των προϊόντων, μείωση των παραγόμενων παραπροϊόντων, υψηλότερες τιμές του ενδοκυτταρικού pH, αυξημένη ανθεκτικότητα σε τοξικούς και ανασταλτικούς παράγοντες και αυξημένη δράση της ιμβερτάσης. Αξιοσημείωτο είναι το φαινόμενο της αύξησης της ανθεκτικότητας στην αιθανόλη των ακινητοποιημένων ζυμών, γεγονός σημαντικό στην παραγωγή διαλυμάτων υψηλής αλκοολικής περιεκτικότητας. Η αλκοολική ανθεκτικότητα σχετίζεται θετικά με την αύξηση του ποσοστού των κορεσμένων λιπαρών. Επίσης πιστεύεται πως το πολυμερές πλαίσιο που περικλείει τα ακινητοποιημένα κύτταρα μπορεί να παρέχει ένα προστατευτικό περιβάλλον κατά της τοξικότητας της αιθανόλης. Οι παραπάνω μεταβολές στα κύτταρα των ζυμών έχουν αποδοθεί στο μικροπεριβάλλον των ακινητοποιημένων κυττάρων που δημιουργείται από την στενή κυτταρική επαφή και το οποίο είναι απομονωμένο από το υπόλοιπο σύστημα. Πιο συγκεκριμένα στο περιβάλλον αυτό μια ποικιλία παραμέτρων όπως είναι, περιορισμοί στην διάχυση ουσιών, διαταραχές στο πρότυπο αύξησης των κυττάρων, επιδράσεις της επιφανειακής τάσης και της οσμωτικής πίεσης, μειωμένη ενεργότητα του νερού, διακυτταρική επικοινωνία και μετατροπή στην διαπερατότητα της μεμβράνης, ευνοούν την αύξηση της βιωσιμότητας και της ενεργότητας των κυττάρων. (Παπανικολάου, 2006).

### 3.2.2.5 Ζύμωση με την τεχνολογία 'very high gravity' (VHG)

Η τεχνολογία VHG επιτρέπει τη ζύμωση σακχάρων μεγάλης συγκέντρωσης που υπερβαίνει τα 300 g/L. Όπως έχει αναφερθεί, μεγάλη συγκέντρωση σακχάρων προκαλεί αύξηση της οσμωτικής πίεσης, η οποία έχει καταστρεπτική επίδραση στα κύτταρα της ζύμης, με συνέπεια την αναστολή της ζύμωσης. Ωστόσο, με κατάλληλη δοσολογία όλων των απαραίτητων θρεπτικών συστατικών, ζύμες όπως ο *S. cerevisiae*, μπορούν να ζυμώσουν αποτελεσματικώς αυξημένα ποσά σακχάρων (Bafmcova *et al.*, 1999).

Το άζωτο αποτελεί σημαντικό συστατικό του διαλύματος της ζύμωσης και παίζει σπουδαίο ρόλο στην πορεία της αντίδρασης. Είναι απαραίτητο για την ανάπτυξη και την αναπαραγωγή των κυττάρων, ενώ επηρεάζει την αντοχή της ζύμης στην αιθανόλη καθώς και το ρυθμό παραγωγής της αιθανόλης. Οι πηγές του αζώτου περιλαμβάνουν αμινοξέα, διπεπτίδια, ανόργανη αμμωνία, ιόντα αμμωνίου και ουρία. Η προσθήκη ελεύθερων αμινοξέων (free amino nitrogen – FAN) οδηγεί σε υψηλότερη τελική συγκέντρωση αιθανόλης και υψηλότερη συσσώρευση κυτταρικής μάζας. Σακχαρούχα διαλύματα συγκέντρωσης 120 g/L (η κατάλληλη δόση αζώτου είναι 140-150 mg FAN / L). Πυκνότερα διαλύματα απαιτούν μεγαλύτερη συγκέντρωση FAN. Επίσης, ποσότητα 8-16 mM ουρίας μεγιστοποιεί το ρυθμό ζύμωσης. Επιπλέον, περισσότερη ζύμη οδηγεί σε μεγαλύτερο ρυθμό ζύμωσης. Η αναπτυσσόμενη ζύμη παράγει αιθανόλη 33 φορές ταχύτερα απ' ό,τι η μη αναπτυσσόμενη, συνεπώς είναι σημαντικό να παρατείνεται η φάση ανάπτυξης όσο το δυνατόν περισσότερο ως τη μέγιστη κυτταρική παραγωγή, για την εξασφάλιση προβλέψιμων χρόνων ζύμωσης. Έχειδειχθεί ότι με προσθήκη αυξημένης αρχικής δόσης ζύμης και παρατεταμένη φάση ανάπτυξης με επαρκή τροφοδοσία οξυγόνου και ελεύθερων αμινοξέων, σακχαρούχα διαλύματα υψηλής συγκέντρωσης μπορούν να ζυμωθούν προς αιθανόλη συγκέντρωσης πάνω από 16% (v/v), ακόμα και σε χαμηλές θερμοκρασίες (14°C) μέσα σε μια βδομάδα, χωρίς εκδήλωση τοξικότητας αιθανόλης (Bafincova et al., 1999; Ingledew, 2005; Mousdale, 2008).

Στην τεχνολογία VHG εκτός από το άζωτο, πλήθος άλλων θρεπτικών συστατικών και ουσιών βελτιώνουν τη ζύμωση και προστατεύουν τα κύτταρα από στρεσογόνους παράγοντες. Τέτοια συστατικά είναι το οξυγόνο, το μαγνήσιο, το ασβέστιο, ψευδάργυρος, άλατα θειικού και φωσφορικού οξέος, καθώς και βιταμίνες, πεπτόνη, γλυκίνη, σύμπλοκα πρωτεϊνών-λιπιδίων, εκχύλισμα ζύμης και ακεταλδεϋδη. Έχειδειχθεί ότι η προσθήκη 50mM άλατος μαγνησίου αλληλοδιαδοχικά με πεπτόνη αύξησε τη συγκέντρωση αιθανόλης από 14,2% σε 17% μέσα σε 48 ώρες ζύμωσης καλαμποκάλευρου. Επίσης, μικρά ποσά ακεταλδεϋδης μειώνουν τον απαιτούμενο χρόνο κατανάλωσης υψηλών συγκεντρώσεων γλυκόζης (25% w/v) σε ζυμώσεις VHG. Το αλεύρι σόγιας περιέχει πολλές πρωτεΐνες και λιπίδια τα οποία αφομοιώνονται από τη ζύμη και ενισχύουν την αντοχή στην αιθανόλη, το ρυθμό ζύμωσης, την κατανάλωση σακχάρων και την τελική συγκέντρωση αιθανόλης. Έχειδειχθεί ότι η προσθήκη 4% (w/v) αλευριού σόγιας οδήγησε σε παραγωγικότητα  $2 \text{ g L}^{-1} \text{ h}^{-1}$  κατά τη ζύμωση γλυκόζης 300 g/L. Επίσης, η γλυκίνη δρα οσμοπροστατευτικά και βελτιώνει

τη ζύμωση και την κυτταρική ανάπτυξη. Προσθήκη γλυκίνης στο διάλυμα ζύμωσης που περιείχε γλυκόζη 350 g/L επέτρεψε παραγωγικότητα ίση με  $0.4 \text{ g L}^{-1} \text{ h}^{-1}$ . Ακόμη, όταν εκχύλισμα ζύμης προστέθηκε σε πολτό σιταριού που περιείχε 350 και 379 g διαλυμένων στερεών/L, επιτεύχθηκε παραγωγικότητα 1.9 και  $1.4 \text{ g L}^{-1} \text{ h}^{-1}$  αντίστοιχα.

Χωρίς την παροχή αυτών των συστατικών παρατηρείται προβληματική και αργή ζύμωση, όπου οι ρυθμοί κατανάλωσης σακχάρων είναι εξαιρετικά χαμηλοί, ειδικά προς το τέλος της ζύμωσης. Τα υπολειμματικά σάκχαρα που δεν ζυμώνονται αποτελούν πρόβλημα στις ζυμώσεις VHG. Οι προβληματικές ζυμώσεις δεν οφείλονται μόνο σε ανεπάρκεια θρεπτικών συστατικών αλλά και σε άλλους παράγοντες όπως είναι η αιθανόλη, το pH, η θερμοκρασία, οι βακτηριακές μολύνσεις, η οσμωτική πίεση κ.ά.

## Κεφάλαιο 3<sup>ο</sup>

### Συμπεράσματα – Συζήτηση - Προοπτικές

#### 3.1 Βιοαιθανόλη – Πηγές παραγωγής και προοπτικές

Η βιοαιθανόλη αποτελεί το πιο διαδεδομένο βιοκαύσιμο, το οποίο παράγεται σε μεγάλες ποσότητες (65 δισεκατ. λίτρα το 2008) κυρίως από τη ζύμωση των σακχαρούχων και αμυλούχων φυτών. Η παραγωγή της αναμένεται να αυξηθεί ραγδαία τα επόμενα 5 με 10 χρόνια, λόγω κοινωνικο-οικονομικών και στρατηγικών κινήτρων, και με δεδομένο ότι τεχνολογία παραγωγής αναπτύσσεται με αλματώδεις ρυθμούς. Το ολόένα και αυξανόμενο ενδιαφέρον για τη βιοαιθανόλη ως καύσιμο, οφείλεται στα σημαντικά πλεονεκτήματά της, όπως είναι ο ανανεώσιμος χαρακτήρας της, οι μειωμένοι ατμοσφαιρικοί ρύποι της καύσης της και οι θετικές επιδράσεις στην απόδοση των μηχανών.

Οι κυριότεροι παραγωγοί βιοαιθανόλης είναι οι Η.Π.Α. και η Βραζιλία, οι οποίοι χρησιμοποιούν ως πρώτη ύλη τον αραβόσιτο και το ζαχαροκάλαμο αντίστοιχα. Η βιωσιμότητα και η οικονομική ανταγωνιστικότητα της βιοαιθανόλης 1<sup>ης</sup> γενιάς από ζαχαρότευτλο/ζαχαροκάλαμο και αραβόσιτο, προϋποθέτουν ολοκληρωμένες διεργασίες παραγωγής, με μέγιστη αξιοποίηση των παραπροϊόντων και υψηλό βαθμό ενεργειακής απόδοσης. Αν και η τεχνολογία παραγωγής βιοαιθανόλης 1<sup>ης</sup> γενιάς θεωρείται εδώ και χρόνια ώριμη και διαδεδομένη, η παραγωγή αιθανόλης από διατροφικές καλλιέργειες περιορίζεται από ηθικούς, γεωργικούς και γεωγραφικούς παράγοντες. Συνεπώς, μόνον οι λιγνοκυτταρινούχες πρώτες ύλες προσφέρουν ποσοτική διαθεσιμότητα προκειμένου να επιτευχθεί σημαντική υποκατάσταση της βενζίνης από τη βιοαιθανόλη 2<sup>ης</sup> γενιάς σε εθνικό ή παγκόσμιο επίπεδο. Αυτό οφείλεται κυρίως στην αφθονία τους και στο χαμηλό τους κόστος. Επίσης, η στρεμματική απόδοση σε αιθανόλη των κυτταρινούχων ενεργειακών καλλιεργειών (π.χ. 1400 λίτρα/στρέμμα μίσχανθου) υπερτερεί σημαντικά έναντι των συμβατικών καλλιεργειών (π.χ. 550 λίτρα/στρέμμα ζαχαρότευτλου). Επιπλέον, η τεχνολογία μετατροπής της λιγνινοκυτταρίνης σε αιθανόλη επιτρέπει τη χρήση του συνόλου του φυτού και όχι μόνο μερών του, όπως τα σακχαρούχα και αμυλούχα τμήματα. Ωστόσο, η βιοαιθανόλη 2<sup>ης</sup> γενιάς δεν θεωρείται ακόμα ανταγωνιστική και δεν παράγεται σε μεγάλη εμπορική κλίμακα, λόγω των υψηλών ενεργειακών απαιτήσεων και της πολυπλοκότητας της παραγωγής της.

### 3.2 Στάδια παραγωγής βιοαιθανόλης -

Τα βασικά στάδια της παραγωγής της βιοαιθανόλης είναι η προεπεξεργασία της πρώτης ύλης, η αλκοολική ζύμωση και η απόσταξη. Η προεπεξεργασία των σακχαρούχων πρώτων υλών αποσκοπεί στην εκχύλιση των σακχάρων και γίνεται κυρίως με συμπίεση σε μύλους.

Η αλκοολική ζύμωση αποτελεί την καρδιά της παραγωγής βιοαιθανόλης. Μικροοργανισμοί, όπως ζύμες και βακτήρια, χρησιμοποιούν τις πεντόζες και τις εξόζες που προκύπτουν από την προεπεξεργασία, ως τροφή για την παραγωγή ενέργειας και κυτταρική ανάπτυξη. Η ζύμωση διεξάγεται κάτω από αναερόβιες συνθήκες και έχει ως κύρια παραπροϊόντα την αιθανόλη και το διοξείδιο του άνθρακα. Οι κυριότερες παράμετροι επιρροής της ζύμωσης είναι η θερμοκρασία, η συγκέντρωση της αιθανόλης, η παρουσία ανασταλτικών ουσιών, το pH και η συγκέντρωση του υποστρώματος. Θερμοκρασίες άνω των 46-48°C αναστέλλουν την ανάπτυξη των περισσότερων ζυμωτικών μικροοργανισμών. Επίσης, η πλειονότητα των οργανισμών δεν μπορεί να αντέξει σε συγκεντρώσεις αιθανόλης άνω του 10-15% (w/v), λόγω της τοξικής δράσης της. Εξίσου τοξικές για τους μικροοργανισμούς είναι και οι ουσίες που προέρχονται από την υδρόλυση της βιομάζας. Επιπλέον, μεγάλες συγκεντρώσεις υποστρώματος στο διάλυμα της ζύμωσης δημιουργούν αύξηση της οσμωτικής πίεσης η οποία αναστέλλει την κυτταρική ανάπτυξη. Τέλος, η δυνατότητα διεξαγωγής ζύμωσης σε χαμηλό pH (π.χ. τιμές pH κάτω από 4) μειώνει το ρίσκο βακτηριακών μολύνσεων και τις απαιτήσεις αποστείρωσης του εξοπλισμού. Συνεπώς, είναι επιθυμητή η χρήση μικροοργανισμών ανθεκτικών σε όλους αυτούς τους παράγοντες. Αυτό επιτυγχάνεται με τη γενετική τροποποίηση των μικροοργανισμών με γονίδια που τους προσφέρουν τις επιθυμητές ιδιότητες.

Ο μικροοργανισμός που χρησιμοποιείται κατά κόρον στη βιομηχανική παραγωγή βιοαιθανόλης είναι ο σακχαρομύκητας *Saccharomyces cerevisiae*. Τα πλεονεκτήματά του είναι η ικανότητα ζύμωσης μεγάλης ποικιλίας σακχάρων, η αντοχή σε χαμηλό pH και η ανθεκτικότητα σε διάφορους ανασταλτικούς παράγοντες. Το βακτήριο *Zymomonas mobilis* κερδίζει έδαφος στην παραγωγή βιοαιθανόλης καθώς εμφανίζει 2,5 με 5 φορές υψηλότερη παραγωγικότητα και 5-10% μεγαλύτερη απόδοση από τον *Saccharomyces cerevisiae*. Επίσης, επιδεικνύει υψηλότερη αντοχή στην αιθανόλη και στην οσμωτική πίεση από τη συγκέντρωση σακχάρων. Ωστόσο, η εμπορική του χρήση περιορίζεται από το μικρό φάσμα σακχάρων που μπορεί να ζυμώσει, τη μειωμένη ανθεκτικότητα σε ανασταλτικές ουσίες της υδρόλυσης της

βιομάζας και οι μεγαλύτερες τιμές pH ζύμωσης σε σχέση με τις ζύμες. Η υψηλή απόδοση σε αιθανόλη και η χαμηλή παραγωγή βιομάζας από το *Z. mobilis* αντισταθμίζεται από την αναγκαιότητα αποστείρωσης του μέσου της καλλιέργειας. Επομένως, από οικονομική σκοπιά, γενικά προτιμάται ο *S. cerevisiae*.

Το βασικότερο μειονέκτημα αυτών των μικροοργανισμών είναι η αδυναμία τους να ζυμώνουν τις πεντόζες που προέρχονται από την υδρόλυση της ημικυτταρίνης. Η αποτελεσματική ζύμωση των πεντοζών (π.χ. ξυλόζη) είναι απαραίτητο κριτήριο για την επίτευξη βιώσιμης παραγωγής βιοαιθανόλης 2<sup>ης</sup> γενιάς. Αυτήν την απαίτηση έρχεται να καλύψει η επιστήμη της βιοτεχνολογίας για ακόμη μία φορά. Ήδη χρησιμοποιείται και σ' αυτόν τον τομέα η τεχνολογία του ανασυνδυασμένου DNA, καθώς προσφέρει τη δυνατότητα επιτυχούς ζύμωσης των πεντοζών. Αυτό μπορεί να γίνει σήμερα με δύο τρόπους:

- Ενσωμάτωση γονιδίων στο γονιδίωμα μικροοργανισμών οι οποίοι έχουν την ικανότητα να παράγουν αιθανόλη από εξόζες (π.χ. *Z. mobilis*, *S. cerevisiae*), ώστε να χρησιμοποιούν και πεντόζες, όπως ξυλόζη και αραβινόζη για την παραγωγή βιοαιθανόλης.
- Βελτίωση της παραγωγικότητας σε αιθανόλη μικροοργανισμών που έχουν την ικανότητα να χρησιμοποιούν εξόζες και πεντόζες (π.χ. *E. coli*, *K. oxytoca*).

Το αποτέλεσμα είναι η δημιουργία γενετικά τροποποιημένων στελεχών τα οποία είναι ικανά να ζυμώνουν αποτελεσματικά πεντόζες, όπως ξυλόζη και αραβινόζη, και εμφανίζουν αυξημένη παραγωγικότητα, απόδοση, ανθεκτικότητα σε αιθανόλη, οσμωτική πίεση και pH, ποικιλοτρόπως ανάλογα με τον μικροοργανισμό.

### 3.3 Παραπροϊόντα από τις διεργασίες παραγωγής βιοαιθανόλης – Αξιοποίηση

Τα παραπροϊόντα από τις διεργασίες της παραγωγής βιοαιθανόλης είναι ένα άλλο σπουδαίο κεφάλαιο. Η σωστή διαχείριση και αξιοποίησή τους μπορεί να βελτιώσει σημαντικά την ενεργειακή απόδοση του συνόλου της παραγωγής και κατ' επέκταση τη μείωση του κόστους.

Τυπικό παράδειγμα παραπροϊόντων της παραγωγής βιοαιθανόλης από σακχαρούχες πηγές (π.χ. μελάσα) αποτελούν

1. **Η βαγάζση.** Η βαγάζση αποτελεί πολύ σημαντικό παραπροϊόν της παραγωγής αιθανόλης από ζαχαρότευτλο. Παράγεται κατά το στάδιο της συμπίεσης των στελεχών του ζαχαρότευτλου, όπου διαχωρίζεται ο σακχαρούχος χυμός από το ξυλώδες υπόλειμμα. Η βαγάζση αξιοποιείται ως καύσιμο για την κάλυψη των

αναγκών του εργοστασίου σε θερμική, μηχανική και ηλεκτρική ενέργεια. Αυτή η τεχνολογική προσέγγιση, που καλείται συμπαραγωγή, διαχωρίζει το ζαχαρότευτλο από άλλες πρώτες ύλες παραγωγής βιοαιθανόλης, οι οποίες απαιτούν εξωτερική πηγή ενέργειας για τη διεξαγωγή των διεργασιών. Η επεξεργασία ενός τόνου ζαχαρότευτλου αποδίδει 250 kg βαγάσσης (με 50% υγρασία), τα οποία μπορούν να παράγουν 500 με 600 kg ατμού, ποσότητα που καλύπτει πλήρως τις ανάγκες του εργοστασίου. Η παραγόμενη ηλεκτρική ενέργεια ισούται με 1 MWh/m<sup>3</sup> παραγόμενης αιθανόλης. Με προσεκτικότερη διαχείριση των απαιτήσεων σε ατμό και με την εγκατάσταση αποδοτικότερων καυστήρων, μπορεί να επιτευχθεί περίσσεια ενέργειας, η οποία μπορεί να πωληθεί ως ηλεκτρική ενέργεια στο δημόσιο δίκτυο. Η χρήση της βαγάσσης στην παραγωγή ηλεκτρικής ενέργειας θα μπορούσε να μειώσει τις εκπομπές άνθρακα στην ατμόσφαιρα, καθώς θα αντικαθιστούσε την καύση πετρελαίου στα συμβατικά θερμοηλεκτρικά εργοστάσια. Η μείωση των εκπομπών εκτιμάται ότι είναι περίπου 0,55 τόνοι CO<sub>2</sub> ανά τόνο χρησιμοποιούμενης βαγάσσης. Επίσης, εργαστηριακές μελέτες δείχνουν ότι η αναερόβια χώνευση της βαγάσσης είναι το ίδιο επωφελής, καθώς αυξάνει την παραγωγή ενέργειας σε 2,25 MWh/m<sup>3</sup> παραγόμενης αιθανόλης, εάν το μη βιοδιασπώμενο υπόλειμμα καίγεται. Ένας εναλλακτικός τρόπος αξιοποίησης της βαγάσσης περιλαμβάνει αεριοποίησή της, η οποία αυξάνει την παραγωγή ηλεκτρικής ενέργειας με αποδόσεις που υπερβαίνουν τα 180 kWh ανά τόνο επεξεργασμένου ζαχαρότευτλου. Επιπλέον, η βαγάσση αποτελεί πηγή κυτταρίνης για τη βιομηχανία χαρτιού και χαρτονιού, ενώ χρησιμοποιείται και στη βιομηχανία κεραμικών, όπως και στην επεξεργασία πορτοκαλιών. Τέλος, η βαγάσση μπορεί να μεταχειριστεί ώστε να βελτιωθεί η χώνευσή της και η περιεκτικότητά της σε πηγές αζώτου στη χρήση της ως τροφή βοοειδών (BNDES and CGEE, 2008; Mousdale, 2008).

2. **Το διοξείδιο του άνθρακα.** Από τη ζύμωση των σακχάρων απελευθερώνονται περίπου 760 kg CO<sub>2</sub> για κάθε κυβικό μέτρο παραγόμενης αιθανόλης. Από αυτό το σύνολο, ένα ποσοστό 70-80% μπορεί να ανακτηθεί σε ένα κλειστό σύστημα. Μετά από καθαρισμό για την αφαίρεση αλδεϋδων, αλκοολών και οσμών, το αέριο μπορεί είτε να απελευθερωθεί στην ατμόσφαιρα, είτε να αποθηκευτεί σε κυλίνδρους, είτε να συμπιεστεί περαιτέρω σε στερεά ή υγρή μορφή. Η εμπορική αξία του CO<sub>2</sub> είναι σχετικά χαμηλή, οπότε η μεταφορά του σε μεγάλες αποστάσεις από το εργοστάσιο παραγωγής θεωρείται μη οικονομική. Στην αέρια

μορφή του, το CO<sub>2</sub> μπορεί να χρησιμοποιηθεί στην παρασκευή αναψυκτικών και τροφίμων, ή στη βελτίωση της καλλιέργειας φυτών θερμοκηπίου. Σε υγρή μορφή, συχνά χρησιμοποιείται σε πυροσβεστήρες, σε συστήματα ψύξης και ως πρώτη ύλη στη χημική βιομηχανία. Το στερεό CO<sub>2</sub> χρησιμοποιείται κυρίως ως ψυκτική ουσία. Άλλες χρήσεις περιλαμβάνουν την επεξεργασία του νερού και τις συγκολλήσεις. Νέες εφαρμογές που μπορεί να επιφέρουν την αύξηση της εμπορικής του αξίας είναι η ανάκτηση πετρελαίου από πηγές με μειωμένη παραγωγή. Η κεντρική ιδέα είναι η άντληση αερίου μέσα στη ζώνη παραγωγής το οποίο θα οδηγήσει το πετρέλαιο στην επιφάνεια. Επίσης, ποικίλες εφαρμογές όπως η μετατροπή του CO<sub>2</sub> σε αιθανόλη με βιολογικές διαδικασίες βρίσκονται σε πειραματικό στάδιο (Roehr, 2001).

3. **Η κυτταρική μάζα.** Λόγω της αναερόβιας φύσης της αλκοολικής ζύμωσης, η ανάπτυξη της κυτταρικής μάζας περιορίζεται. Γενικά, μια μετατροπή της τάξεως 95%, υποστρώματος συγκέντρωσης 10%, παράγει 5 g/L ξηρής κυτταρικής μάζας, ή για κάθε λίτρο αιθανόλης, παράγονται 15 με 30 gr ξηρής ζύμης. Συνεπώς, ο διαχωρισμός των ζυμωτικών μικροοργανισμών προς ανακύκλωση των κυττάρων, μπορεί να μην είναι οικονομικά συμφέρων. Στη διαδικασία της ανακύκλωσης, μια επιστροφή 35-40% της συνολικής βιομάζας στον πολτό αρκεί για τις ζυμωτικές απαιτήσεις. Αφού έχει διεξαχθεί το στάδιο της συμπύκνωσης, το υπόλειμμα της μικροβιακής μάζας μπορεί να ξηρανθεί και να χρησιμοποιηθεί ως πρωτεϊνούχος τροφή ή διατροφικό συμπλήρωμα. Άλλες καινοτόμες χρήσεις της υπολειμματικής ζύμης περιλαμβάνουν εφαρμογή σε συστήματα τροφών για τη σταθεροποίηση μειγμάτων νερού και λαδιού, και χρήση ως υποκατάστατο του ασπραδιού του αυγού λόγω των αφριστικών ιδιοτήτων του. (Roehr, 2001; BNDES and CGEE, 2008).
4. **Το νερό.** Η κατανάλωση του νερού που χρησιμοποιείται στη διαδικασία παραγωγής αιθανόλης είναι υψηλή. Δεδομένου ότι είναι απαίτηση της εποχής η προστασία του περιβάλλοντος και η ελαχιστοποίηση της κατανάλωσης του νερού από τις βιομηχανίες, ένα μεγάλο μέρος, το 70 με 80% από αυτό που προέρχεται από τη φυγοκέντρωση του υγρού υπολείμματος, ανακυκλώνεται σ' ένα κλειστό κύκλωμα. Προκειμένου να ανακτηθεί επιπλέον νερό ο ατμός που προέρχεται από την ξήρανση των στερεών καταλοίπων μπορεί να χρησιμοποιηθεί για την παραγωγή ενέργειας σε ατμοστροβίλους. Το σιρόπι που παραμένει περιέχει 30-

35% στερεά και είτε αναμειγνύεται με τα υπόλοιπα στερεά και πωλείται μαζί τους ως ζωοτροφή είτε πωλείται ξεχωριστά.

### 3.4 Προοπτικές

Το πέρασμα από την εποχή της βιοαιθανόλης 1<sup>ης</sup> γενιάς από γεωργικά προϊόντα στην εποχή της βιοαιθανόλης 2<sup>ης</sup> γενιάς από λιγνοκυτταρίνη, θα πραγματοποιηθεί με τη συμβολή της επιστήμης της βιοτεχνολογίας. Τα απαραίτητα βήματα που πρέπει να γίνουν είναι τα εξής:

- Δημιουργία μιας νέας γενιάς φθινών ενζύμων για την υδρόλυση της κυτταρίνης, ικανά να ολοκληρώνουν την υδρόλυση της βιομάζας κατά τη διάρκεια της ζύμωσης.
- Δημιουργία νέων μικροοργανισμών, ικανών να ζυμώνουν ένα μεγάλο εύρος εξοζών και πεντοζών, με μεγάλη ανθεκτικότητα σε υψηλές θερμοκρασίες, χαμηλό pH, υψηλές συγκεντρώσεις αιθανόλης και υποστρώματος, και σε τοξικές ουσίες που παράγονται κατά την προεπεξεργασία της βιομάζας, ώστε να παρουσιάζουν βέλτιστη απόδοση σε συνθήκες ταυτόχρονης σακχαροποίησης και ζύμωσης (SSF).

Μια ακόμη σειρά από επαναστατικές ιδέες γεννούν ελπίδες για τη μελλοντική βιωσιμότητα της παραγωγής βιοαιθανόλης. Μερικές από αυτές είναι η **‘ενοποιημένη βιοδιαδικασία’** (CBP) παραγωγής βιοαιθανόλης από λιγνινοκυτταρινική βιομάζα, η ιδέα του **βιοδιυλιστηρίου**, η παραγωγή βιοαιθανόλης 3<sup>ης</sup> γενιάς από άλγη, η **γενετική τροποποίηση των φυτών** και η **χρήση ειδικών εδαφοβελτιωτικών λιπασμάτων**.

- **‘Ενοποιημένη βιοδιαδικασία’ (CBP)**

Αυτή η διαδικασία περιλαμβάνει την πραγματοποίηση της παραγωγής ενζύμων, της υδρόλυσης της λιγνινοκυτταρινικής βιομάζας και της ζύμωσης των σακχάρων σε μία ενιαία διεργασία. Οι κυτταρινάσες και οι ημι-κυτταρινάσες (π.χ. ξυλανάσες) θα παράγονται από θερμοφίλους μικροοργανισμούς, οι οποίοι θα ζυμώνουν ταυτόχρονα τις πεντόζες και εξόζες, στον ίδιο αντιδραστήρα. Οι θερμοκρασίες θα φτάνουν ως και τους 70°C, ενώ το pH θα μπορεί να κυμαίνεται μεταξύ 3,5 και 4. Επίσης, οι νέοι γενετικά τροποποιημένοι μικροοργανισμοί θα παρουσιάζουν πλήρη αντοχή σε ανασταλτικούς παράγοντες και μεγάλη ανθεκτικότητα στην αιθανόλη. Η ενοποιημένη βιοδιαδικασία αποτελεί την τελευταία λέξη της τεχνολογίας για την παραγωγή

βιοαιθανόλης από λιγνινοκυτταρίνη και αναμένεται να είναι διαθέσιμη σε 15 περίπου χρόνια από σήμερα.

- Η ιδέα του βιοδιυλιστηρίου

Το βιοδιυλιστήριο θα αποτελεί μία εγκατάσταση, η οποία θα συμπεριλαμβάνει τον εξοπλισμό και τις διεργασίες μετατροπής, για την παραγωγή βιοκαυσίμων, ενέργειας και χημικών από τη βιομάζα. Οι κύριες διαδικασίες θα είναι η αεριοποίηση και η ζύμωση της βιομάζας. Είναι μια αναλογία του διυλιστηρίου πετρελαίου, στο οποίο παράγεται μια πληθώρα καυσίμων και προϊόντων από το πετρέλαιο.

- Παραγωγή βιοαιθανόλης 3<sup>ης</sup> γενιάς από ζωντανή άλγη

Κάποια είδη άλγης (φύκη) μπορούν να παράγουν φυσικά αιθανόλη, η οποία συλλέγεται χωρίς να θανατώνεται η άλγη. Η αιθανόλη εξατμίζεται και μπορεί στη συνέχεια να ανακτηθεί με συμπύκνωση. Η εταιρία Algenol κάνει προσπάθειες εμπορευματοποίησης αυτής της διαδικασίας.

- Γενετική τροποποίηση φυτών

Η γενετική παρέμβαση γίνεται προκειμένου να γίνουν ευνοϊκότερες οι ιδιότητες των χρησιμοποιούμενων φυτών, όπως π.χ. μειωμένη περιεκτικότητα της προβληματικής λιγνίνης.

- Χρήση ειδικών εδαφοβελτιωτικών λιπασμάτων

Ένα τέτοιο παράδειγμα αποτελεί το EcoPlant, το οποίο παράγεται στο Ινστιτούτο Βιοτεχνολογίας 'Πυθία' από τον Δρ. Αναστασιάδη Σάββα. Το EcoPlant είναι ένα οικολογικό, βιολογικό, εδαφοβελτιωτικό λίπασμα μικροβιακής προέλευσης, το οποίο δρα ως αυξητικός και (παγο)προστατευτικός παράγοντας φυτών, θάμνων και δέντρων. Η εφαρμογή του μπορεί να βελτιώσει τη στρεμματική και ενεργειακή απόδοση των ενεργειακών καλλιεργειών σε βιοαιθανόλη.

## Κεφάλαιο 4ο: Βιβλιογραφία

<http://www.scribd.com/doc/39604600/Παραγωγή-Βιοαιθανόλης>

- Alfenore S., Molina-Jouve C., Guillouet S.E., Uribe Larrea J.L., Goma G., Benbadis L. (2002) Improving ethanol production and viability of *Saccharomyces cerevisiae* by avitamin feeding strategy during fed-batch process. *Appl Microbiol Biotechnol* **60**: 67–72.
- Babcock B.A. (2011) The Impact of US Biofuel Policies on Agricultural Price Levels and Volatility. International Centre for Trade and Sustainable Development, Issue Paper No. 35.
- Bafmcova P., Šmogrovicova D., Slavikova I., Patkova J. and Dömeny Z. (1999) Improvement of very high gravity ethanol fermentation by media supplementation using *Saccharomyces cerevisiae*. *Biotechnology Letters* **21**: 337–341.
- Banat I.M., Nigam P., Singh D., Marchant R. and McHale A.P. (1998) Review: Ethanol production at elevated temperatures and alcohol concentrations: Part I - Yeasts in general. *World Journal of Microbiology & Biotechnology* **14**: 809-821.
- Birch R.M. and Walker G.M. (2000) Influence of magnesium ions on heat shock and ethanol stress responses of *Saccharomyces cerevisiae*. *Enzyme and Microbial Technology* **26**: 678–687.
- BNDES and CGEE (2008) Sugarcane-based bioethanol: energy for sustainable Development. Rio de Janeiro: BNDES.
- Briens C., Piskorz J. and Berruti F. (2008) Biomass Valorization for Fuel and Chemicals Production - A Review. *International Journal of Chemical Reactor Engineering* **6**: R2.
- Cyr N. (2006) Effect of aeration strategy on the performance of a very high gravity continuous fuel ethanol fermentation process. Department of Bioresource Engineering McGill University, Montréal.
- Demirbas A. (2005) Bioethanol from Cellulosic Materials: A Renewable Motor Fuel from Biomass. *Energy Sources* **27**: 327-337.
- Demirbas A. (2009). Political, economic and environmental impacts of biofuels: A review. *Applied Energy* **86**: S108–S117.

- Deurwaarder E.P. and Reith J.H. (2006) Bioethanol in Europe: Overview and comparison of production processes. GAVE programme of the Dutch Agency for Energy and the Environment (SenterNovem).
- Devantier R., Pedersen S. and Olsson L. (2005) Characterization of very high gravity ethanol fermentation of corn mash. Effect of glucoamylase dosage, pre-saccharification and yeast strain. *Appl Microbiol Biotechnol* **68**: 622–629.
- Duff S.J.B. and Murray W.D. (1996) Bioconversion of forest products industry waste cellulose to fuel ethanol: A review. *Bioresource Technology* **55**:1-33.
- European Union (2007) Impact Assessment of the Proposal for a Directive of the European Parliament and of the Council modifying Directive 98/70/EC relating to the quality of petrol and diesel fuels.
- Evans G. Liquid Transport Biofuels - Technology Status Report. UK's National Centre for Biorenewable Energy, Fuels and Materials (NNFCC).
- Evans J. (2008) Biofuels aim higher. *BioFPR online*.
- FAO (Food and Agriculture Organization of the United Nations) (2008) The state of food and agriculture. Electronic Publishing Policy and Support Branch Communication Division FAO.
- FAOSTAT 2009 <http://faostat.fao.org>
- Fewell M.P. (1995) The atomic nuclide with the highest mean binding energy. *American Journal of Physics* **63**: 653–658.
- Galbe M. and Zacchi G. (2002) A review of the production of ethanol from softwood. *Appl Microbiol Biotechnol* **59**:618–628.
- Hempear.org. Biofuels Facts. <http://www.hempear.org/biofacts.shtml>
- Hettenhaus J.R. (1998) Ethanol fermentation strains - present and future requirements for biomass to ethanol commercialization.
- Inderwildi O.R. and King D.A. (2009) Quo Vadis Biofuels. *Energy & Environmental Science* **2**: 343.
- Ingledew W.M. (2005) Improvements in alcohol technology through advancements in fermentation technology. *Getreidetechnologie* **59**:308-311.
- International Resource Panel (IRP), United Nations Environment Programme. (2009) Towards sustainable production and use of resources: Assessing Biofuels.
- Klinker H.B., Thomsen A.B. and Ahring B.K. (2004) Inhibition of ethanol-producing yeast and bacteria by degradation products produced during pre-treatment of biomass. *Appl Microbiol Biotechnol* **66**:10–26.

- Leakey R (1994). *Origin of Humankind*. Basic Books. ISBN 0465031358.
- Lichts F.O. (2011) *Industry Statistics: 2010 World Fuel Ethanol Production*. Renewable Fuels Association.
- Mousdale D.M. (2008) *Biofuels: biotechnology, chemistry, and sustainable development*. CRC Press - Taylor & Francis Group.
- Mueller S.A., Anderson J.E. and Wallington T.J. (2008) Impact of biofuel production and other supply and demand factors on food price increases in 2008. *Biomass and Bioenergy* **35**:1623–1632.
- Pandey A. (2009) *Handbook of plant-based biofuels*. CRC Press Taylor & Francis Group.
- Platts. "IEA says biofuels can displace 27% of transportation fuels by 2050 Washington".  
<http://www.platts.com/RSSFeedDetailedNews/RSSFeed/Oil/6017103>
- Redman G. (2008) *Assessment of on-farm AD in the UK*. National Non-Food Crops Centre (NNFCC).
- Roehr M. (2001) *The Biotechnology of Ethanol: Classical and Future Applications*. WILEY-VCH Verlag GmbH, Weinheim.
- Rutz D. and Janssen R. (2007) *Biofuel Technology Handbook*. WIP Renewable Energies
- Streibig J.C., Ritz C., Pipper C.B., Yndgaard F., Fredlund K., Thomsen J.N. «Sugarbeet, bioethanol, and climate change» 2009 IOP Publishing Ltd *Climate Change: Global Risks, Challenges and Decisions*. IOP Conf. Series: Earth and Environmental Science **6** (2009) 242040.
- Wang S., Thomas K.C., Sosulski K., Ingledew W.M., Sosulski F.W. (1999) Grain pearling and very high gravity (VHG) fermentation technologies for fuel alcohol production from rye and triticale. *Process Biochemistry* **34**: 421–428.
- World Coal Institute. "History of Coal Use".
- Worldwatch Institute. <http://www.worldwatch.org/biofuels-make-comeback-despite-tough-economy>
- Youngquist W. (1997) *Geodestinies: The Inevitable Control of Earth Resources over Nations & Individuals*. National Book Company, Portland, OR, 499p.
- Βερούκιος Ξ. (2005) Εναλλακτικές χρήσεις αγροτικών προϊόντων: διεργασία συμπαραγωγής μέσω υδρογόνου και κυνελίδων καυσίμου. ΗΜΕΡΙΔΑ: Η συμβολή της αγροτικής οικονομίας και της ΚΑΠ στην αναπτυξιακή πορεία της

Ευρωπαϊκής Ένωσης – Προκλήσεις και προοπτικές. ΑΘΗΝΑ, 20 Οκτωβρίου 2005.

- Γεωργιάτσος Ι.Γ. (2001) Εισαγωγή στη βιοχημεία. Πέμπτη έκδοση, εκδόσεις Γιαχούδη-Γιαπούλη.
- ΚΑΠΕ (Κέντρο Ανανεώσιμων Πηγών Ενέργειας) (2006) Ενεργειακές καλλιέργειες για την παραγωγή υγρών και στερεών καυσίμων στην Ελλάδα.
- Κεφαλά Κ. (2003) Απομόνωση πρωτεϊνικού παράγοντα που συμμετέχει στο μηχανισμό αντοχής του βακτηρίου *Zymomonas mobilis* σε θρεπτικά υλικά με υψηλές συγκεντρώσεις γλυκόζης. Διατριβή μεταπτυχιακής εξειδίκευσης, Πανεπιστήμιο Ιωαννίνων.
- Μικροβιόκοσμος (2008) Γονιδιωματική στο *Zymomonas mobilis*. 1ο Πανελλήνιο Συνέδριο ‘Μικροβιόκοσμος’, 12-14 Δεκεμβρίου 2008 ΕΚΕΦΕ Δημόκριτος.
- Παπανικολάου Β. (2006) Μέθοδοι και υλικά ακινητοποίησης βιοκαταλυτών για την παραγωγή καύσιμης και βιομηχανικής αλκοόλης σε βιοαντιδραστήρα διαλείποντος έργου. Ερευνητική Εργασία Μεταπτυχιακού Διπλώματος Ειδίκευσης, Πανεπιστήμιο Πατρών, Τμήμα Βιολογίας.