

ΤΕΧΝΟΛΟΓΙΚΟ ΕΚΠΑΙΔΕΥΤΙΚΟ ΙΔΡΥΜΑ ΚΑΛΑΜΑΤΑΣ
ΤΜΗΜΑ ΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑΣ ΓΕΩΡΓΙΚΩΝ ΠΡΟΪΟΝΤΩΝ



«Έλεγχος της δυνατότητας χρήσης των ζυμών *Saccharomyces cerevisiae* και *Cryptococcus curvatus* για την παραγωγή βιοκαυσίμων από το έλαιο της πυρόλυσης βιομάζας»

ΠΤΥΧΙΑΚΗ ΕΡΓΑΣΙΑ

ΑΓΓΕΛΙΚΗ ΣΤΙΓΚΑ



ΚΑΛΑΜΑΤΑ

2011

ΤΕΧΝΟΛΟΓΙΚΟ ΕΚΠΑΙΔΕΥΤΙΚΟ ΙΔΡΥΜΑ ΚΑΛΑΜΑΤΑΣ
ΤΜΗΜΑ ΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑΣ ΓΕΩΡΓΙΚΩΝ ΠΡΟΪΟΝΤΩΝ

«Έλεγχος της δυνατότητας χρήσης των ζυμών *Saccharomyces cerevisiae* και *Cryptococcus curvatus* για την παραγωγή βιοκαυσίμων από το έλαιο της πυρόλυσης βιομάζας»

ΠΤΥΧΙΑΚΗ ΜΕΛΕΤΗ

ΑΓΓΕΛΙΚΗ ΣΤΙΓΚΑ

ΚΑΛΑΜΑΤΑ

2011

ΕΥΧΑΡΙΣΤΙΕΣ

Για την ολοκλήρωση της πτυχιακής μου μελέτης συνέβαλλαν κάποιοι άνθρωποι που χωρίς την πολύτιμη βοήθειά τους δεν θα μπορούσα να την ολοκληρώσω. Εν πρώτης θα ήθελα να ευχαριστήσω την επιβλέπουσα της πτυχιακής μου εργασίας, κ. Μαρίνα Παπαδέλλη, γιατί μου πρότεινε το θέμα της πτυχιακής μου εργασίας και με βοήθησε πολύ τόσο στην κατανόηση της όσο και στη συγγραφή της. Επίσης θα ήθελα να ευχαριστήσω τους καθηγητές του ερευνητικού κέντρου (Agrotechnology and Food Science Research Center) του Πανεπιστημίου του Wageningen, Hans Moibroek και Jan Springer, για τα κατατοπιστικά άρθρα που μου έστειλαν σε σχέση με την παρούσα πτυχιακή μελέτη, καθώς και για την βοήθειά τους την περίοδο που εργαζόμουν μαζί τους. Τέλος θα ήθελα να ευχαριστήσω ιδιαίτερα την οικογένειά μου και τους φίλους μου για την πολύτιμη βοήθεια και στήριξη τους.

ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ

ΠΕΡΙΛΗΨΗ.....	1
Abstract.....	2
ΣΚΟΠΟΣ	3
1. ΕΙΣΑΓΩΓΗ	4
1.1 Η χρήση της βιομάζας στην παραγωγή ενέργειας	4
1.1.1 Χαρακτηριστικά της βιομάζας.....	6
1.2 Βιοκαύσιμα	7
1.2.1 Διαδικασία μετατροπής της βιομάζας σε βιοκαύσιμα	9
1.2.2 Βιοντίζελ και βιοαιθανόλη ως εναλλακτικά καύσιμα του μέλλοντος	11
1.3 Βιοκαύσιμα πρώτης γενεάς.....	15
1.4 Βιοκαύσιμα δεύτερης γενεάς	16
1.4.1 Πυρόλυση της βιομάζας και «μέθοδος ταχείας πυρόλυσης»	17
1.4.2 Χαρακτηριστικά του ελαίου πυρόλυσης.....	19
1.4.3 Ζύμωση του ελαίου πυρόλυσης.....	20
1.5 Οι μικροοργανισμοί που χρησιμοποιήθηκαν στην παρούσα εργασία	22
2. ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ	26
2.1 Μικροοργανισμοί που χρησιμοποιήθηκαν στις πειραματικές ζυμώσεις	26
2.2 Θρεπτικά υλικά	27
2.3 Έλαιο της πυρόλυσης (βιοέλαιο).....	27
2.4 Καλλιέργεια των ζυμών	28
2.5 Μέθοδοι εκτίμησης του πληθυσμού των ζυμών.....	28
2.6 Ανάλυση μέσω HPLC.....	29
2.7 Η «έκφραση» του γονιδίου LGK.....	30
3. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ	32
3.1 Ανάλυση της ανάπτυξης των ζυμών <i>Saccharomyces cerevisiae</i> και «Νέα ζύμη» σε YEM θρεπτικό υλικό με έλαιο πυρόλυσης.	32
3.2 Ανάλυση της ανάπτυξης των ζυμών <i>S. cerevisiae</i> και του <i>C. curvatus</i> , σε θρεπτικό υλικό YEM με έλαιο πυρόλυσης.	35
3.3 Ανάλυση του ενδοκυτταρικού ελαίου στη ζύμη <i>Cryptococcus curvatus</i>	36
3.4 Ανάπτυξη των μικροοργανισμών <i>S. cerevisiae</i> και <i>C. curvatus</i> σε Mineral medium θρεπτικό υλικό, στο οποίο έχει προστεθεί έλαιο πυρόλυσης	37
3.5 Ανάλυση της παραγωγής αιθανόλης κατά την διάρκεια της ανάπτυξης της ζύμης <i>S. cerevisiae</i> σε έλαιο πυρόλυσης.....	39
3.6 Κλωνοποίηση και "έκφραση" του γονιδίου LGK με την χρήση του συστήματος pBAD-TOPO.	42
3.7 Ανάπτυξη του βακτηρίου <i>E. coli</i> σε M9 θρεπτικό υλικό στο οποίο έχει προστεθεί λεβογλουκοζάνη.	43

4. ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ.....	46
ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ.....	49

ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Η ταχεία μείωση των οργανικών καυσίμων οδηγεί τους ανθρώπους στην τακτική εύρεσης εναλλακτικών πηγών ενέργειας. Μία από τις τεχνικές που παρουσιάζουν ιδιαίτερο ενδιαφέρον, είναι αυτή της παραγωγής αιθανόλης, μέσω της επεξεργασίας της βιομάζας.

Η πυρόλυση είναι μια μέθοδος μέσω της οποίας διασπάται η βιομάζα σε μικρότερα υλικά, τα οποία μπορούν να χρησιμοποιηθούν ως βασικά συστατικά για την παραγωγή αιθανόλης. Η «μέθοδος ταχείας πυρόλυσης», δίνει την δυνατότητα παραγωγής ελαίου πυρόλυσης ή αλλιώς βιοελαίου από τη χρήση της βιομάζας. Το κύριο συστατικό του ελαίου πυρόλυσης είναι η λεβογλουκοζάνη, με περιεκτικότητα μεγαλύτερη από 30% (w/v). Η λεβογλουκοζάνη είναι ένα ανυδροσάκχαρο, προϊόν το οποίο παράγεται από την διάσπαση της κυτταρίνης, που είναι το κύριο συστατικό της βιομάζας. Η λεβογλουκοζάνη μπορεί εύκολα να υδρολυθεί σε γλυκόζη.

Στην παρούσα εργασία μελετήθηκαν συγκεκριμένοι μικροοργανισμοί που έχουν την ικανότητα να ζυμώνουν το έλαιο πυρόλυσης για την παραγωγή προϊόντων όπως η βιοαιθανόλη και το βιοντίζελ. Οι ζύμες που μελετήθηκαν ήταν η *Saccharomyces cerevisiae* και η *Cryptococcus curvatus*, οι οποίες παρουσιάζουν ιδιαίτερο ενδιαφέρον λόγω της δυνατότητας τους να παράγουν αιθανόλη (*S. cerevisiae*) από την γλυκόζη και βιοντίζελ (*C. curvatus*) από διαφορετικές πηγές άνθρακα. Και οι δύο αυτοί μικροοργανισμοί, αναπτύχθηκαν σε YEM, YPD και Mineral Medium θρεπτικά υλικά, με διαφορετικές ποσότητες γλυκόζης και ελαίου πυρόλυσης. Η ανάπτυξη των ζυμών παρακολουθείτο και τα προϊόντα της ζύμωσης αναλύονταν. Και οι δύο ζύμες απέδειξαν ότι έχουν την ικανότητα να αναπτύσσονται σε θρεπτικά υλικά, τα οποία περιέχουν σημαντικές ποσότητες υδρολυμένου ελαίου πυρόλυσης.

Για να γίνει δυνατή η ανάπτυξη των μικροοργανισμών στην λεβογλουκοζάνη ως πηγή άνθρακα, απομονώθηκε το γονίδιο LGK από τον *Aspergillus niger* και με την χρήση συγκεκριμένων εκκινητών, κλωνοποιήθηκε στο βακτήριο *Escherichia coli*. Η «έκφραση» του LGK στο *E. coli*, εξετάστηκε με την εφαρμογή της SDS-PAGE ηλεκτροφόρησης και με την ανάπτυξή του σε τρυβλία που περιείχαν λεβογλουκοζάνη ως μοναδική πηγή άνθρακα, έτσι ώστε να αποδειχτεί η ικανότητα του κλωνοποιημένου *E. coli* να την μεταβολίζει.

Abstract

With the rapid decline of fossil fuels, people are now looking for alternative sources of energy. One of the main areas of interest is the production of ethanol through the use of biomass. Pyrolysis may be an alternative method to degrade biomass into small components and use this as a feedstock in ethanol fermentation. So called pyrolysis oil is derived from biomass through the use of "Fast pyrolysis Technology".

The main component of pyrolysis oil is levoglucosan, which makes up over 30 % (w/v) of the pyrolysis oil. Levoglucosan, an anhydrosugar, is a degradation product from cellulose, the main component of the biomass. Levoglucosan can be hydrolyzed to glucose.

In this study certain microorganisms were studied, which are capable of fermenting the pyrolysis oil and thereby producing interesting products, like ethanol and biodiesel. These microorganisms included *Saccharomyces cerevisiae* and *Cryptococcus curvatus* which are interesting because *Saccharomyces* is able to produce ethanol from glucose, and *Cryptococcus* is able to produce bio-diesel from different carbon sources.

Both *Saccharomyces* and *Cryptococcus* are grown on both YEM, YPD and Mineral-media with different amounts of glucose and different amounts of pyrolysis oil. Growth of the micro-organisms is monitored and fermentation products are analyzed. Both organisms are able to grow in media with substantial amounts of hydrolyzed pyrolysis oil.

In order to be able to grow the micro-organisms on levoglucosan as a carbon source the LGK-gene from *Aspergillus niger* was cloned with gene specific primers and transformed in *Escherichia coli*.

The expression of the LGK in *E. coli* was monitored by protein gel electrophoresis and by growth on levoglucosan medium. The transformed *E. coli* was grown on plates containing levoglucosan as the sole carbon source in order to show the capability to metabolize levoglucosan.

ΣΚΟΠΟΣ

Η πτυχιακή αυτή εργασία είχε ως σκοπό την μελέτη της ζύμωσης του ελαίου πυρόλυσης της βιομάζας, από συγκεκριμένους μικροοργανισμούς, για την παραγωγή βιοαιθανόλης, δηλαδή ενέργειας. Οι μικροοργανισμοί που μας απασχόλησαν ήταν οι ζύμες *Saccharomyces cerevisiae* και *Cryptococcus curvarus* που συντέλεσαν στην ζύμωση του ελαίου πυρόλυσης, αφού πρώτα το υδρολυμένο έλαιο αποστειρώθηκε σε αυτόκαυστο μαζί με θρεπτικό υπόστρωμα YEM ή YPD ή Mineral medium.

Επιπροσθέτως, εξαιτίας της χρονοβόρας και βλαβερής διαδικασίας της υδρόλυσης της λεβογλουκοζάνης (βασικό συστατικό του ελαίου της πυρόλυσης) σε γλυκόζη, μελετήθηκε η ικανότητα του ενζύμου levoglucosan kinase (LGK) που βρίσκεται στον μύκητα *Aspergillus niger*, να υδρολύσει την λεβογλουκοζάνη έτσι ώστε αυτή να μπορεί να χρησιμοποιηθεί ως πηγή άνθρακα από τους μικροοργανισμούς. Το LGK μεταφέρθηκε από τον μύκητα *A. niger* στο βακτήριο *Escherichia coli* και στη συνέχεια το κλωνοποιημένο βακτήριο αναπτύχθηκε σε υπόστρωμα LB, παρουσία λεβογλουκοζάνης.

Με αφορμή αυτό το πείραμα, οι επιστήμονες προσπαθούν τώρα να βρουν περισσότερους μικροοργανισμούς, που με την βοήθεια του ενζύμου LGK να μπορούν να αναπτυχθούν στο έλαιο της πυρόλυσης, αποφεύγοντας έτσι την διαδικασία της υδρόλυσης. Η χρήση των ζυμών *Saccharomyces* και *Cryptococcus* μπορεί να θεωρηθεί πλέον ως εναλλακτική.

1. ΕΙΣΑΓΩΓΗ

1.1 Η χρήση της βιομάζας στην παραγωγή ενέργειας

Βιομάζα καλείται το σύνολο των αγροτικών καλλιεργειών και των δασικών εκμεταλλεύσεων, το βιοαποδομήσιμο κλάσμα των αποβλήτων, των υπολοίπων των αγροτικών, δασικών και σχετικών διεργασιών και των βιομηχανικών και αστικών αποβλήτων. Η βιομάζα είναι διαθέσιμη ευρέως και αποτελεί μία καθαρή και ανανεώσιμη πηγή, η οποία δεν συνεισφέρει στο φαινόμενο του θερμοκηπίου, δεδομένου ότι η ποσότητα του διοξειδίου του άνθρακα που εκλύεται από την καύση της είναι ίση περίπου με αυτή που προσλαμβάνεται από τα φυτά κατά τις διεργασίες ανάπτυξής της.

Η βιομάζα μπορεί να παίξει σημαντικό ρόλο στην αειφόρο ανάπτυξη των βιομηχανοποιημένων χωρών, επειδή α) οδηγεί σε κερδοφόρα χρήση των αγροβιομηχανικών υπολειμμάτων, αποφεύγοντας το κόστος για τη διάθεσή τους ως απόβλητα, β) παρέχει νέες δυνατότητες ανάπτυξης σε περιθωριοποιημένες περιοχές, γ) προωθεί την έρευνα και την ανάπτυξη πάνω σε τεχνολογίες μετατροπής και χρήσης της, δ) ευνοεί την παραγωγή ενέργειας σε τοπικό επίπεδο και κατά συνέπεια την οικονομική και πολιτική αυτονομία, επίσης ε) δημιουργεί και προωθεί νέες αγορές για τα προϊόντα επεξεργασίας της (Φατσικώστας, 2005).

Επιπλέον, μια μεγάλη ποικιλία πρώτων υλών της βιομάζας μπορεί να χρησιμοποιηθεί για παραγωγή ενέργειας:

- ♣ Ξύλο σε όλες του τις μορφές
- ♣ Άχυρο και βγάσση από σακχαροκάλαμο
- ♣ Φυτικά υπολείμματα αγροτοκαλλιεργειών
- ♣ Αστικά και βιομηχανικά απόβλητα (κατά μέσο όρο το 40% των στερεών αστικών αποβλήτων είναι οργανικά υλικά)
- ♣ Ξηρά φυτά και λάσπη από καθαρισμό νερού ή ζωικά υπολείμματα
- ♣ Φυτά παραγωγής φυτικών ελαίων (ηλίανθοι, ελαιοκράμβη, φοινικέλαια κ.λ.π.)
- ♣ Ενεργειακά φυτά (σακχαρότευτλα, σακχαροκάλαμο, σόργο)

Τα ενεργειακά φυτά βρίσκονται σε πρώιμο στάδιο ανάπτυξης σε σύγκριση με τις συμβατικές καλλιέργειες, και κατά συνέπεια η συμβολή τους στην παραγωγή ενέργειας θα πραγματοποιηθεί σε βάθος χρόνου.

Σύμφωνα με τον Χαραλαμπόπουλο (2005), η ενεργειακή αξία της βιομάζας από φυτική ύλη προέρχεται αρχικά από την ηλιακή ενέργεια η οποία δεσμεύεται μέσω της φωτοσύνθεσης. Η χημική ενέργεια που έχει αποθηκευτεί σε φυτά και ζώα (που τρέφονται με φυτά ή άλλα ζώα) ή στα απόβλητα που παράγουν, ονομάζεται βιοενέργεια. Κατά την διάρκεια των ενεργειακών μετατροπών όπως είναι η καύση, η βιομάζα απελευθερώνει την ενέργειά της συχνά με την μορφή θερμότητας, ενώ ο άνθρακας οξειδώνεται σε διοξείδιο του άνθρακα αντικαθιστώντας ουσιαστικά εκείνον που είχε απορροφηθεί κατά την ανάπτυξη του φυτού. Στην πραγματικότητα, η χρήση της βιομάζας στην παραγωγή ενέργειας είναι η αντίστροφη διαδικασία της φωτοσύνθεσης. Από όλες τις υπόλοιπες ανανεώσιμες πηγές ενέργειας, η βιομάζα είναι η μοναδική που αντιπροσωπεύει την αποθηκευμένη ηλιακή ενέργεια. Επιπροσθέτως, είναι η μόνη που συγκροτείται από άνθρακα και είναι σε θέση να παράγει μετά από επεξεργασία, στερεά, υγρά και αέρια καύσιμα .

Η χρήση της βιομάζας αναμένεται να επιφέρει μεγάλα οφέλη στο περιβάλλον, τόσο μέσω της συνεισφοράς της στην εκπλήρωση των στόχων της συνθήκης του Kyoto, όσο και με την ενίσχυση των τοπικών οικονομιών. Σύμφωνα με την συνθήκη του Kyoto (Kyoto Protocol, 2005), τα βιομηχανικά ανεπτυγμένα κράτη υποχρεούνται να μειώσουν τις εκπομπές έξι αερίων που συμβάλουν στο φαινόμενο του θερμοκηπίου την περίοδο 2008-2012 σε ποσοστό 5,2%, σε σχέση με τα επίπεδα του 1990.

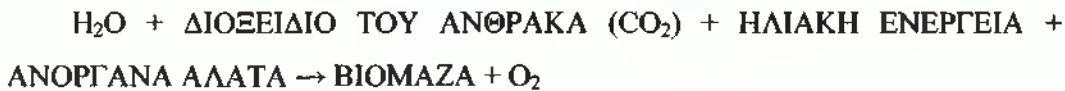
Η βιομάζα θεωρείται μία από τις σημαντικότερες ανανεώσιμες πηγές ενέργειας, «πηγή του μέλλοντος», λόγω της οικονομικής βιωσιμότητας και της "φιλικότητάς" της προς το περιβάλλον. Το 1990 ήταν ήδη ανάμεσα στις τέσσερις μεγαλύτερες πηγές ενέργειας στο κόσμο, εφοδιάζοντας το 13% της χρησιμοποιούμενης βιομάζας (Hall, 1997).

Πέραν όμως των απόψεων περί μεγάλων οφελών της βιομάζας, διατυπώνεται επίσης και η άλλη άποψη που αναφέρει ότι είναι πιο σημαντικό να χρησιμοποιηθεί η βιομάζα ως τροφή, για να αντιμετωπιστεί η παγκόσμια πείνα, παρά να

χρησιμοποιηθεί ως πρώτη ύλη για την παραγωγή βιοκαυσίμων (Παπανικολάου, 2006).

1.1.1 Χαρακτηριστικά της βιομάζας

Η ενέργεια της βιομάζας (βιοενέργεια ή «πράσινη ενέργεια») είναι δευτερογενής ηλιακή ενέργεια και όπως προαναφέρθηκε, είναι αποτέλεσμα της φωτοσυνθετικής δραστηριότητας των φυτικών οργανισμών. Με βάση αυτή τη δραστηριότητα, η χλωροφύλλη των φυτών μετασχηματίζει την ηλιακή ενέργεια με μια σειρά διεργασιών, χρησιμοποιώντας ως βασικές πρώτες ύλες το νερό, το διοξείδιο του άνθρακα από την ατμόσφαιρα και ανόργανα συστατικά από το έδαφος. Η διεργασία αυτή μπορεί να παρασταθεί σχηματικά ως εξής (Τσούτσος, 2004) :



Η μόνη φυσικά ευρισκόμενη πηγή ενέργειας με άνθρακα που τα αποθέματά της είναι ικανά ώστε να μπορεί να χρησιμοποιηθεί ως υποκατάστατο των ορυκτών καυσίμων, είναι η βιομάζα. Η αξιοποίησή της μπορεί να γίνει με τη μετατροπή της σε μεγάλη ποικιλία προϊόντων, με διάφορες μεθόδους και με τη χρήση σχετικά απλής τεχνολογίας. Σαν πλεονέκτημά της καταγράφεται και το ότι κατά την παραγωγή και την μετατροπή της, δεν δημιουργούνται οικολογικά και περιβαλλοντολογικά προβλήματα. Από την άλλη, ως μορφή ενέργειας χαρακτηρίζεται από πολυμορφία, χαμηλό ενεργειακό περιεχόμενο σε σύγκριση με τα ορυκτά καύσιμα, λόγω της χαμηλής πυκνότητάς της και της υψηλής περιεκτικότητάς της σε νερό. Τα χαρακτηριστικά αυτά συνεπάγονται πρόσθετες, σε σχέση με τα ορυκτά, δυσκολίες στη συλλογή, μεταφορά και αποθήκευσή της. Κατά συνέπεια το κόστος μετατροπής της σε εύχρηστες μορφές ενέργειας παραμένει υψηλό (Γουσγουριώτης, 2005).

Δίνονται αναλυτικά τα πλεονεκτήματα και μειονεκτήματα της ενεργειακής αξιοποίησης της βιομάζας.

Πλεονεκτήματα:

1. Η καύση της βιομάζας έχει μηδενικό ισοζύγιο CO₂ και δεν συνεισφέρει στο φαινόμενο του θερμοκηπίου, επειδή οι ποσότητες του διοξειδίου του άνθρακα που απελευθερώνονται κατά την καύση της, δεσμεύονται πάλι από τα φυτά για τη δημιουργία της.

2. Η μηδαμινή ύπαρξη του θείου στη βιομάζα, συμβάλλει σημαντικά στον περιορισμό των εκπομπών του SO₂ που είναι υπεύθυνο για την όξινη βροχή.

3. Εφόσον η βιομάζα είναι εγχώρια πηγή ενέργειας, η αξιοποίησή της (σε ενέργεια) συμβάλλει σημαντικά στη μείωση της εξάρτησης από εισαγόμενα καύσιμα, στη βελτίωση του εμπορικού ισοζυγίου, στην εξασφάλιση του ενεργειακού εφοδιασμού και στην εξοικονόμηση του συναλλάγματος.

4. Η ενεργειακή αξιοποίηση της βιομάζας, αυξάνει επίσης την απασχόληση σε αγροτικές περιοχές με τη χρήση εναλλακτικών καλλιεργειών (διάφορα είδη ελαιοκράμβης, σόργο, καλάμι) και τη δημιουργία εναλλακτικών αγορών για τις παραδοσιακές καλλιέργειες (ηλίανθος κ.α), συμβάλλοντας έτσι στην κοινωνικο-οικονομική ανάπτυξη. Μελέτες έχουν δείξει ότι η παραγωγή υγρών βιοκαυσίμων έχει θετικά αποτελέσματα στον τομέα της απασχόλησης, τόσο στον αγροτικό, όσο και στο βιομηχανικό χώρο.

Μειονεκτήματα:

1. Ο αυξημένος όγκος και η μεγάλη περιεκτικότητα της βιομάζας σε υγρασία, σε σχέση με τα ορυκτά καύσιμα, δυσχεραίνουν την ενεργειακή της αξιοποίηση.

2. Η μεγάλη διασπορά και η εποχιακή παραγωγή της βιομάζας, δυσκολεύουν την συνεχή τροφοδοσία με πρώτη ύλη των μονάδων ενεργειακής αξιοποίησής της.

3. Βάση των παραπάνω, παρουσιάζονται δυσκολίες κατά τη συλλογή, μεταφορά και αποθήκευση της βιομάζας που αυξάνουν το κόστος της ενεργειακής αξιοποίησής της.

4. Τέλος, οι σύγχρονες και βελτιωμένες τεχνολογίες μετατροπής της βιομάζας, απαιτούν υψηλό κόστος εξοπλισμού συγκρινόμενες με αυτό των συμβατικών καυσίμων (Γουσγουριώτης, 2005).

1.2 Βιοκαύσιμα

Η εξάντληση των αποθεμάτων του πετρελαίου, καθώς και οι αρνητικές επιπτώσεις στο περιβάλλον από τη χρήση ορυκτών καυσίμων, έχει οδηγήσει σε μια ραγδαία αύξηση του ενδιαφέροντος για τις εναλλακτικές πηγές ενέργειας. Τα βιοκαύσιμα θεωρούνται ως η μόνη βιώσιμη πηγή ενέργειας για το άμεσο μέλλον και

όπως προαναφέρθηκε, μπορούν να αποτελέσουν τη βάση για βιώσιμη ανάπτυξη από κοινωνικό-οικονομική και περιβαλλοντική σκοπιά (Τζιμόπουλος, 2009).

Τα βιοκαύσιμα χρησιμοποιούνται ως πηγές ενέργειας από αρχαιοτάτων χρόνων (Xiao-hua and Zhenmin, 2004), ωστόσο η αύξηση της χρήσης τους για την παραγωγή ενέργειας είναι ιδιαίτερης σημασίας, διότι α) μειώνουν τους αέριους ρύπους που συμβάλλουν στο φαινόμενο του θερμοκηπίου, β) παρέχουν ενεργειακή ελευθερία και ίσως και προσφορά νέων θέσεων εργασίας (Wierzbicka *et al.*, 2005), γ) μπορεί να αντικαταστήσουν τα οργανικά καύσιμα τα οποία θεωρούνται ιδιαίτερος ρυπαντικά, καθώς επίσης και δ) να αντικαταστήσουν τα πετρελαιοειδή καύσιμα για παραγωγή θερμότητας, ενέργειας ή ακόμη και χημικών προϊόντων (Nwafor, 2004).

Όπως είναι ήδη γνωστό, τα βιοκαύσιμα που προέρχονται από την φυτική βιομάζα, διατηρούν μία σχετική ουδετερότητα ως προς τις εκπομπές διοξειδίου του άνθρακα, καθώς το διοξείδιο του άνθρακα το οποίο απελευθερώνεται κατά τη διάρκεια της καύσεώς τους, αντισταθμίζεται κατά ένα μεγάλο ποσοστό από το διοξείδιο του άνθρακα που βρίσκεται στον αρχικό οργανισμό, από τον οποίο και παράχθηκε (Johnson *et al.*, 2007).

Τα βιοκαύσιμα χωρίζονται σε υγρά και αέρια, δύο κατηγορίες με διαφορετικές προοπτικές όσον αφορά την χρήση τους. Η παγκόσμια κοινότητα προσανατολίζεται προς την ενεργειακή κυρίως χρήση των αερίων βιοκαυσίμων και ειδικότερα προς την παραγωγή ηλεκτρισμού και θερμότητας, από το syngas (θερμοχημική αεριοποίηση της βιομάζας), το βιοαέριο από αναερόβιους χωνευτήρες, και σε μικρότερο βαθμό σήμερα από το Βιοϋδρογόνο. Για το τελευταίο επιφυλάσσεται μια ευρύτερη χρήση, που στο μέλλον θα περιλαμβάνει την αξιοποίησή του τόσο για ηλεκτροπαραγωγή σε μικρή κλίμακα, όσο και για την κίνηση οχημάτων μέσω των κυψελών του καυσίμου (fuel cells) (Διαχειριστής Ελληνικού Συστήματος Μεταφοράς Ηλεκτρικής Ενέργειας Α.Ε, 2000).

Τα υγρά βιοκαύσιμα όπως το Βιοντίζελ, η Βιοαιθανόλη και η Βιομεθανόλη, με εξαίρεση τα βιοέλαια που παράγονται από την πυρόλυση της βιομάζας, προορίζονται σχεδόν αποκλειστικά για την κίνηση οχημάτων, αρχικά με ανάμιξη σε μικρά ποσοστά με τα αντιστοιχών ιδιοτήτων συμβατικά καύσιμα και η χρήση τους προβλέπεται να αυξάνεται σταθερά για τα επόμενα 15 χρόνια. Πολλές χώρες προτιμούν την χρήση βιοκαυσίμων που προέρχονται από την σωστή και αποτελεσματική χρήση της

αγροτικής και δασικής βιομηχανίας τους. Προϊόντα όπως τα άχυρα, το χορτάρι, τα πριονίδια, οι ρίζες, τα κλαδιά, τα φύλλα και ο φλοιός των δέντρων, χρησιμοποιούνται με διάφορους τρόπους για την παραγωγή ενέργειας. Ο τρόπος χρήσης τους διαφέρει, ένας τρόπος είναι η καύση των προϊόντων καθώς και η άντληση παραγώγων από αυτά σε υγρή ή αέρια μορφή, όπως είναι η αιθανόλη και η μεθάνη. Μερικές φορές αυτά τα βιοπροϊόντα ενώνονται με ήμι- οργανική τύρφη και κάρβουνο για την εξασφάλιση καλύτερης καύσης (Demirbas and Balat, 2006).

Η διεθνής αγορά των βιοκαυσίμων είναι ακόμη στα πρώτα αλλά πολύ σημαντικά βήματά της. Μέχρι στιγμής, η Ευρωπαϊκή Επιτροπή έχει υποδείξει ότι η βιομάζα θα παίζει πολύ σημαντικό ρόλο στην μελλοντική πορεία της Ευρώπης και λόγω αυτού, το εμπόριο βιοκαυσίμων είναι ένα πολύ πιθανό σενάριο. Το πιθανότερο είναι ότι θα υπάρξουν επίσης πολλές διακυμάνσεις, κατά την διάρκεια της εξέλιξης της καινούργιας αυτής αγοράς στον χώρο των καυσίμων (Ericsson and Nilsson, 2004).

1.2.1 Διαδικασία μετατροπής της βιομάζας σε βιοκαύσιμα

Όπως έχει ήδη προαναφερθεί, τα βιοκαύσιμα, είναι καύσιμα υγρής ή αέριας μορφής που προέρχονται από φυτικά υλικά, αγροτικά κατάλοιπα, αστικά λύματα καθώς και από υποπροϊόντα δασικής προέλευσης και μπορούν να υποκατασταθούν ως καύσιμα οχήματος είτε ολοκληρωτικά, είτε ως μέρος μίγματος μαζί με άλλο προϊόν. Τα βιοκαύσιμα επίσης προέρχονται από την βιομάζα, που αποτελεί σήμερα περίπου το 15% της παγκόσμιας κατανάλωσης πρωτογενούς ενέργειας. Στα μειονεκτήματα της στερεής βιομάζας ως καυσίμου θερμικών σταθμών για την παραγωγή ενέργειας, περιλαμβάνονται α) η χαμηλή πυκνότητά της που συνεπάγεται με δυσκολίες στην μεταφορά και αποθήκευσή της, β) η χαμηλή θερμοδογόνος δύναμή της και γ) η ακαταλληλότητά της για μηχανές εσωτερικής καύσης. Για τους λόγους αυτούς επιδιώκεται συχνά η μετατροπή της σε άλλη μορφή ή φάση (European Commission, 2004).

Η απλούστερη μέθοδος μετατροπής της βιομάζας σε βιοκαύσιμα, είναι η παραγωγή συμπυκνωμάτων ή συσσωματωμάτων για την μείωση του όγκου της και για την αφαίρεση μέρους της υγρασίας της. Μια σειρά άλλες μέθοδοι αποσκοπούν στην ρευστοποίησή της, δηλαδή στην παραγωγή υγρών ή αερίων βιοκαυσίμων μέσω χημικών ή βιολογικών διεργασιών.

Η μετατροπή της βιομάζας σε βιοκαύσιμα ακολουθεί τρεις κυρίως μεθόδους επεξεργασίας που χαρακτηρίζονται τόσο από τις διαφορετικές διαδικασίες επεξεργασίας που ακολουθούνται, όσο και από το είδος του καυσίμου που παράγεται από αυτές (Πίνακας 1).

Η παλαιότερη μέθοδος επεξεργασίας είναι εκείνη που στηρίζεται στις αγροχημικές μεθόδους, με τις οποίες παράγονται κυρίως φυτικά έλαια από σπόρους και καρπούς ελαιούχων φυτών και δέντρων. Αυτά μπορούν στην συνέχεια με την χημική επεξεργασία της μετεστεροποίησης να μετατραπούν σε βιοντίζελ.

Πίνακας 1. Οι τρεις κύριοι μέθοδοι μετατροπής της βιομάζας σε βιοκαύσιμα.

ΕΠΕΞΕΡΓΑΣΙΑ	ΔΙΑΔΙΚΑΣΙΑ	ΠΑΡΑΓΟΜΕΝΑ ΚΑΥΣΙΜΑ
Αγροχημική	Συμπίεση, Έκθλιψη	Φυτικά Έλαια
	Μετεστεροποίηση	Βιοντίζελ
Θερμοχημική	Ανθρακοποίηση	Κάρβουνο
	Πυρόλυση/ Αεριοποίηση	Βιοέλαια Βιοϋδρογόνο/ Syngas
	Υγροποίηση	Βιομεθανόλη
Βιοχημική	Αλκοολική Ζύμωση	Βιοιθανόλη
	Αναερόβια Χώνευση	Βιοαέριο, Βιοϋδρογόνο

Πηγή: Διαχειριστής Ελληνικού Συστήματος Μεταφοράς Ηλεκτρικής Ενέργειας Α.Ε. (2000)

Από τις μεθόδους θερμοχημικής κατεργασίας της βιομάζας, ιδιαίτερη σημασία κυρίως για την ηλεκτροπαραγωγή έχει η πυρόλυση / αεριοποίηση, δηλαδή η θερμική αποσύνθεση της βιομάζας σε υψηλές θερμοκρασίες, με αποτέλεσμα την παραγωγή ενός μίγματος υγρών, αερίων και στερεών καυσίμων προϊόντων. Μεταβάλλοντας τις συνθήκες της πυρόλυσης μπορούμε να μεταβάλλουμε τις αναλογίες τους ώστε να πάρουμε κυρίως υγρά (βιοέλαια) ή αέρια (syngas) καύσιμα, εις βάρος της παραγωγής στερεών ανθρακούχων υπολειμμάτων.

Η τρίτη μέθοδος επεξεργασίας είναι εκείνη που στηρίζεται στις **βιοχημικές μεθόδους** για την παραγωγή είτε Βιοαερίου, είτε αιθυλικής αλκοόλης (βιοαιθανόλης). Από την κατηγορία των βιοχημικών μεθόδων επεξεργασίας, μεγαλύτερο ρόλο παίζει η αναερόβια χώνευση, δηλαδή η αποσύνθεση της οργανικής ύλης από ένα μίγμα μικροοργανισμών όπως τα βακτήρια, για την παραγωγή αερίου καυσίμου πλούσιο σε μεθάνιο ή βιοαέριο. Το βιοαέριο είναι ένα αρκετά καθαρό καύσιμο που μπορεί να χρησιμοποιηθεί για θέρμανση, για παραγωγή ηλεκτρικής ενέργειας αλλά και σε πολλούς άλλους τομείς (Demirbas, 2004). Επίσης, είναι "φίλικό" ως προς το περιβάλλον, "καθαρό", φθηνό και καύσιμο πολλαπλής χρησιμότητας (Kardí *et al.*, 2005).

Η αναερόβια αφομοίωση της βιομάζας χρησιμοποιείται για περίπου έναν αιώνα τώρα και είναι μια πολύ δημοφιλής μέθοδος σε πολλές αναπτυσσόμενες χώρες, όπως η Κίνα και η Ινδία (Διαχειριστής Ελληνικού Συστήματος Μεταφοράς Ηλεκτρικής Ενέργειας Α.Ε, 2000).

1.2.2 Βιοντίζελ και βιοαιθανόλη ως εναλλακτικά καύσιμα του μέλλοντος

Μία από τις πιο καθοριστικές προκλήσεις του 21ου αιώνα θα είναι η αλλαγή του ενεργειακού μας εφοδιασμού από οργανικά καύσιμα σε εναλλακτικά. Περίπου το 90% των ενεργειακών μας αναγκών καλύπτεται από τα 3 κυριότερα οργανικά καύσιμα όπως το κάρβουνο, το πετρέλαιο και το φυσικό αέριο (Dale, 2008). Για παράδειγμα στην Βραζιλία το 46% της ενέργειας παράγεται από ανανεώσιμες πηγές, από τις οποίες το 15% προκύπτει από την χρήση ζαχαροκάλαμου (Sivakumar *et al.*, 2009)

Τα υγρά βιοκαύσιμα ως εναλλακτική λύση παρέχουν ένα πολλά υποσχόμενο μέλλον σε σχέση με τα συμβατικά καύσιμα. Τα τρία βασικά χαρακτηριστικά ενός σωστού υγρού ανανεώσιμου βιοκαυσίμου είναι τα εξής :

- ♣ Πρέπει να έχει δυναμική έτσι ώστε να μπορεί να πάρει την θέση του οργανικού καυσίμου, χωρίς να θέτει σε κίνδυνο τα παγκόσμια αποθέματα τροφών.
- ♣ Πρέπει να προσδιορίζει μία θετική ενεργειακή ισορροπία (Johnson *et al.*, 2007).
- ♣ Δεν πρέπει να ρυπαίνει ούτε στο ελάχιστο το περιβάλλον.

1.2.2.1 Βιοντίζελ

Μία δυνατότητα για παραγωγή βιοκαυσίμων από φυτική βιομάζα, παρέχει η χρήση των φυτικών ελαίων από σπόρους φυτών και άλγη. Τα έλαια αυτά μοιάζουν στην σύσταση με τα συμβατικά ορυκτά έλαια και μπορούν να μετατραπούν σε βιοντίζελ. Η Ευρώπη που παρήγαγε το 90% του παγκόσμιου βιοντίζελ το 2005 (de la Piscina and Homs, 2008), χρησιμοποιώντας ως πρώτη ύλη σπόρους από το φυτό ηλιοτρόπιο και το φοινικέλαιο. Έχει αποδειχτεί ότι τα έλαια από φυτά, αποδίδουν περισσότερη ενέργεια σε σχέση με τα βιοκαύσιμα που στηρίζονται στην αιθανόλη και μόνο 10% λιγότερη ενέργεια από το ντίζελ που παράγεται από το ορυκτό πετρέλαιο (Dyer *et al.*, 2008).

Το βιοντίζελ είναι ένα πολλά υποσχόμενο καύσιμο, παραπλήσιο και άριστο υποκατάστατο του συμβατικού ντίζελ. Χρησιμοποιείται ευρύτατα όχι μόνο στην Ευρώπη αλλά και στις Η.Π.Α όπου και εκεί η χρήση του είναι συνεχώς αυξανόμενη. Θεωρείται ως το πλέον διαδεδομένο βιοκαύσιμο το οποίο χρησιμοποιείται τόσο αυτούσιο, όσο και σε διάφορες αναλογίες σε μίγματα με το συμβατικό ντίζελ. Στην Ευρώπη μάλιστα προγραμματίστηκε η χρήση βιοκαυσίμων ως καύσιμα κίνησης, σε ποσοστό τουλάχιστον 2% από 1/1/2006, με στόχο την αύξησή τους σε ποσοστό 5.75% μέχρι τις 31/12/2010, με βάση την οδηγία 2003/30/EC (Directive 2003/30/EC) της Ευρωπαϊκής Ένωσης. Αυτό σημαίνει ότι το βιοντίζελ θα πρέπει να προστεθεί στο ορυκτό ντίζελ κίνησης τουλάχιστον σε αυτά τα ποσοστά, αφού είναι πρακτικά το μόνο χρησιμοποιούμενο βιοκαύσιμο που προσφέρεται για ανάμιξη με το συμβατικό ντίζελ (Κέμου, 2010).

1.2.2.2 Βιοαιθανόλη

Ένα άλλο είδος βιοκαυσίμου, που απασχολεί ιδιαίτερα όσον αφορά την χρήση του ως καύσιμο σε οχήματα αλλά και στην βιομηχανία αλκοολούχων ποτών, είναι η βιοαιθανόλη. Η πρώτη μεγάλης κλίμακας χρήση της αιθανόλης ως καύσιμο έγινε στις αρχές του 1900. Δεν έμεινε όμως για πολύ στο προσκήνιο αφού το φθηνό πετρέλαιο την αντικατέστησε πολύ γρήγορα. Η κατάσταση αυτή διατηρήθηκε ως την πετρελαϊκή κρίση της δεκαετίας του 1970, ενώ το 1975 η κυβέρνηση της Βραζιλίας εισήγαγε το πρόγραμμα «Proalcool», που είχε ως σκοπό την αντικατάσταση της βενζίνης με αλκοόλη και κατά συνέπεια, η αιθανόλη επανήλθε στο εμπορικό προσκήνιο (Παπανικολάου, 2006).

Η αιθανόλη (ή αιθυλική αλκοόλη), με χημικό τύπο C_2H_5OH , είναι το δεύτερο μέλος στην σειρά των αλειφατικών αλκοολών. Είναι ένα εύφλεκτο, άχρωμο, διαυγές υγρό με χαρακτηριστική οσμή, διαλυτό στο νερό και σε διάφορους οργανικούς διαλύτες. Είναι βιοαποικοδομήσιμη, χαμηλής τοξικότητας και προκαλεί πολύ μικρή περιβαλλοντική μόλυνση εάν ελευθερωθεί στο περιβάλλον. Κατά την τέλεια καύση της αιθανόλης παράγονται διοξείδιο του άνθρακα, νερό και μια μπλε φλόγα χωρίς υπολείμματα και με σημαντική απόδοση ενέργειας (Παπανικολάου, 2006).

Η αιθανόλη χρησιμοποιείται συνήθως για την αύξηση των οκτανίων και την μείωση των ρύπων της βενζίνης. Αναμιγνύεται με βενζίνη για να σχηματιστεί το μείγμα E10 δηλαδή 10% αιθανόλη και 90% βενζίνη, καθώς επίσης μπορεί να χρησιμοποιηθεί και σε μεγαλύτερες συγκεντρώσεις όπως E85 ή E95. Κατασκευαστές πρωτότυπων εξοπλισμών παράγουν ευέλικτα οχήματα όσον αφορά τα καύσιμα, για να μπορούν να κινηθούν με μείγμα E85 ή E95, ή με οποιονδήποτε συνδυασμό αιθανόλης με βενζίνη (Demirbas, 2003; Balat, 2005).

Η αιθανόλη ως καύσιμο έχει πολλά πλεονεκτήματα έναντι των συμβατικών καυσίμων, με κυριότερο ίσως την μείωση της ατμοσφαιρικής ρύπανσης. Πιο συγκεκριμένα:

1. Είναι μη ορυκτό καύσιμο του οποίου η παρασκευή και η καύση δεν αυξάνουν το φαινόμενο του θερμοκηπίου.

2. Είναι βιοαποικοδομήσιμη, μη τοξική και διαλυτή στο νερό, με αποτέλεσμα να μην προκαλεί αρνητικές επιπτώσεις στο περιβάλλον σε περίπτωση διαρροής.

3. Η χρήση της μπορεί να μειώσει σημαντικά τις εκπομπές διοξειδίου του άνθρακα, αφού η παραγωγή της μέσω της ζύμωσης της βιομάζας αποτελεί μέρος του κύκλου του άνθρακα (Wyman, 1994).

4. Η υψηλή περιεκτικότητά της σε οξυγόνο μειώνει τα επίπεδα του μονοξειδίου του άνθρακα και μάλιστα σε μεγαλύτερο ποσοστό από οποιοδήποτε άλλο οξυγονοποιητή. Εκτιμάται πως η μείωση της είναι της τάξεως του 25–30%. Στην Αγγλία εκτιμάται πως η μείωση των εκπομπών των οξειδίων του άνθρακα με την χρήση βιοαιθανόλης σε ποσοστό 5%, ισοδυναμεί με την απομάκρυνση από την κυκλοφορία 1.000.000 αυτοκινήτων (British Sugar plc, 2010).

5. Με την χρήση μιγμάτων αιθανόλης μειώνονται δραστικά οι εκπομπές υδρογονανθράκων, οι οποίοι αποτελούν μια από τις κύριες αιτίες για την μείωση του στρώματος του όζοντος.

6. Τα υψηλής συγκέντρωσης μίγματα αιθανόλης μπορούν να μειώσουν κατά 30% τις εκπομπές των πτητικών οργανικών συστατικών (Volatile Organic Compounds – VOCs).

7. Σε αντίθεση με τα ορυκτά καύσιμα των οποίων τα αποθέματα είναι πεπερασμένα, η αιθανόλη θεωρείται ανανεώσιμη πηγή ενέργειας, αφού προέρχεται από την βιομάζα.

8. Αυξάνει τον αριθμό των οκτανίων της βενζίνης με μικρό κόστος.

9. Μειώνεται η εξάρτηση των κρατών από το πετρέλαιο.

10. Δημιουργούνται νέες προοπτικές απασχόλησης στον γεωργικό τομέα, καθώς ανοίγει ο δρόμος για τις ενεργειακές καλλιέργειες όπως του ζαχαροκάλαμου, του σόργου κ.α.

11. Παράγεται εύκολα ακόμα και σε οικογενειακή κλίμακα και αποδίδει 34% περισσότερη ενέργεια από αυτή που απαιτείται για την παραγωγή της (Παπανικολάου, 2006).

Αν και η χρήση της καύσιμης αιθανόλης συγκεντρώνει σημαντικά πλεονεκτήματα, υπάρχει και η αντίθετη άποψη που θεωρεί πως η χρήση της δεν θα λειτουργήσει θετικά. Πιο συγκεκριμένα :

1. Το ενεργειακό περιεχόμενο της αιθανόλης ισοδυναμεί με τα 2/3 του αντίστοιχου της βενζίνης (Lynd, 1996). Συνεπώς, χρειάζεται περισσότερη αιθανόλη για να καλυφθεί η ίδια απόσταση από ένα όχημα (U.S Department of Energy, 2009).

2. Το κόστος παραγωγής της αιθανόλης είναι ακόμα υψηλότερο από της βενζίνης.

3. Η αιθανόλη μπορεί να μπλοκάρει ή ακόμη και να καταστρέψει τμήματα του συστήματος καυσίμων σε ορισμένα οχήματα, καθώς και να σταματήσει τη ροή του μίγματος καυσίμου ειδικότερα σε ζεστές καιρικές συνθήκες.

4. Πιστεύεται επίσης, πως η μείωση εκπομπών αερίων δεν είναι σημαντική και ελάχιστα συνεισφέρει στην βελτίωση της κατάστασης του περιβάλλοντος.

5. Τέλος, οι παραγωγοί των υπόλοιπων καυσίμων εναντιώνονται στην παροχή ιδιαίτερων κινήτρων στην βιομηχανία της αιθανόλης (Παπανικολάου, 2006).

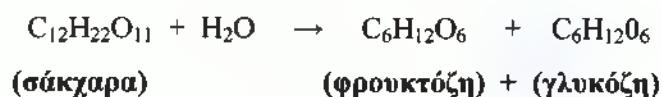
1.3 Βιοκαύσιμα πρώτης γενεάς

Ως βιοκαύσιμα πρώτης γενεάς ορίζονται εκείνα που προέρχονται από την φυτική βιομάζα όπως φυτικά έλαια, σακχαρούχα ή αμυλούχα φυτά κ.λπ. και χρησιμοποιούνται ως καύσιμα κίνησης ή θέρμανσης. Τα πιο σημαντικά βιοκαύσιμα αυτής της κατηγορίας είναι το βιοντίζελ και η βιοαιθανόλη.

Το βιοντίζελ πρώτης γενεάς είναι το προϊόν της μετεστεροποίησης των λιπαρών οξέων φυτικών ελαίων και είναι γνωστό και ως FAME (Fatty Acid Methyl Esters). Η πρώτη ύλη για την παραγωγή FAME βιοντίζελ είναι τα φυτικά σπορέλαια από διάφορες καλλιέργειες όπως ο ηλιόσπορος, το βαμβάκι, η ελαιοκράμβη, η σόγια, το καλαμπόκι κ.λπ, καθώς και τα χρησιμοποιημένα φυτικά έλαια. Τα φυτικά έλαια έρχονται σε επαφή με περίσσεια μεθανόλης για την αντίδραση της μετεστεροποίησης, παρουσία βασικού ή όξινου καταλύτη KOH ή NaOH (ανάλογα με τη φύση του φυτικού ελαίου), προκειμένου να επιτευχθεί υψηλή παραγωγή εστέρων. Το παραγόμενο μίγμα διαχωρίζεται. Οι παραγόμενοι εστέρες καθαρίζονται και συλλέγονται δίνοντας το προϊόν βιοντίζελ, ενώ το παραπροϊόν γλυκερίνης καθαρίζεται και χρησιμοποιείται στην βιομηχανία φαρμάκων και καλλυντικών (Bargy, 1987).

Η βιοαιθανόλη πρώτης γενεάς παράγεται με τη μέθοδο της ενζυματικής υδρόλυσης. Για την παραγωγή βιοαιθανόλης μπορούν να χρησιμοποιηθούν αγροτικά προϊόντα που περιέχουν σάκχαρα όπως ζαχαρότευτλο, ζαχαροκάλαμο, γλυκό σόργο, μελάσα κ.α., καθώς και άμυλο όπως δημητριακά, καλαμπόκι, πατάτα κ.λπ.

Κατά την ενζυματική υδρόλυση η βιομάζα υφίσταται την διεργασία της υδρόλυσης, κατά την οποία τα μεγάλα μόρια αμύλου και σακχαρόζης διασπώνται σε μικρότερα μόρια σακχάρων (όπως φαίνεται στην παρακάτω αντίδραση), τα οποία μπορούν αργότερα να ζυμωθούν με την βοήθεια ζυμών και να μετατραπούν σε αιθανόλη.



Αξίζει να σημειωθεί ότι η φύση της βιομάζας που χρησιμοποιείται για την παραγωγή βιοαιθανόλης, είναι ο σημαντικότερος παράγοντας που επηρεάζει την απόδοση της διεργασίας. Γενικότερα, το κυτταρινικό και ημικυτταρινικό υλικό της βιομάζας μπορεί με τη χρήση κατάλληλων ενζύμων να μετατραπεί ως ένα μεγάλο ποσοστό σε βιοαιθανόλη (Lee, 1997).

1.4 Βιοκαύσιμα δεύτερης γενεάς

Πρόσφατες έρευνες δείχνουν να προσανατολίζονται στην παραγωγή βιοκαυσίμων δεύτερης γενεάς, τα οποία προέρχονται από λιγνοκυτταρινούχες πρώτες ύλες όπως το ξύλο, το άχυρο, τα αγροτικά και δασικά υπολείμματα, καθώς και τα αστικά οργανικά απόβλητα (Τριανταφυλλίδης, 2008).

Σε αντίθεση με τα βιοκαύσιμα της πρώτης γενεάς, αυτά της δεύτερης, χρησιμοποιούν μη βρώσιμα φυτικά υπολείμματα και συνεπώς δεν ανταγωνίζονται τις καλλιέργειες διατροφής. Για παράδειγμα, η αιθανόλη πρώτης γενεάς παράγεται από την ζύμωση σακχάρων φυτικής προέλευσης, χρησιμοποιώντας μια παρόμοια διαδικασία με αυτή της ζύμωσης της μύρας και του κρασιού (όπως περιγράφηκε συνοπτικά στο προηγούμενο κεφάλαιο). Αυτό απαιτεί την χρήση εδάδιμων καλλιεργειών, με αποτέλεσμα την υπερβολική κατανάλωσή τους για την παραγωγή βιοκαυσίμων. Κατά συνέπεια πολλές χώρες κινδυνεύουν να βιώσουν την έλλειψη των συγκεκριμένων τροφών, λόγω πιθανής αύξησης των τιμών τους.

Σύμφωνα με το Ινστιτούτο Τεχνικής Χημικών Διεργασιών (2006), τα βιοκαύσιμα δεύτερης γενιάς είναι τα βιοκαύσιμα που παράγονται με πρωτοποριακές διεργασίες και από περισσότερους τύπους βιομάζας (σε σύγκριση με τα βιοκαύσιμα πρώτης γενεάς). Στα βιοκαύσιμα δεύτερης γενιάς ανήκουν τα **συνθετικά βιοκαύσιμα** (Fischer-Tropsch βιοντίζελ, ντίζελ πυρόλυσης και αλκοόλη από αέριο σύνθεσης-syngas), που παράγονται από θερμοχημικές και καταλυτικές διεργασίες όπως Fischer-Tropsch, πυρόλυση και εξαερίωση αντίστοιχα. Επίσης, στην κατηγορία αυτή ανήκει και η βιοαιθανόλη που παράγεται από λιγνοκυτταρινικό υλικό το οποίο δύσκολα μπορεί να χρησιμοποιηθεί σήμερα. Το «βιοϋδρογόνο» ή υδρογόνο από αέριο σύνθεσης καθώς και το «βιοαέριο» ή συνθετικό φυσικό αέριο αποτελούν τα κύρια αέρια βιοκαύσιμα δεύτερης γενεάς.

Σε αυτό το σημείο αξίζει να αναφέρουμε ότι η μέθοδος Fischer-Tropsch είναι μια διεργασία μετατροπής βιομάζας σε υγρά καύσιμα (Biomass To Liquid ή BTL). Η βιομάζα έρχεται σε επαφή με αέρα και πυρολύεται. Το παραγόμενο αέριο περνάει στη συνέχεια στον αεριοποιητή και το παραγόμενο βιοαέριο σύνθεσης, αφού καθαριστεί και αποθειωθεί, διέρχεται μέσα από αντιδραστήρα Fischer-Tropsch. Εκεί το βιοαέριο σύνθεσης ($\text{CO} + \text{H}_2$) συνθέτει ένα μίγμα αλειφατικών υδρογονανθράκων που αποτελείται από ελαφρούς υδρογονάνθρακες (C_1 και C_4), νάφθα (C_5 και C_{11}) και ντίζελ (C_{12} και C_{20}). Η παραγόμενη νάφθα και ντίζελ αποτελούν βιοκαύσιμα που μπορούν να χρησιμοποιηθούν αναλόγως με τα αντίστοιχα ορυκτά καύσιμα (Boerrigter *et al.*, 2004).

Στόχος των βιοκαυσίμων δεύτερης γενεάς είναι να αυξηθεί το ποσοστό των βιοκαυσίμων που μπορεί να παραχθεί από μη εδώδιμα τμήματα καλλιεργειών, όπως μίσχους, φύλλα, φλούδες, γρασίδι καθώς και από βιομηχανικά απόβλητα όπως κορμοί δέντρων, δέρματα και πολτούς από την έκθλιψη των φρούτων (Inderwildi and King, 2009).

Η παραγωγή και εκμετάλλευση των βιοκαυσίμων δεύτερης γενιάς βρίσκεται ακόμη στο στάδιο της έρευνας και ορισμένων πιλοτικών προγραμμάτων. Πρωτοπόρες σε αυτό τον τομέα είναι η Σουηδία, ο Καναδάς, η Βραζιλία και οι Η.Π.Α, ενώ εκτεταμένα ερευνητικά προγράμματα πραγματοποιούν και οι μεγάλες πετρελαϊκές εταιρίες.

Η υπηρεσία ενέργειας των Η.Π.Α (DOE), υπολογίζει ότι μέχρι το 2012 θα μπορούν να παράγουν λιγνοκυτταρινική αιθανόλη με γενικό κόστος για τον καταναλωτή το 1.33 δολάρια και έχει ήδη επενδύσει σ' αυτό τον στόχο, διαθέτοντας πάνω από 1 δισεκατομμύριο δολάρια (Waltz, 2008).

1.4.1 Πυρόλυση της βιομάζας και «μέθοδος ταχείας πυρόλυσης»

Η πυρόλυση βιομάζας είναι μία διεργασία παραγωγής βιοκαυσίμων δεύτερης γενεάς. Αν και η αρχική πρόθεση για την πυρόλυση της βιομάζας ήταν η παραγωγή ενέργειας και καυσίμων, σήμερα η πυρόλυση αποτελεί δόκιμη μέθοδο και για την παραγωγή χημικών πρώτων υλών με πολλές εφαρμογές. Από την πυρόλυση της βιομάζας παράγεται το *βιοέλαιο* που χρησιμοποιείται ως πρωτογενές υλικό για την παραγωγή βιοκαυσίμων.

Οι κυριότερες μέθοδοι για την αποικοδόμηση της βιομάζας και την παραγωγή βιοελαίου είναι η ταχεία πυρόλυση, η πυρόλυση υπό κενό, η υγροποίηση υπό πίεση και η φαινόλιωση. Η επικρατέστερη όμως και η πιο διαδεδομένη μέθοδος σήμερα, είναι η «μέθοδος ταχείας πυρόλυσης». Η μέθοδος αυτή, πραγματοποιείται σε θερμοκρασίες 400-600 °C κάτω από αναερόβιες συνθήκες για χρονικό διάστημα λιγότερο από 5 λεπτά, σε αντιδραστήρα. Κάτω από αυτές τις συνθήκες αντίδρασης παράγονται ατμοί οργανικών ενώσεων, μη συμπυκνώσιμα αέρια και ρευστή πίσσα. Οι ατμοί των οργανικών ενώσεων στη συνέχεια συμπυκνώνονται, παράγοντας το έλαιο της πυρόλυσης ή βιοέλαιο. Το βιοέλαιο που προκύπτει περιέχει περίπου 30% νερό και 30% πυρολυτική λιγνίνη, ενώ το υπόλοιπο 40% είναι μια πληθώρα χημικών ενώσεων που στην πλειοψηφία τους είναι αλδεύδες, καρβοξυλικά οξέα και σάκχαρα (Bridgewater *et al.*, 2002). Το 40% των χημικών ενώσεων και το 30% του νερού, αποτελούν την υδατική φάση του βιοελαίου, η οποία αποτελεί άριστη πηγή τροφοδοσίας για την παραγωγή υδρογόνου και λοιπών βιοκαυσίμων κίνησης. Το υπόλοιπο 30% αποτελεί την οργανική φάση του ελαίου πυρόλυσης, που χρησιμοποιείται κυρίως στην παραγωγή βιοκαυσίμων θέρμανσης.

Το βιοέλαιο, πέραν της χρήσης του στην παραγωγή βιοκαυσίμων, χρησιμοποιείται επίσης και για την αντικατάσταση της φαινόλης σε πολυμερή φαινόλης-φορμαλδεύδης, που βρίσκουν εφαρμογή στη βιομηχανία συνθετικής ξυλείας. Η ελληνική εταιρία CHIMAR Hellas S.A, έχει αναπτύξει μια τεχνογνωσία για την παραγωγή ρητινών με επιτυχή αντικατάσταση της φαινόλης με βιοέλαιο σε ποσοστό μέχρι και 50% (Vergoroulou-Markessini and Tsianzi, 2003), ενώ η εταιρία ENSYN στον Καναδά εφαρμόζοντας μια τροποποιημένη μέθοδο της ταχείας πυρόλυσης (RTPMT), παράγει βιοέλαιο που μπορεί να αντικαταστήσει την φαινόλη σε ρητίνες φαινόλης – φορμαλδεύδης σε ποσοστό μέχρι και 60% (Giroux *et al.*, 2003).

Ως επιστέγασμα αυτών των προσπαθειών, έρχεται η εμφάνιση των πρώτων μονάδων πυρόλυσης της βιομάζας σε εμπορική, πλέον, κλίμακα. Στην Αλμπέρτα του Καναδά για παράδειγμα, βρίσκεται στην φάση του σχεδιασμού και της αδειοδότησης, η μεγαλύτερη μονάδα παραγωγής ενέργειας από την πυρόλυση βιομάζας. Η συγκεκριμένη μονάδα θα επεξεργάζεται 400 τόνους βιομάζας ημερησίως (κυρίως πριονίδι και συσσωματώματα ξύλου), ενώ αναμένεται ότι θα παράγει αρκετή

ποσότητα ηλεκτρικής ενέργειας ώστε να καλυφθούν πλήρως οι ετήσιες ανάγκες 3.800 κατοικιών (Biomass Energy, 2010).

1.4.2 Χαρακτηριστικά του ελαίου πυρόλυσης

Το έλαιο πυρόλυσης της βιομάζας είναι ένα μείγμα καρβοξυλικών οξέων (κυρίως οξικού και μυρμηγκικού), με ένα ποσοστό αλδεϋδων, αλκοολών και λιγνίνης (Wang *et al.*, 1997). Το χρώμα του είναι σκούρο (όπως της πίσσας) και η πυκνότητά του φτάνει περίπου τα 1.200 kg/m³, ενώ το ιξώδες του κυμαίνεται από 25 cSt ως και 1000 cSt και εξαρτάται από την περιεκτικότητά του σε νερό (15-35 wt %), καθώς και από την πρώτη ύλη που χρησιμοποιήθηκε. Το νερό που περιέχει στα συστατικά του έχει την ιδιότητα να μειώνει το ιξώδες του, με αποτέλεσμα την διευκόλυνση της μεταφοράς και της άντλησής του. Περιέχει επίσης λιγότερο άζωτο απ' ό,τι τα προϊόντα ντίζελ και σχεδόν καθόλου ορυκτά και θειικά συστατικά.

Το έλαιο της πυρόλυσης ερευνάται για την πιθανή χρήση του ως υποκατάστατο του πετρελαίου. Παρ' όλα αυτά, η σύστασή του είναι τελείως διαφορετική από την σύσταση του κοινού πετρελαίου. Η μέση στοιχειακή σύνθεση του βιοελαίου είναι η εξής:

- ◆ Άνθρακας: 51%
- ◆ Υδρογόνο: 8%
- ◆ Οξυγόνο: 40%
- ◆ Άζωτο: 0,9%
- ◆ Θείο: 0,01%
- ◆ Τέφρα: 0,09%

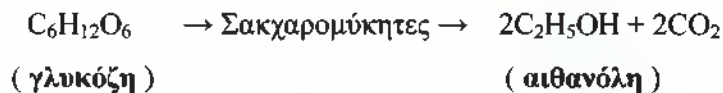
Μερικά ακόμη χαρακτηριστικά του ελαίου της πυρόλυσης, είναι το γεγονός ότι μειώνει την ρύπανση του περιβάλλοντος που προκαλείται από τις βιομηχανίες που παράγουν μεγάλα ποσά βιο-οργανικών καταλοίπων. Μια μεγάλη ποικιλία από διαφορετικούς τύπους βιομάζας μπορεί να μετατραπεί σε βιοέλαιο. Ωστόσο αυτό χαρακτηρίζεται από μικρή διαλυτότητα στο νερό, καλή σε οργανικούς διαλύτες και καθόλου καλή σε παράγωγα πετρελαίου (βενζίνη, ντίζελ). Επίσης, είναι χημικά ασταθές και μετατρέπεται σε αέριο σε υψηλές θερμοκρασίες, καθώς και σε υγρό, σε θερμοκρασία δωματίου. Τέλος, με την πάροδο του χρόνου αυξάνεται το ιξώδες του,

μειώνεται η πτητικότητα του και παρατηρούνται κατακρημνίσεις και συσσωματώματα.

Παρ' όλα αυτά, η εφαρμογή των υγρών βιοκαυσίμων όπως είναι το έλαιο της πυρόλυσης είναι ευκολότερη από αυτή των στερεών βιοκαυσίμων (BTG Biomass Technology group, 2001-2011).

1.4.3 Ζύμωση του ελαίου πυρόλυσης

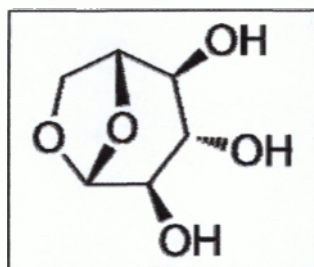
Η διαδικασία της ζύμωσης είναι μία βιολογική μέθοδος μετατροπής της βιομάζας σε αιθανόλη. Σχεδόν όλα τα φυτικά υλικά που περιέχονται στην βιομάζα περιέχουν απλά σάκχαρα ή πιο σύνθετες σακχαρικές ενώσεις. Οι ενώσεις αυτές μετατρέπονται σε αιθανόλη παρουσία ζυμών, οι οποίοι είναι απλοί μονοκύτταροι μύκητες και συγκεκριμένα ζύμες του γένους *Saccharomyces*. Η διαδικασία μετατροπής είναι αρκετά πολύπλοκη αλλά μπορεί να εκφραστεί περιληπτικά με την αντίδραση:



Η ζύμωση εξαρτάται από πολλούς παράγοντες, οι σημαντικότεροι των οποίων είναι το pH του υλικού και η θερμοκρασία. Το άριστο pH για την δραστηριότητα των μικροοργανισμών είναι μεταξύ 3 και 5, ενώ η ιδανική θερμοκρασία κυμαίνεται μεταξύ 27-35 °C (Ντογκούλης, 2008).

Η ζύμωση του ελαίου της πυρόλυσης βασίζεται στο γεγονός ότι κάτω από συνθήκες ταχείας πυρόλυσης που εφαρμόζονται για την παραγωγή του βιοελαίου, η καθαρή κυτταρίνη της βιομάζας παράγει λεβογλουκοζάνη (1,6-ανυδρο-β-D-γλυκοπυρανόζη), ένα ανυδροσάκχαρο με εμπειρικό χημικό τύπο ίδιο με αυτό της μονομερούς κυτταρίνης ($\text{C}_6\text{H}_{10}\text{O}_5$) (Evans and Milne, 1987).

Η λεβογλουκοζάνη είναι μια χημική ένωση 6 υδρογονανθράκων (Εικόνα 1), η οποία περιέχεται στο έλαιο της πυρόλυσης και σχηματίζεται από την πυρόλυση υδατανθράκων, όπως είναι το άμυλο και η κυτταρίνη (Lakshmanan *et al.*, 1970). Ως αποτέλεσμα, η λεβογλουκοζάνη συχνά χρησιμοποιείται στην χημική καύση της βιομάζας και μαζί με άλλα ιχνοστοιχεία όπως το κάλιο, το οξαλικό οξύ και το αέριο ακετονιτρίλιο, έχει αποδείξει ότι είναι αρκετά εύφλεκτη.



Εικόνα 1. Σχηματική απεικόνιση της σύστασης της λεβογλουκοζάνης. Πηγή: [[http://en.wikipedia.org/wiki/File: Levoglucozan.png](http://en.wikipedia.org/wiki/File:Levoglucozan.png)].

Η λεβογλουκοζάνη, δεν μπορεί να χρησιμοποιηθεί εύκολα ως πηγή άνθρακα από τους μικροοργανισμούς ζύμωσης, μπορεί ωστόσο να υδρολυθεί σε γλυκόζη. Η γλυκόζη που παράγεται μέσω της υδρόλυσης της λεβογλουκοζάνης μπορεί να χρησιμοποιηθεί από τους μικροοργανισμούς για τη ζύμωση του ελαίου και την παραγωγή αιθανόλης (Brown, 2007).

Το πρώτο στάδιο στη διεργασία της ζύμωσης του ελαίου πυρόλυσης συνίσταται στην υδρόλυση της λεβογλουκοζάνης με χρήση θεικού οξέος ή ενζύμων, για να παραχθούν γλυκόζη και ξυλόζη. Τα σάκχαρα αυτά ζυμώνονται από τους μικροοργανισμούς για να παραχθεί αιθανόλη. Ως υπόλειμμα της υδρόλυσης σε ποσοστό 20-30% παραμένει η λιγνίνη, από την οποία μπορεί να παραχθεί ενέργεια με άμεση καύση ή πυρόλυση. Στην Ελλάδα που υπάρχουν μεγάλες ποσότητες λιγνίτη, μπορεί να παραχθεί μεθανόλη με χαμηλό κόστος, η οποία μπορεί επίσης να αποτελέσει καύσιμο αυτοκινήτων (Καλαμπογιά, 2005).

Πέραν όμως της χημική υδρόλυσης της λεβογλουκοζάνης σε γλυκόζη, πολλά γένη βακτηρίων, ζυμών και μυκήτων (Kitamura *et al.*, 1990; Prosen *et al.*, 1993) μπορούν να υδρολύσουν τη λεβογλουκοζάνη και κατά συνέπεια να τη χρησιμοποιήσουν ως πηγή άνθρακα και ενέργειας για την ανάπτυξή τους. Μερικά είδη ζυμών όπως ο *Schwanniomyces castelli*, *Streptomyces diastaticus* και *Candida utilis* (Prosen *et al.*, 1993) παράγουν αιθανόλη χρησιμοποιώντας λεβογλουκοζάνη ως πηγή άνθρακα, αλλά οι αποδόσεις τους είναι πολύ χαμηλές, περίπου στο 10%. Ένα άλλο είδος μύκητα με την ονομασία *Aspergillus niger* CBX-2, μπορεί να παράγει πολύ μικρό ποσοστό κιτρικού οξέος (με βαθμό απόδοσης < 10%) σε υπόστρωμα υλικού που περιέχει λεβογλουκοζάνη (Zhuang *et al.*, 2000).

Σε αυτή την πτυχιακή εργασία, εκτός από την ζύμωση του ελαίου πυρόλυσης από μικροοργανισμούς για την παραγωγή βιοαιθανόλης, θα εξεταστεί επίσης και η ζύμωση του ελαίου πυρόλυσης για παραγωγή βιοντίζελ. Η διαδικασία ζύμωσης του ελαίου πυρόλυσης για παραγωγή βιοντίζελ ακολουθεί περίπου το ίδιο πρωτόκολλο με αυτό της ζύμωσης του ελαίου για την παραγωγή αιθανόλης.

1.5 Οι μικροοργανισμοί που χρησιμοποιήθηκαν στην παρούσα εργασία

Στην παρούσα πειραματική εργασία μελετήθηκε η ζύμωση του ελαίου της πυρόλυσης βιομάζας για παραγωγή βιοαιθανόλης και βιοντίζελ από συγκεκριμένους μικροοργανισμούς. Οι μικροοργανισμοί που χρησιμοποιήθηκαν ήταν οι ζύμες *Saccharomyces cerevisiae* και *Cryptococcus curvatus*.

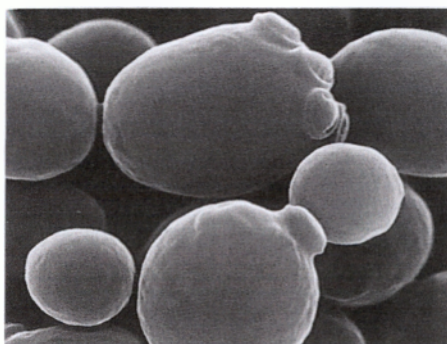
Ως υπόστρωμα, χρησιμοποιήθηκε έλαιο πυρόλυσης του οποίου η περιεχόμενη λεβογλουκοζάνη είχε υποστεί υδρόλυση σε γλυκόζη. Επίσης, μελετήθηκε η ικανότητα του βακτηρίου *Escherichia coli* να χρησιμοποιήσει την λεβογλουκοζάνη του ελαίου πυρόλυσης ως πηγή άνθρακα, όταν στο γενετικό υλικό αυτού του βακτηρίου είχε εισαχθεί (με κλωνοποίηση), το γονίδιο που κωδικοποιεί το ένζυμο levoglucosan kinase (LGK) το οποίο είχε απομονωθεί από τον μύκητα *Aspergillus niger*. Το γονίδιο LGK μεταφέρθηκε από τον μύκητα *A. niger* στο βακτήριο *E. coli* και στη συνέχεια το κλωνοποιημένο βακτήριο αναπτύχθηκε σε υπόστρωμα LB, παρουσία λεβογλουκοζάνης.

Γενικά, ως ζύμες ορίζονται εκείνοι οι βασιδιομύκητες ή ασκομύκητες οι οποίοι έχουν μονοκύτταρη βλαστική φάση, πολλαπλασιάζονται με εκβλάστηση ή διχοτόμηση και δεν σχηματίζουν πάντα σπόρια. Ευρέως εξαπλωμένες στο φυσικό περιβάλλον ποικίλουν σε μέγεθος, σχήμα και χρώμα αναλόγως του γένους ή του είδους. Μπορούν να παρατηρηθούν μόνο με μικροσκόπιο λόγω των μικρών τους διαστάσεων. Το μήκος των κυττάρων τους διαφέρει και μπορεί να είναι μόνο 2 έως 3 μm σε μερικά είδη. Το πλάτος τους κυμαίνεται από 1 έως 10 μm. Το κυτταρικό σχήμα είναι στενά συνδεδεμένο με την λειτουργία του κυττάρου και έχει την δυνατότητα να μεταβάλλεται από την επίδραση εξωτερικών συνθηκών, όπως της επιφανειακής τάσης και της σύστασης του θρεπτικού τους μέσου. Τα κύτταρα της ζύμης μπορεί να είναι ελλειψοειδή ή ωοειδή (*Saccharomyces* spp.), κυλινδρικά με ημισφαιρικά άκρα (*Schizosaccharomyces* spp.), φιαλόμορφα (*Pityrosporum* spp.),

νηματοειδή (με ψευδοϋφές και υφές με διαφράγματα π.χ *Candida albicans*), τριγωνικά (*Trigonopsis* spp.), καμπυλωτά (*Cryptococcus cereanus*), σφαιρικά ή επιμηκυμένα (Walker, 1998).

Έχουν καταγραφεί περίπου 500 είδη ζυμών τα οποία κατατάσσονται σε 69 γένη. Τα κύτταρα των ζυμών συγκροτούνται κυρίως από μακρομόρια που συνδυάζονται μεταξύ τους, σχηματίζοντας τα δομικά χαρακτηριστικά του κυττάρου. Τα μακρομόρια αυτά είναι κυρίως πρωτεΐνες, πολυσακχαρίτες, λιπίδια και νουκλεϊκά οξέα, οι συγκεντρώσεις των οποίων ποικίλουν σύμφωνα με τις συνθήκες ανάπτυξης και το είδος τους (Παπανικολάου, 2006).

Η ζύμη *Saccharomyces cerevisiae*, είναι ένα είδος ζύμης που από αρχαιοτάτων χρόνων έχει αποδειχτεί χρήσιμη στην αρτοποιεία και την ζυθοποιεία και πιστεύεται ότι αρχικά απομονώθηκε από τη φλούδα του σταφυλιού (Εικόνα 2).



Εικόνα 2. Φωτογραφία από ηλεκτρονικό μικροσκόπιο των κυττάρων του *S. cerevisiae*. Πηγή: [<http://www.bath.ac.uk.bio-sci/wheals2.htm>].

Ο *S. cerevisiae* είναι ένας μονοκύτταρος και μονοπύρηνος οργανισμός με ελλειψοειδές κυτταρικό σχήμα και αναλόγως του στελέχους του, το σχήμα μπορεί να ποικίλει σε σφαιρικό, ωοειδές και κυλινδρικό. Το μήκος του κυττάρου διαφοροποιείται από 5 έως 10 μm και το πλάτος του από 1 έως 3 και 1 έως 7 μm . Τα κύτταρα του αποτελούνται από τον κυτταρικό φάκελο, το κυτταρόπλασμα, τον πυρήνα, τα μιτοχόνδρια, το ενδοπλασματικό δίκτυο και διάφορα άλλα οργανίδια (Walker, 1998; Παπανικολάου, 2006). Η ονομασία "*Saccharomyces*", έχει λατινογενή και ελληνογενή ρίζα και σημαίνει «μούχλα της ζάχαρης», ενώ το "*cerevisiae*" προέρχεται από την Λατινική γλώσσα και σημαίνει «μπύρα». Ο *S. cerevisiae*

συμπεριλήφθηκε στο συγκεκριμένο πείραμα λόγω της δυνατότητάς του να παράγει αιθανόλη, κάτω από κατάλληλες διαδικασίες ζύμωσης.

Το άλλο είδος ζύμης που χρησιμοποιήθηκε στην παρούσα μελέτη είναι το *Cryptococcus curvatus*, το οποίο ανήκει στην κατηγορία των ελαιωδών ζυμών (Εικόνα 3).



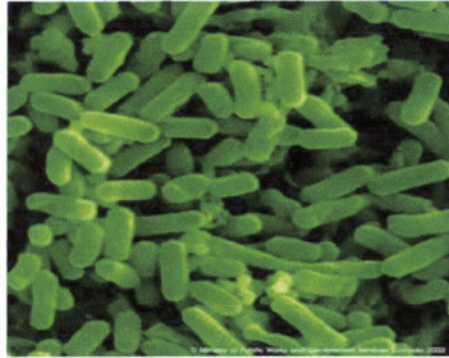
Εικόνα 3. Μικροσκοπική απεικόνιση των κυττάρων του *C. curvatus*. Πηγή: [<http://www.nyc.co.uk/photo-nyc-CBS570A.html>].

Η ζύμη *C. curvatus* αρχικά απομονώθηκε από το πάτωμα ενός τυροκομείου, όπου εκεί της δόθηκε η ονομασία *Candida curvata* (Moon *et al.*, 1978). Τα επόμενα χρόνια ονομάστηκε *Aprotrichum curvatum* (Ykema, 1989), ενώ τα τελευταία χρόνια της έχει δοθεί επίσημα το όνομα *Cryptococcus curvatus*. Τα κύτταρά της είναι μακρόστενα και έχει την ιδιότητα να συσσωρεύει σε αυτά τριγλυκερόλη, σε ποσοστό πάνω από 60% του ξηρού της βάρους.

Αυτή η ελαιώδης ζύμη χρησιμοποιεί τα σάκχαρα της κυτταρίνης και της ημικυτταρίνης για την ανάπτυξη και την παραγωγή τριγλυκεριδίων (Davies, 1988), ενώ έχουν γίνει μελέτες για την δυνατότητα της χρήσης του στην παραγωγή του βούτυρο κακάο (Ykema *et al.*, 1990). Ο *C. curvatus* χρησιμοποιήθηκε στο προκείμενο πείραμα, λόγω της δυνατότητας του να παράγει λιπαρά οξέα, όπου με την διαδικασία της ζύμωσης του ελαίου πυρόλυσης μπορεί να παραχθεί βιοπετρέλαιο.

Το βακτήριο *Escherichia coli* (Εικόνα 4), ανήκει στην οικογένεια των Enterobacteriaceae και βρίσκεται φυσιολογικά στο εντερικό σύστημα όλων των

ζώων, συμπεριλαμβανομένων των ανθρώπων. Τα περισσότερα στελέχη του *E. coli* είναι αβλαβή και αποτελούν μέρος της φυσικής χλωρίδας του εντέρου, καθώς ωφελούν τους ξενιστές τους παράγοντας βιταμίνη K2 και εμποδίζοντας την εγκατάσταση άλλων παθογόνων βακτηρίων μέσα στο έντερο. Μια μειοψηφία στελεχών *E. coli* είναι σε θέση να προκαλέσουν ασθένεια στον άνθρωπο, μεταξύ αυτών είναι τα εντεροπαθογόνα στελέχη (EPEC) (Wageningen University, 1999).



Εικόνα 4. Μικροσκοπική απεικόνιση του βακτηρίου *E. coli*.

Πηγή: [<http://www.worldpigeon.org>].

Στην παρούσα μελέτη, το *E. coli* επιλέχθηκε λόγω της δυνατότητάς του να τροποποιείται γενετικά, δεδομένου ότι το DNA του είναι πολύ μικρότερο και απλούστερα οργανωμένο από το DNA των ευκαρυωτικών κυττάρων. Για τον λόγο αυτό, ο μηχανισμός της αντιγραφής έχει μελετηθεί πολύ περισσότερο στα προκαρυωτικά κύτταρα και κυρίως στο βακτήριο *Escherichia coli*.

2. ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ

Η μελέτη αυτή πραγματοποιήθηκε στα υπεσύγχρονα και πλήρως εξοπλισμένα εργαστήρια του Ερευνητικού Κέντρου (Agrotechnology and Food science Research Center, Biobased Products) του Πανεπιστημίου Wageningen της Ολλανδίας. Μελετήθηκαν εργαστηριακές ζυμώσεις αποστειρωμένου ελαίου πυρόλυσης από ζύμες, με στόχο την παραγωγή βιοκαυσίμων (βιοαιθανόλης και βιοντίζελ). Επίσης, μελετήθηκε η ικανότητα του βακτηρίου *Escherichia coli* να χρησιμοποιήσει την λεβογλουκοζάνη του ελαίου πυρόλυσης ως πηγή άνθρακα, όταν στο γενετικό υλικό αυτού του βακτηρίου είχε εισαχθεί (με την διαδικασία της κλωνοποίησης) το γονίδιο που κωδικοποιεί το ένζυμο levoglucosan kinase (LGK), το οποίο είχε απομονωθεί από τον μύκητα *Aspergillus niger*.

2.1 Μικροοργανισμοί που χρησιμοποιήθηκαν στις πειραματικές ζυμώσεις

Οι μικροοργανισμοί που επιλέχθηκαν για την πραγματοποίηση των πειραμάτων ήταν οι ζύμες: *Saccharomyces cerevisiae* και *Cryptococcus curvatus*.

Ο *S. cerevisiae* χρησιμοποιήθηκε λόγω της δυνατότητάς του να παράγει βιοαιθανόλη κάτω από κατάλληλες συνθήκες ζύμωσης, ενώ ο *C. curvatus* συμπεριλήφθηκε στα πειράματα λόγω της ικανότητάς του να παράγει λιπαρά οξέα από τη ζύμωση του ελαίου πυρόλυσης τα οποία μετατρέπονται σε βιοντίζελ.

Σε ορισμένα πειράματα χρησιμοποιήθηκε και ένας άλλος μικροοργανισμός που αναφέρεται ως «Νέα ζύμη». Η ζύμη αυτή είχε χρησιμοποιηθεί σε προηγούμενα πειράματα και είχε διαπιστωθεί ότι μπορεί να αναπτυχθεί εύκολα σε έλαιο πυρόλυσης.

Τέλος, χρησιμοποιήθηκε επίσης το βακτήριο *Escherichia coli* στο οποίο κλωνοποιήθηκε το γονίδιο LGK. Στην προκείμενη μελέτη, το εν λόγω βακτήριο επιλέχθηκε λόγω της δυνατότητάς του να τροποποιείται γενετικά, δεδομένου ότι το DNA του είναι σχετικά μικρό και πολύ απλά δομημένο.

2.2 Θρεπτικά υλικά

Τα θρεπτικά υλικά που χρησιμοποιήθηκαν ήταν τα εξής:

♦ LB θρεπτικό υλικό (5 g/L εκχύλισμα ζύμης, 10 g/L Τρυπτοφάνη, 5 g/L NaCl): για την ανάπτυξη του βακτηρίου *E. coli*.

♦ YEM (0.02 g εκχύλισμα ζύμης, 6.4 g/L Ουρία, 2 g/L KH_2PO_4 , 1 g/L MgSO_4 , 0.02 g γλυκόζη): για την ανάπτυξη των ζυμών *S. cerevisiae* και *C. curvatus*.

♦ YPD (0.01 g εκχύλισμα ζύμης, 0.02 g Πεπτόνη, 0.02 g Δεξτρόζη): για την ανάπτυξη κυρίως των προκαλλιεργειών των ζυμών *S. cerevisiae* και *C. curvatus*.

Στα θρεπτικά υλικά YEM και YPD η γλυκόζη αντικαθιστάται από έλαιο πυρόλυσης, όταν αυτό είναι απαραίτητο.

♦ Mineral medium ή θρεπτικό υλικό με ορυκτά στοιχεία (9.56 g/L Na_2HPO_4 , 1 g/L $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$). Ιχνοστοιχεία: 0.02 g/L FeCl_3 , 0.01 g/L CaCl_2 , 0.03 g/L CuSO_4 , 0.05 g/L MnCl_2 , 0.1 g/L ZnSO_4 . Τα ιχνοστοιχεία διαλύονται σε αποσταγμένο νερό. Το θρεπτικό υλικό στην συνέχεια αποστειρώνεται στο αυτόκαυστο (αυτό ισχύει για όλα τα θρεπτικά υλικά), προτού χρησιμοποιηθεί ως υπόστρωμα για την ανάπτυξη των ζυμών.

♦ M9 medium ή M9 θρεπτικό υλικό (6 g Na_2HPO_4 , 3 g KH_2PO_4 , 0.5 g NaCl, 1 L H_2O): για την ανάπτυξη του βακτηρίου *E. coli*.

Για την καλλιέργεια στα τρυβλία προστίθεται άγαρ 1.5% w/v.

Στα θρεπτικά υλικά που χρησιμοποιήθηκαν προστέθηκε έλαιο πυρόλυσης σε διαφορετικές ποσότητες κάθε φορά και από διαφορετικές κατηγορίες οι οποίες περιγράφονται παρακάτω.

Δεδομένου ότι η λεβογλουκοζάνη είναι προϊόν που παράγεται από την διάσπαση της κυτταρίνης και είναι το βασικότερο συστατικό που περιέχεται στο έλαιο της πυρόλυσης, εξετάστηκε εκτενώς ως πηγή άνθρακα.

2.3 Έλαιο της πυρόλυσης (βιοέλαιο)

Το έλαιο της πυρόλυσης που χρησιμοποιήθηκε, παράχθηκε από τον Ολλανδικό όμιλο BTG που στεγάζεται στην πόλη Enschede της Ολλανδίας. Η εταιρεία αυτή χρησιμοποιεί τη μέθοδο της «ταχείας πυρόλυσης» έτσι ώστε να παράγει βιοέλαιο από

συσσωματώματα ξύλου. Στην παρούσα εργασία χρησιμοποιήθηκαν οι ακόλουθοι τύποι βιοελαίου:

Έλαιο πυρόλυσης κατηγορίας 1C: υδατική φάση ελαίου πυρόλυσης (που περιέχει σάκχαρα, οργανικά οξέα και φαινολικά συστατικά) που έχει ουδετεροποιηθεί και περιέχει 22.3 g/L λεβογλουκοζάνη.

Έλαιο πυρόλυσης κατηγορίας 2B: κατηγορία υδρολυμένου (με τη δράση οξέος) βιοελαίου το οποίο έχει ουδετεροποιηθεί και περιέχει 24 g/L γλυκόζη. Συγκεκριμένα το βιοέλαιο υδρολύεται με την προσθήκη συμπυκνωμένου σουλφουρικού οξέος 2% και με θέρμανση στους 121 °C για περίπου 20 λεπτά. Όταν μειωθεί η θερμοκρασία του, διορθώνεται το pH μέχρι η τιμή του να φτάσει περίπου στο 7 και στην συνέχεια, το υδρολυμένο βιοέλαιο διαχωρίζεται από τα υπόλοιπα προϊόντα καθίζησης με τη μέθοδο της φυγοκέντρωσης. Αφού τελειώσει η διαδικασία της φυγοκέντρωσης, το βιοέλαιο αποθηκεύεται στους 4 °C.

2.4 Καλλιέργεια των ζυμών

Όλα τα πειράματα μικροβιακής ανάπτυξης των ζυμών ξεκίνησαν με προκαλλιέργεια ολονύκτιας διάρκειας. Οι προκαλλιέργειες προέρχονται από ένα κατεψυγμένο απόθεμα του μικροοργανισμού ή από ένα δείγμα μιας προηγούμενης καλλιέργειας που αναπτύχθηκε σε τρυβλίο Petri, οι οποίες στην συνέχεια επωάζονται σε θρεπτικό υλικό YPD. Οι καλλιέργειες των ζυμών επωάστηκαν σε κωνικές φιάλες των 100 ml που περιείχαν 10 ml θρεπτικό υλικό, το οποίο εμβολιάστηκε με 0.2 ml από την ολονύκτιας διάρκειας προκαλλιέργεια των επιλεγμένων ζυμών. Οι κωνικές φιάλες με τις ζύμες τοποθετήθηκαν για 24 ώρες σε ένα ειδικό μηχάνημα ανάδευσης (rotary shaker), ρυθμισμένο στους 30 °C και σε 250 rpm (στροφές ανά λεπτό), έτσι ώστε να επιτευχθεί σωστή επώαση. Λεπτομέρειες για τα θρεπτικά υλικά που χρησιμοποιήθηκαν καθώς και για τις καλλιέργειες των ζυμών, καταγράφονται στο κεφάλαιο των Αποτελεσμάτων.

2.5 Μέθοδοι εκτίμησης του πληθυσμού των ζυμών

Η ανάπτυξη των μικροοργανισμών *S. cerevisiae* και *C. curvatus* εξετάστηκε με τη βοήθεια ειδικών μετρήσεων σε κατάλληλα χρονικά διαστήματα. Η μέτρηση της Οπτικής Πυκνότητας (OD₆₀₀ measurement) υποδεικνύει τον αριθμό των κυττάρων της ζύμης που βρίσκονται στην καλλιέργεια.

Εναλλακτικά, δείγματα των καλλιεργειών τοποθετήθηκαν, μετά από αραιώση, σε τρυβλία Petri που περιείχαν YPD άγαρ και στην συνέχεια καταμετρήθηκε ο αριθμός των αποικιών τους (cfu). Η αραιώση έγινε ως εξής: σε 100 ml δείγματος προστέθηκαν 5 ml αποστειρωμένου θρεπτικού υλικού YPD και στην συνέχεια ελήφθησαν 100 μl αραιωμένου δείγματος, όπου απλώθηκαν μέσα σε τρυβλίο Petri. Η επώαση διήρκησε 24 με 48 ώρες και στην συνέχεια ακολούθησε καταμέτρηση των αποικιών.

2.6 Ανάλυση μέσω HPLC

Στα σχετικά πειράματα χρησιμοποιήσαμε την μέθοδο HPLC (Υγρή Χρωματογραφία Υψηλής Απόδοσης), για να αναλύσουμε την ποσότητα της αιθανόλης και της γλυκόζης που περιέχονται στα δείγματα.

Η μέθοδος HPLC είναι μία μορφή χρωματογραφίας με στήλες που χρησιμοποιείται για να διαχωρίσει - ταυτοποιήσει ανά ποσότητα διάφορα συστατικά μειγμάτων (κυρίως σάκχαρα και αλκοόλες), βασισμένη σε συγκεκριμένα χαρακτηριστικά και αλληλεπιδράσεις τους. Η χρωματογραφία υψηλής απόδοσης ανήκει στις χρωματογραφικές τεχνικές και ο διαχωρισμός είναι αποτέλεσμα της συνδυαστικής δράσης μιας στατικής και μιας κινητής φάσης. Στην HPLC το δείγμα εισάγεται στην κορυφή της στήλης και με την βοήθεια της κινητής φάσης, τα συστατικά του μετακινούνται με τη μορφή ζωνών και τελικά εκλύονται το ένα μετά το άλλο, ανάλογα με τις αλληλεπιδράσεις τους με το υλικό της στήλης με την στατική φάση.

Η στατική φάση είναι πολικής φύσεως και αποτελείται από (κατάλληλα για τον διαχωρισμό των μειγμάτων) σωματίδια όπως οξείδιο του πυριτίου ή αλουμίνα. Η κινητή φάση είναι ένας διαλύτης ή ένα αέριο, που "ξεπλένει" τα συστατικά των προς ανάλυση δειγμάτων περνώντας δια μέσω της στήλης με τα σωματίδια της στατικής φάσης. Σε αυτό το σημείο, όσες ουσίες είναι διαλυτές στην κινητή φάση και προσροφώνται λιγότερο από την ακίνητη φάση εκλύονται πρώτες, ενώ αυτές που προσροφώνται περισσότερο κινούνται πιο αργά. Το αποτέλεσμα είναι ο διαχωρισμός τους.

Στην συνέχεια τα συστατικά των μειγμάτων παραπέμπονται στον αναλυτή (δια μέσω μιας αντλίας), ο οποίος τα αναλύει με βάση την σύστασή τους και αργότερα

διέρχονται στον ανιχνευτή, ο οποίος μετρά τον δείκτη διάθλασης των συστατικών με την βοήθεια ακτινών UV για να μπορέσει να γίνει σωστά η ταυτοποίηση των συστατικών των μειγμάτων ανά ποσότητα. Τέλος, καταλήγουν στον καταγραφέα ο οποίος συνήθως μέσω ηλεκτρονικού υπολογιστή και εκτυπωτή, απεικονίζει τα αποτελέσματα της μεθόδου σε χαρτί.

2.7 Η «έκφραση» του γονιδίου LGK

Η διαδικασία «έκφρασης» του γονιδίου LGK, δηλαδή η κατευθυνόμενη σύνθεση ενός ξένου γονιδίου, ακολουθεί μια συγκεκριμένη ροή: το DNA μεταγράφεται σε mRNA και αυτό με την σειρά του μεταφράζεται σε πρωτεΐνη, μέσω μιας σειράς αμινοξέων.

Το γονίδιο LGK απομονώθηκε από τον μύκητα *Aspergillus niger* μέσω της χρήσης της PCR (Αλυσιδωτή Αντίδραση Πολυμεράσης, δηλαδή παραγωγή πολυάριθμων αντιγράφων ενός γονιδίου) και κλωνοποιήθηκε σε «φορέα κλωνοποίησης ή φορέα έκφρασης», από προηγούμενη ομάδα ερευνητών. Ο φορέας κλωνοποίησης είναι ένα γενετικό στοιχείο (πλασμίδιο), το οποίο χρησιμοποιείται για να δέχεται και να μεταφέρει ένα κομμάτι DNA σε ένα κύτταρο αποδέκτη (ξενιστή), με σκοπό την κλωνοποίησή του. Τα πλασμίδια είναι κυκλικά δίκλιωνα μόρια DNA που ποικίλουν σε μέγεθος (από 1 kb έως 200 kb) και μπορούν να αντιγράφονται ανεξάρτητα από τα βακτηριακά χρωματοσώματα, αν και χρησιμοποιούν ένζυμα και πρωτεΐνες από τον ξενιστή τους. Αυτό αποτελεί και βασικό χαρακτηριστικό τους που τα καθιστά χρήσιμα στην γενετική μηχανική.

Στην συγκεκριμένη μελέτη το γονίδιο LGK υποκλωνοποιήθηκε σε έναν φορέα έκφρασης pBAD-TOPO (πλασμίδιο), αφού ο φορέας είχε μεταφερθεί στο *E. coli*. Σε αυτό το σημείο αξίζει να αναφέρουμε ότι η υποκλωνοποίηση είναι η διαδικασία μεταφοράς τμήματος μιας κλωνοποιημένης DNA αλληλουχίας, από ένα φορέα σε έναν άλλο.

Το LGK προήλθε από προγενέστερο πλασμίδιο και χρησιμοποιήθηκε ως μήτρα σε αντίδραση PCR, μέσω της χρήσης συγκεκριμένων εκκινητών: LGK-E-FW1 (CACCATGGATCCTAATCCTTCCGTG) και LGK-E-RV1 (CCATTTGTTGTTGAACTCCTTCC). Τα προϊόντα της PCR κλωνοποιήθηκαν στον φορέα έκφρασης pBAD-TOPO και ακολούθησε μετασχηματισμός κυττάρων *E. coli*, το οποίο

αναπτύχθηκε σε LB θρεπτικό υπόστρωμα που περιείχε το αντιβιοτικό αμπικιλίνη. Στην συνέχεια 150 μl δείγματος *E. coli* απλώθηκαν μέσα σε τρυβλία Petri, με LB θρεπτικό υλικό που περιείχε λεβουλοκοζάνη και επώαστηκαν σε θερμοκρασία 37 °C. Το μετασχηματισμένο *E. coli* επώαστηκε σε τρυβλία με λεβουλοκοζάνη ως μοναδική πηγή άνθρακα, έτσι ώστε να αποδειχτεί η ικανότητα του να την μεταβολίζει.

3. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

3.1 Ανάλυση της ανάπτυξης των ζυμών *Saccharomyces cerevisiae* και «Νέα ζύμη» σε YEM θρεπτικό υλικό με έλαιο πυρόλυσης.

Για να αναλύσουμε την ανάπτυξη της ζύμης *S. cerevisiae* και της «Νέας ζύμης» σε έλαιο πυρόλυσης, χρειάστηκε 1 ml από τις προκαλλιέργειες (που είχαν επωαστεί σε κωνικές φιάλες με YPD), για να ξεκινήσουν καλλιέργειες των 10 ml σε κωνικές φιάλες (100 ml) που περιέχουν θρεπτικό υλικό YEM με γλυκόζη και έλαιο πυρόλυσης, αφού πρώτα αποστειρώθηκαν σε αυτόκαυστο (Πίνακας 2). Στην συνέχεια, τοποθετήθηκαν σε ειδικό μηχάνημα ανάδευσης και επώαστηκαν στους 30 °C και σε 250 rpm (στροφές ανά λεπτό).

Λόγω ότι ο *S. cerevisiae* δεν μπορεί να χρησιμοποιήσει την λεβογλουκοζάνη ως πηγή άνθρακα, το YEM θρεπτικό υλικό περιέχει στην σύστασή του ζυμώσιμα σάκχαρα.

Πίνακας 2. Θρεπτικά υλικά που χρησιμοποιήθηκαν για την ανάπτυξη των ζυμών.

Αρ.	Θρεπτικά υλικά
1	10 ml YEM + 2 g/L γλυκόζη
2	10 ml YEM + 4 g/L γλυκόζη
3	10 ml YEM + 10% έλαιο πυρόλυσης 1C* (2.5 ml)
4	10 ml YEM + 20% έλαιο πυρόλυσης 1C (5 ml)
5	10 ml YEM + 10% έλαιο πυρόλυσης 2B** (2.5ml)
6	10 ml YEM + 20% έλαιο πυρόλυσης 2B (5 ml)

*Έλαιο πυρόλυσης κατηγορίας 1C: κατηγορία ελαίου με ουδετεροποιημένο νερό που περιέχει 22.3 g/L λεβογλουκοζάνη.

**Έλαιο πυρόλυσης κατηγορίας 2B: κατηγορία υδρολυμένου βιοελαίου με ουδετεροποιημένο οξύ που περιέχει 24 g/L γλυκόζη.

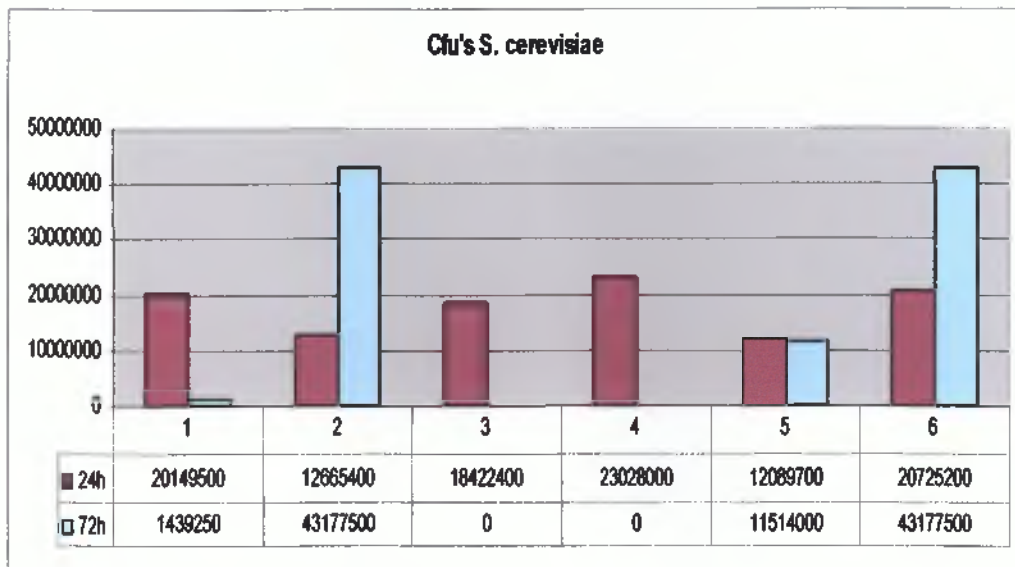
Αφού επώστηκαν οι καλλιέργειες, ακολούθησε καταμέτρηση του αριθμού των κυττάρων των ζυμών σε μηχανήμα μέτρησης οπτικής πυκνότητας (OD₆₀₀ measurement). Για να ξεκινήσει η διαδικασία, 0.2 ml δείγματος αραιώθηκαν σε 0.8 ml νερού για να παρθούν 50 μl τελικού δείγματος και να τοποθετηθούν στις κυβέτες, οι οποίες τοποθετούνται στο εν λόγω μηχανήμα.

Τα αποτελέσματα της μέτρησης έδειξαν ότι οι αριθμοί των κυττάρων του *S. cerevisiae* και της «Νέας Ζύμης» υπερερούσαν (σε μεγάλο βαθμό) στις καλλιέργειες που περιείχαν έλαιο πυρόλυσης, από αυτές που περιείχαν μόνο γλυκόζη.

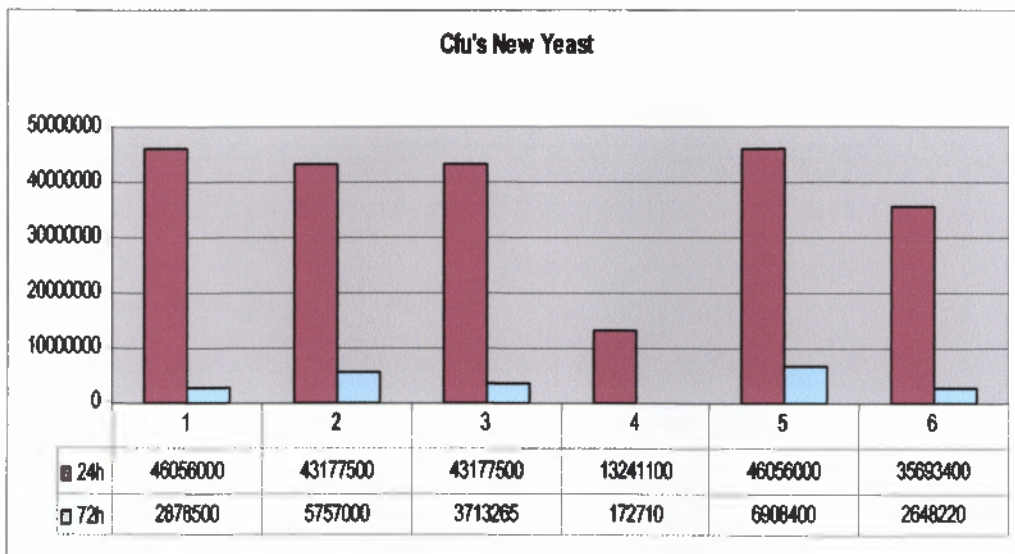
Από τις κυβέτες ελήφθησαν τα 50 μl των δειγμάτων, αραιώθηκαν σε 5 ml νερό και στην συνέχεια 100 μl αραιωμένου δείγματος απλώθηκαν σε τρυβλία Petri για να γίνει η επώαση των καλλιεργειών. Η επώαση έγινε σε κλίβανο επώασης στους 30 °C. Η ανάπτυξη εξετάστηκε μετά από 24 και 72 ώρες με καταμέτρηση των αποικιών (cfu). Η ποσότητα των αποικιών του *S. cerevisiae* καθορίστηκε στην μηδενική ώρα (t=0), δηλαδή στην ώρα έναρξης της διαδικασίας όπου αποτελούνταν από 160.000 αποικίες.

Όπως παρατηρείται στα **Σχεδιαγράμματα 1 και 2**, όλα τα θρεπτικά υποστρώματα που χρησιμοποιήθηκαν (1-6) επιτρέπουν την ανάπτυξη των ζυμών για 24 ώρες. Ωστόσο, μετά από 24 ώρες η ανάπτυξη σε ορισμένα θρεπτικά υλικά σταματάει λόγω έλλειψης γλυκόζης. Για τη ζύμη *S. cerevisiae*, μόνο τα θρεπτικά υποστρώματα 2, 5 και 6 επιτρέπουν την ανάπτυξη μέχρι και τις 72 ώρες (το υπόστρωμα 2 περιέχει επιπλέον γλυκόζη και τα υποστρώματα 5 και 6 περιέχουν υδρολυμένο έλαιο πυρόλυσης κατηγορίας 2B, το οποίο δεν αναστέλλει την ανάπτυξη των συγκεκριμένων μικροοργανισμών), ενώ τα θρεπτικά υποστρώματα 1, 3, και 4 δεν επιτρέπουν την ανάπτυξη της ζύμης μετά τις 24 ώρες.

Η ανάπτυξη των αποικιών της «Νέας ζύμης» ήταν πολύ ικανοποιητική μέχρι τις 24 ώρες, αφού σχεδόν όλα τα θρεπτικά υποστρώματα ανέπτυξαν περισσότερες από 40.000.000 αποικίες. Στις 72 ώρες ανάπτυξης βλέπουμε αρκετά μεγάλη ύφεση στις αποικίες των θρεπτικών υποστρωμάτων 1, 2, 3, 5, και 6, ενώ στο θρεπτικό υπόστρωμα 4 η ανάπτυξη έχει σταματήσει.



Σχεδιάγραμμα 1. Αποικίες της ζύμης *S. cerevisiae* μετά από 24 και 72 ώρες ανάπτυξης σε θρεπτικό υλικό YEM που περιείχε γλυκόζη ή έλαιο πυρόλυσης.



Σχεδιάγραμμα 2. Αποικίες της «Νέας ζύμης» μετά από 24 και 72 ώρες ανάπτυξης σε YEM θρεπτικό υλικό που περιείχε γλυκόζη ή έλαιο πυρόλυσης.

3.2 Ανάλυση της ανάπτυξης των ζυμών *S. cerevisiae* και του *C. curvatus*, σε θρεπτικό υλικό YEM με έλαιο πυρόλυσης.

Μετά την ανάπτυξη προκαλλιέργειας 1 ml σε κωνικές φιάλες που περιείχαν 10 ml θρεπτικό υλικό YPD, οι μικροοργανισμοί *S. cerevisiae* και *C. curvatus* αναπτύχθηκαν σε (αποστειρωμένα σε αυτόκαυστο) θρεπτικά υλικά YEM, στα οποία είχαν προστεθεί μεγάλες ποσότητες ελαίου πυρόλυσης ή γλυκόζη (Πίνακας 3). Οι καλλιέργειες ξεκίνησαν με 25 ml θρεπτικό υλικό σε κωνικές φιάλες των 250 ml και επωάστηκαν για 24 ώρες στους 30 °C και σε 250 rpm.

Στην συνέχεια ελήφθη 1 ml δείγματος από την καλλιέργεια, αραιώθηκε σε 5 ml αποστειρωμένου YPD και 100 μl αραιωμένου δείγματος απλώθηκαν σε τρυβλία Petri. Η ανάπτυξη εξετάστηκε με μικροσκοπική μέτρηση και με καταμέτρηση των αποικιών σε τρυβλία Petri, τα οποία επωάστηκαν σε κλίβανο θερμοκρασίας 30 °C.

Πίνακας 3: Τα θρεπτικά υλικά που χρησιμοποιήθηκαν για την ανάπτυξη των ζυμών *S. cerevisiae* και *C. curvatus* αντίστοιχα.

<i>S. cerevisiae</i>		<i>C. curvatus</i>	
Αρ.	Θρεπτικά υλικά	Αρ.	Θρεπτικά υλικά
1	YEM + 4 g/L γλυκόζη	1A	YEM* + 4 g/L γλυκόζη
2	YEM+10% έλαιο πυρόλυσης ^{&} 2B	2A	YEM* + 10% έλαιο πυρόλυσης 2B
3	YEM + 20% έλαιο πυρόλυσης 2B	3A	YEM* + 20% έλαιο πυρόλυσης 2B
4	YEM + 40% έλαιο πυρόλυσης 2B	4A	YEM* + 40% έλαιο πυρόλυσης 2B

[&] αντιστοιχεί σε περίπου 2g/L γλυκόζη

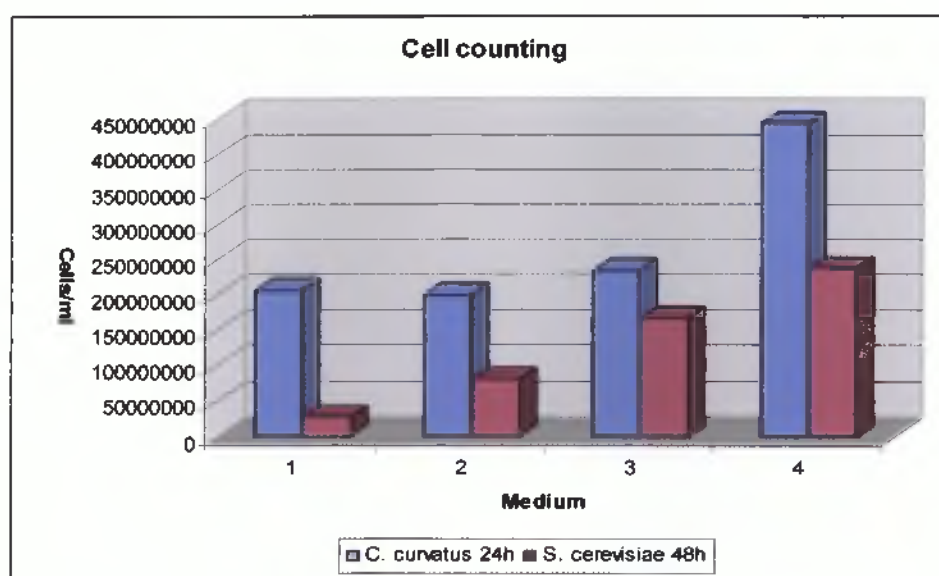
* 0.64 g/L Ουρία αντί 6.4 g/L

Για να μπορέσουμε να καταγράψουμε την συσσώρευση των λιπιδίων στον *C. curvatus*, μειώσαμε στο δεκαπλάσιο την ποσότητα της Ουρίας που βρισκόταν στο θρεπτικό υλικό αυτής της σειράς.

Η ποσότητα των κυττάρων του *S. cerevisiae* καταγράφηκε μέσω μικροσκοπικής μέτρησης μετά από 24 και 120 ώρες, ενώ για τον *C. curvatus* η μέτρηση πραγματοποιήθηκε μετά από 48 και 120 ώρες αντίστοιχα.

Εφόσον τα δείγματα μετά τις 120 ώρες έδειξαν μικρό αριθμό αποικιών, τα δείγματα που ελήφθησαν μετά από 48 ώρες αναλύθηκαν για την περιεκτικότητά τους σε γλυκόζη. Αυτό έδειξε ότι με εξαίρεση την καλλιέργεια 4Α, όλη η γλυκόζη είχε ήδη καταναλωθεί μέσα σε 48 ώρες άρα η μέτρηση των αποικιών μετά από 120 ώρες μπορεί να μην αντικατοπτρίζει την ποσότητα των ζωντανών κυττάρων. Το **Σχεδιάγραμμα 3** υποδεικνύει το αποτέλεσμα της μέτρησης των κυττάρων

Ο συνδυασμός της μείωσης της γλυκόζης μετά τις 48 ώρες και της μέτρησης των μικροβιακών κυττάρων μετά τις 24 ώρες για τον *C. curvatus* και μετά τις 48 ώρες για τον *S. cerevisiae*, απέδειξε ότι και οι δύο μικροοργανισμοί μπορούν να αναπτυχθούν υπό την παρουσία ελαίου πυρόλυσης κατηγορίας 2B έως ένα ποσοστό, περίπου 40%.

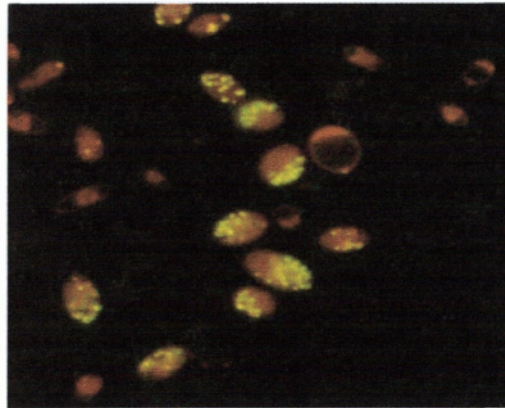


Σχεδιάγραμμα 3. Μέτρηση των κυττάρων των ζυμών *S. cerevisiae* και *C. curvatus*.

3.3 Ανάλυση του ενδοκυτταρικού ελαίου στη ζύμη *Cryptococcus curvatus*

Όπως έχει προαναφερθεί, ένα σημαντικό χαρακτηριστικό της ζύμης *C. curvatus* είναι η ικανότητά της να συσσωρεύει έλαιο στα κύτταρά της. Για να εξετάσουμε την ανάπτυξη της *C. curvatus*, καθώς επίσης και την ικανότητά της να συσσωρεύει έλαιο, ξεκινήσαμε καλλιέργεια σε 50 ml αποστειρωμένου θρεπτικού υλικού YPD το οποίο

περιείχε έλαιο πυρόλυσης κατηγορίας 2B, σε αναλογίες 10%, 20% και 30%. Οι καλλιέργειες επωάστηκαν στους 30 °C και σε 250 rpm για 24 ώρες. Τα κύτταρα του *C. curvatus* που ελήφθησαν από τις καλλιέργειες χρωματίστηκαν με ειδικό υλικό που φέρει την ονομασία «κόκκινο του Νείλου» ή «Nile red», με σκοπό τα σταγονίδια του ελαίου στα κύτταρα να είναι εμφανή.

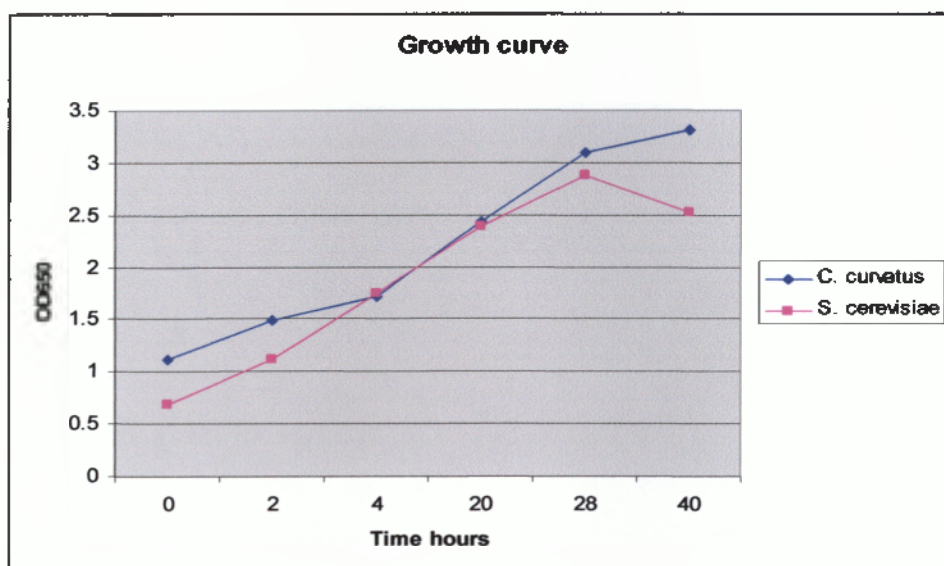


Εικόνα 5. Μικροσκοπική παρατήρηση των χρωματισμένων κυττάρων του *C. curvatus*.

Η μικροσκοπική ανάλυση που απεικονίζεται στην **Εικόνα 5**, δείχνει ότι η ζύμη *C. curvatus* έχει την δυνατότητα να συσσωρεύει έλαιο στα κύτταρά της, όταν αναπτύσσεται σε θρεπτικό υλικό εμπλουτισμένο με έλαιο πυρόλυσης. Οι ανοιχτόχρωμες κίτρινες κηλίδες στα κύτταρα είναι τα χρωματισμένα σταγονίδια των λιπιδίων .

3.4 Ανάπτυξη των μικροοργανισμών *S. cerevisiae* και *C. curvatus* σε Mineral medium θρεπτικό υλικό, στο οποίο έχει προστεθεί έλαιο πυρόλυσης

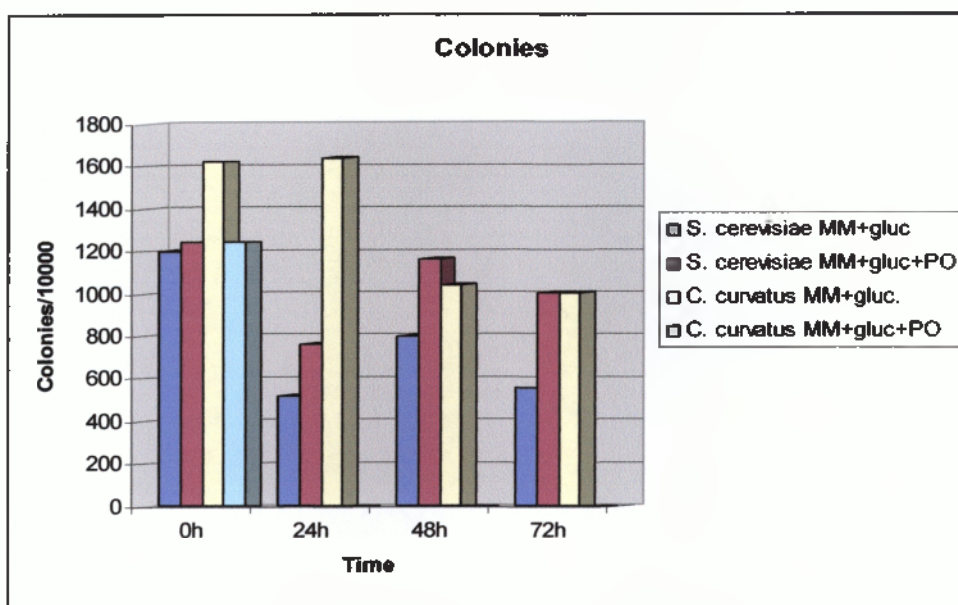
Μετά από μία προκαλλιέργεια των ζυμών *C. curvatus* και *S. cerevisiae* (σε θρεπτικό υλικό YPD), οι ζύμες αναπτύχθηκαν σε 25 ml (αποστειρωμένου σε αυτόκαυστο) Mineral Medium θρεπτικό υλικό με 20% έλαιο πυρόλυσης κατηγορίας 2B. Η ανάπτυξή τους καταγράφηκε μέσω της μέτρησης OD₆₅₀. Η μέτρηση OD₆₅₀ υποδεικνύει την ανάπτυξη των δύο αυτών μικροοργανισμών σε έλαιο πυρόλυσης κατηγορίας 2B (**Σχεδιάγραμμα 4**).



Σχεδιάγραμμα 4. Καμπύλες ανάπτυξης των ζυμών *S. cerevisiae* και *C. curvatus* σε Mineral medium θρεπτικό υλικό, που περιέχει στην σύστασή του 20% έλαιο πυρόλυσης 2B.

Η κατανάλωση της γλυκόζης καταγράφηκε μέσω της HPLC όπου και αναλύθηκαν τα δείγματα που χρησιμοποιήσαμε. Η ανάλυση της HPLC έδειξε ότι μετά από 24 ώρες δεν υπήρξε ίχνος γλυκόζης στην καλλιέργεια του *S. cerevisiae*, ενώ την ίδια στιγμή δεν ανιχνεύτηκε γλυκόζη και στην καλλιέργεια του *C. curvatus*. Για τον λόγο αυτό, το πείραμα επαναλήφθηκε με διαφορετικό τρόπο.

Η ανάπτυξη των ζυμών αυτή την φορά έγινε σε 25 ml Mineral medium που περιείχε 20 g/L γλυκόζη και σε 25 ml Mineral Medium με 16 g/L γλυκόζη και 20% έλαιο πυρόλυσης κατηγορίας 2B στην σύστασή του. Στην συνέχεια καταμετρήθηκε ο αριθμός των αποικιών με δείγματα που ελήφθησαν σε 0, 24, 48 και 72 ώρες (Σχεδιάγραμμα 5).



Σχεδιάγραμμα 5. Γραφική απεικόνιση του αριθμού των αποικιών των ζυμών *S. cerevisiae* και *C. curvatus* σε 0, 24, 48 και 72 ώρες.

Ο αριθμός των αποικιών των προαναφερθέντων καλλιιεργειών του *C. curvatus* και του *S. cerevisiae*, που αναπτύχθηκαν σε Mineral medium θρεπτικό υλικό με προσθήκη γλυκόζης παραμένει σταθερός. Παρ' όλα αυτά, δεν βρέθηκαν αποικίες στα τρυβλία που περιέχονταν οι καλλιέργειες του *C. curvatus*, που αναπτύχθηκαν στο Mineral medium με την γλυκόζη μαζί με έλαιο πυρόλυσης, αποδεικνύοντας ότι η παρουσία του ελαίου της πυρόλυσης παρεμποδίζει την ανάπτυξη του συγκεκριμένου μικροοργανισμού.

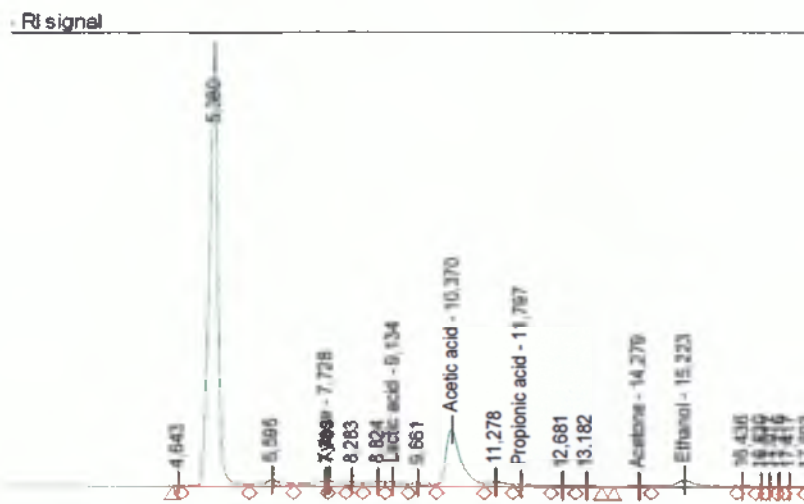
Συνεπώς, η μέτρηση OD₆₅₀ όπως απεικονίζεται στο Σχεδιάγραμμα 5, δεν είναι μία αξιολογή ένδειξη της ανάπτυξης των μικροοργανισμών σε Mineral medium + γλυκόζη + έλαιο πυρόλυσης 2B.

3.5 Ανάλυση της παραγωγής αιθανόλης κατά την διάρκεια της ανάπτυξης της ζύμης *S. cerevisiae* σε έλαιο πυρόλυσης

Μετά την επίτευξη μιας καλής ανάπτυξης της ζύμης *S. cerevisiae* σε έλαιο πυρόλυσης, το επόμενο βήμα μας ήταν να ερευνήσουμε εάν η ζύμη αυτή είναι ικανή να παράγει βιοαιθανόλη από το έλαιο της πυρόλυσης.

Η *S. cerevisiae* αναπτύχθηκε σε 25 ml θρεπτικού υλικού Mineral medium που περιείχε 20 g/L γλυκόζη και σε 25 ml Mineral Medium με 16 g/L γλυκόζη και 20% έλαιο πυρόλυσης κατηγορίας 2B.

Μετά από 48 ώρες συνεχούς επώασης, το δοχείο όπου βρισκόταν η καλλιέργεια μαζί με το θρεπτικό υλικό σφραγίστηκε για να δημιουργηθεί ένα περιβάλλον αναερόβιας ανάπτυξης, το οποίο είναι γνωστό ότι ενεργοποιεί την παραγωγή αιθανόλης στον *S. cerevisiae*. Μετά από 24 ώρες επώασης σε κλίβανο στους 30 °C, συλλέχθηκαν δείγματα από την καλλιέργεια και με την χρήση της HPLC αναλύθηκαν, για να ανιχνευτεί η ποσότητα της αιθανόλης που περιέχονταν σε αυτές (Εικόνα 6). Τα αποτελέσματα έδειξαν ότι μόνο στο θρεπτικό υλικό Mineral Medium που περιείχε γλυκόζη και έλαιο πυρόλυσης 2B, ανιχνεύτηκε ένα μικρό ποσοστό αιθανόλης περίπου 0.6%.



Εικόνα 6. Ανάλυση HPLC του θρεπτικού υλικού Mineral medium + γλυκόζη + έλαιο πυρόλυσης που αναπτύχθηκε ο *S. cerevisiae*.

Δεδομένου ότι η κατάσταση της καλλιέργειας δεν ήταν άριστη έτσι ώστε να παραχθεί αιθανόλη, η γλυκόζη, στην καλλιέργεια με το Mineral medium + 20 g/L γλυκόζη πιθανότατα καταναλώθηκε πριν από την επαγωγή της αιθανόλης. Κατά συνέπεια, το πείραμα με τον *S. cerevisiae* επαναλήφθηκε με διαφορετικό τρόπο:

Μετά από προκαλλιέργεια του *S. cerevisiae* σε 40 ml θρεπτικό υλικό YPD, προστέθηκαν 10 ml Mineral medium που περιείχε 20 g/L γλυκόζη και 10 ml Mineral

Medium που περιείχε 20 g/L γλυκόζη και 20% έλαιο πυρόλυσης κατηγορίας 2B. Από τις καλλιέργειες ελήφθησαν 2 ml δείγματος που μεταφέρθηκαν σε αναερόβιες φιάλες για να ξεκινήσουν οι μετρήσεις (t=0). Οι φιάλες τοποθετήθηκαν σε κλίβανο στους 30 °C. Μετά από 24 ώρες (t=24), προστέθηκαν στα δείγματα που βρίσκονταν στις αναερόβιες φιάλες 20 g/L γλυκόζη και 20 g/L γλυκόζη + 20% έλαιο πυρόλυσης 2B αντίστοιχα, με την χρήση σύριγγας. Η ίδια διαδικασία επαναλήφθηκε και για τις επόμενες 48, 120 και 144 ώρες. Τελικώς, τα δείγματα αναλύθηκαν και εξετάστηκαν με την χρήση HPLC, τα αποτελέσματα των οποίων καταγράφονται στον Πίνακα 4.

Πίνακας 4. Συγκεντρώσεις γλυκόζης και αιθανόλης μετά την ανάλυση της HPLC. Το ποσοστό % του ελαίου της πυρόλυσης μπορεί να υπολογιστεί, υποθέτοντας ότι δεν έγινε καθόλου κατανάλωση.

Θρεπτικά υλικά	Χρόνος	Γλυκόζη	Αιθανόλη	Έλαιο Πυρόλυσης
		g/L	%	%
M.M. + γλυκόζη	0h	11.5	0.0	0
M.M.+γλυκόζη+ Ε.Π. 2B	0h	16.9	0.0	17
M.M. + γλυκόζη	24h	0.2	0.5	0
M.M.+γλυκόζη+ Ε.Π. 2B	24h	0.6	0.9	32
M.M. + γλυκόζη	48 h	0.2	0.5	0
M.M.+γλυκόζη+ Ε.Π. 2B	48 h	0.6	0.8	46
M.M. + γλυκόζη	120 h	0.2	1.5	0
M.M.+γλυκόζη+ Ε.Π. 2B	120 h	1.0	1.7	59
M.M. + γλυκόζη	144 h	0.2	2.5	
M.M.+γλυκόζη + Ε.Π. 2B	144 h	19.7	1.7	

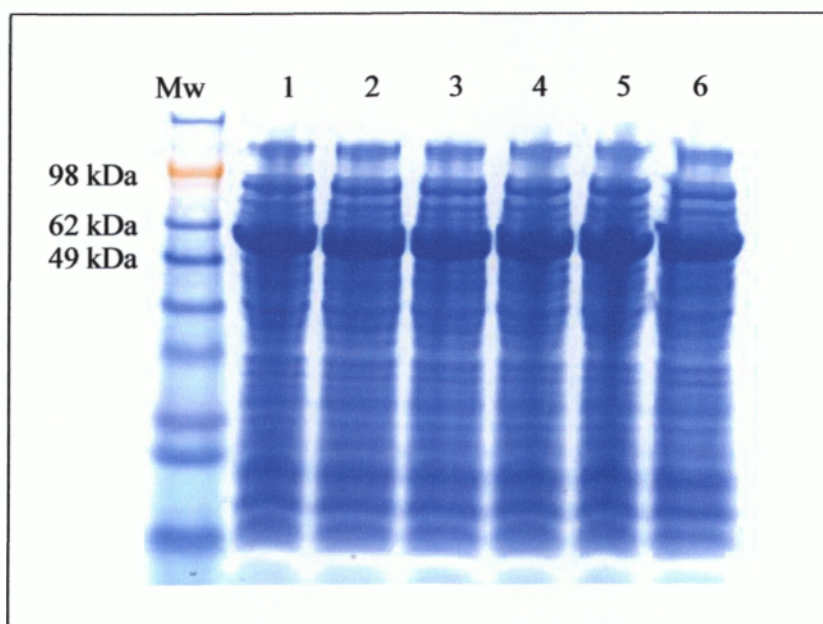
όπου Ε.Π.: έλαιο πυρόλυσης, M.M. : Mineral Medium

Σε αυτό το πειραματικό στάδιο, ο *S. cerevisiae* απέδειξε ότι μπορεί να παράγει αιθανόλη σε ποσοστό 2.5% εάν αναπτυχθεί σε Mineral Medium με προσθήκη γλυκόζης και 1.7 % εάν αναπτυχθεί σε Mineral Medium με προσθήκη ελαίου πυρόλυσης 2B.

3.6 Κλωνοποίηση και "έκφραση" του γονιδίου LGK με την χρήση του συστήματος pBAD-TOPO.

Η διαδικασία της PCR πραγματοποιήθηκε σε πλασμίδια που περιείχαν το γονίδιο LGK του *Aspergillus niger* ακολουθώντας τους εκκινητές LGK-E-FW1 και LGK-E-RV1. Το μείγμα της αντίδρασης (28 μl) περιείχε 1 μl DNA, 2 μl LGK-E-FW1, 2 μl LGK-E-FW2, 12.5 μl Dream Taq, 9.5 μl δις-απεσταγμένο νερό και Mg/Buffer 1 μl. Στη συνέχεια, το μείγμα της αντίδρασης αναλύθηκε σε πηκτή αгарόζης περιεκτικότητας 1% w/v, για να ανιχνευθεί εάν η αντίδραση της PCR ολοκληρώθηκε με επιτυχία. Τα αποτελέσματα ήταν θετικά έτσι ώστε να ξεκινήσει η διαδικασία της κλωνοποίησης και του μετασχηματισμού των κυττάρων *E. coli*. Κατά συνέπεια, απομονώθηκαν θραύσματα κατάλληλου μεγέθους (1314 bp) από την πηκτή τα οποία χρησιμοποιήθηκαν για την κλωνοποίηση στο πλασμίδιο έκφρασης pBAD-TOPO, σύμφωνα με το πρωτόκολλο του κατασκευαστή.

Στην συνέχεια, εξετάστηκαν αποικίες ανθεκτικές στην αμικιλίνη για την ανίχνευση του γονιδίου LGK στο βακτήριο *E. coli*. Στο πείραμα «έκφρασης» χρησιμοποιήθηκαν 6 "θετικές" αποικίες (150 μl) μετασχηματισμένου *E. coli*, οι οποίες απλώθηκαν σε τρυβλία Petri που περιείχαν LB θρεπτικό υλικό εμβολιασμένο με 50 μl αμικιλίνης και επώαστηκαν για 2 ώρες μέσα σε κλίβανο επώασης, στους 37 °C. Μετά τις 2 ώρες επώασης, προστέθηκαν 3 μl αραβινόζης συγκέντρωσης 20% και οι αποικίες επώαστηκαν για 3 ακόμη ώρες. Όταν ολοκληρώθηκε η επώαση, τα δείγματα αναλύθηκαν ηλεκτροφορητικά σε πηκτή πολυακρυλαμίδιου (SDS-Page), με σκοπό να αναλυθούν οι πρωτεΐνες μετά από χρώση με μία μπλε χρωστική ουσία (simply blue). Όπως απεικονίζεται και στην **Εικόνα 7**, τα αποτελέσματα ήταν επιτυχή αφού ανιχνεύτηκε ενισχυμένη παραγωγή πρωτεΐνης με μοριακό βάρος πολύ κοντά στο αναμενόμενο (64.5 kDa).

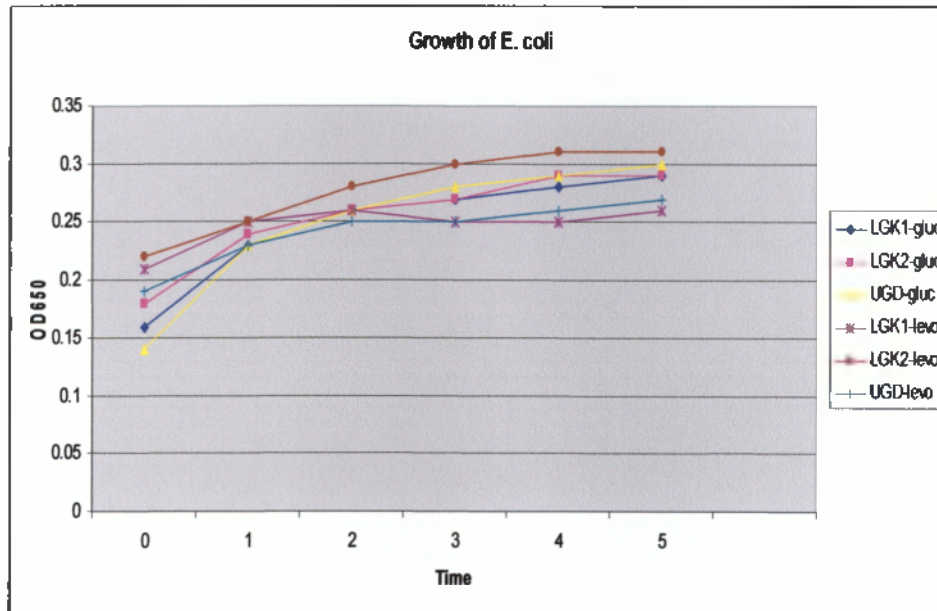


Εικόνα 7. SDS-Page ηλεκτροφορητική ανάλυση των πρωτεϊνών του *E. coli*. Mw: δείκτης του μοριακού βάρους της πρωτεΐνης και 1-6: τα δείγματα που πάρθηκαν από τις αποικίες του LGK- *E. coli*.

3.7 Ανάπτυξη του βακτηρίου *E. coli* σε M9 θρεπτικό υλικό στο οποίο έχει προστεθεί λεβογλουκοζάνη.

Δύο σειρές βακτηρίων *E. coli* που περιείχαν τα πλασμίδια pBAD-LGK (LGK1= LGK-E-FW1, LGK2= LGK-E-FW2) και pBAD-UGD (UGD=UGP- γλυκόζη αφυδρογονάση), αναπτύχθηκαν με προκαλλιέργεια (10 ml) σε κωνικές φιάλες με LB θρεπτικό υλικό εμβολιασμένο με 150 μl αμπικιλίνης, σε ειδικό μηχάνημα ανάδευσης στους 37 °C και σε 250 rpm.

Στη συνέχεια, 3 ml από την προκαλλιέργεια τοποθετήθηκαν σε 15 ml θρεπτικών υλικών M9 που περιείχαν 150 μl αμπικιλίνης, 2 μl αραβινόζης (20%) και άλλοτε 4 g/L γλυκόζη ή 4 g/L λεβογλουκοζάνη. Αργότερα, πραγματοποιήθηκε μέτρηση OD₆₅₀ διάρκειας 5 ωρών.



Σχεδιάγραμμα 6. Καμπύλες ανάπτυξης του μετασχηματισμένου βακτηρίου *E. coli* με πλασμίδια pBAD-LGK και pBAD-UGD, σε θρεπτικά υλικά M9 με προσθήκη γλυκόζης ή λεβογλουκοζάνης.

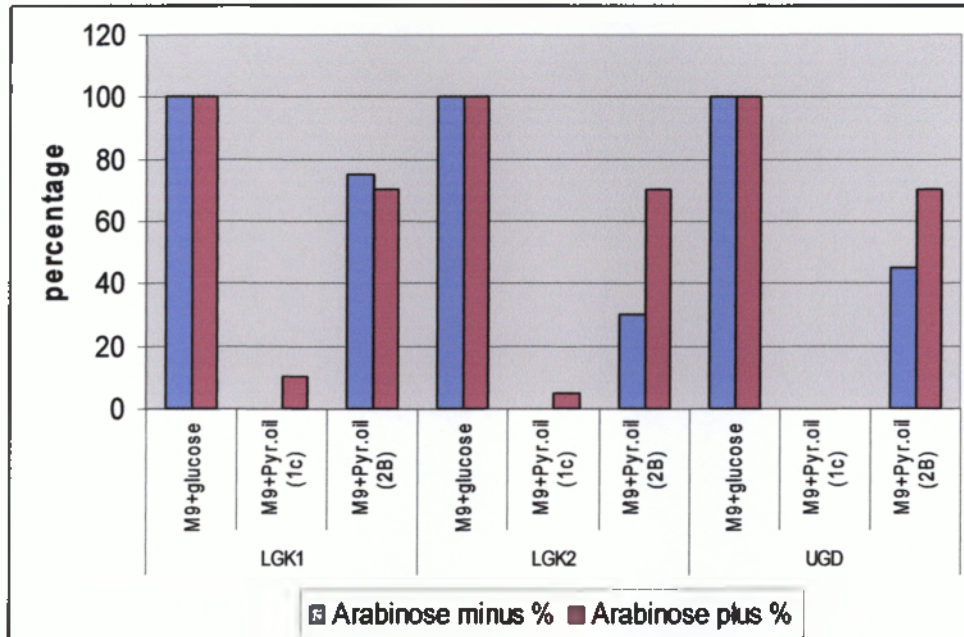
Το Σχεδιάγραμμα 6 παρουσιάζει την ανάπτυξη του *E. coli* που δεν ήταν ιδιαίτερα ικανοποιητική, καθώς επίσης και την απουσία θετικού αποτελέσματος από την "έκφραση" του γονιδίου LGK.

Για να αποδείξουμε εάν το *E. coli* με την βοήθεια του pBAD-LGK έχει την ικανότητα να αναπτυχθεί σε έλαιο πυρόλυσης, πραγματοποιήθηκε ένα ακόμη πείραμα.

Για το πείραμα χρειάστηκαν 0.2 ml από τις προκαλλιέργειες που προαναφέρθηκαν, τα οποία αναπτύχθηκαν α) σε θρεπτικό υλικό M9 με 4 g/L γλυκόζη, β) σε M9 θρεπτικό υλικό με έλαιο πυρόλυσης κατηγορίας 2B και γ) σε M9 θρεπτικό υλικό με έλαιο πυρόλυσης κατηγορίας 1C. Το έλαιο πυρόλυσης της κατηγορίας 2B περιέχει γλυκόζη (4 g/l), ενώ το έλαιο πυρόλυσης της κατηγορίας 1C περιέχει λεβογλουκοζάνη (4 g/l).

Το πείραμα πραγματοποιήθηκε δύο φορές. Την πρώτη φορά συμπεριλήφθηκαν κώτταρα *E. coli* με πλασμίδια pBAD, παρουσία 2 ml αραβινόζης, ενώ την δεύτερη φορά πραγματοποιήθηκε με τον ίδιο τρόπο χωρίς την προσθήκη αραβινόζης.

Μετά την προκαλλιέργεια, τα δείγματα τοποθετήθηκαν σε τρυβλία Petri με θρεπτικό υπόστρωμα LB και αναπτύχθηκαν σε κλίβανο επώασης 37 °C, έτσι ώστε να γίνει εμφανής ο αριθμός των κυττάρων που επέζησαν (Σχεδιάγραμμα 7).



Σχεδιάγραμμα 7. Το σχετικό ποσοστό των αποικιών του *E. coli* σε τρυβλία με LB θρεπτικό υπόστρωμα, που περιείχε θρεπτικό υλικό M9 + γλυκόζη / έλαιο πυρόλυσης (2B) / έλαιο πυρόλυσης (1C) με ή χωρίς προσθήκη Αραβινόζης. Η τιμή της γλυκόζης έχει οριστεί στο 100%.

Ενώ κανένα κύτταρο pBAD-UGD δεν επέζησε σε έλαιο πυρόλυσης κατηγορίας 1C (που περιέχει λεβογλουκοζάνη), ένα ποσοστό 5-7% των κυττάρων *E. coli* pBAD-LGK επέζησαν σε προκαλλιέργειες της συγκεκριμένης κατηγορίας ελαίου πυρόλυσης, στο οποίο είχε προστεθεί αραβινόζη. Η περαιτέρω ανάπτυξη των αποικιών σε έλαιο πυρόλυσης με γλυκόζη κ.λπ. ήταν αναμενόμενη.

Βάση των παραπάνω, αποδεικνύεται ότι όταν το γονίδιο LGK "εκφραστεί" δίνει την δυνατότητα στο *E. coli* να μεταβολίζει την λεβογλουκοζάνη.

4. ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ

Στην παρούσα εργασία μελετήθηκαν εργαστηριακές ζυμώσεις αποστειρωμένου ελαίου πυρόλυσης από ζύμες, με στόχο την παραγωγή βιοκαυσίμων (βιοαιθανόλης και βιοντίζελ). Επίσης, μελετήθηκε η ικανότητα του βακτηρίου *Escherichia coli* να χρησιμοποιήσει την λεβογλουκοζάνη του ελαίου πυρόλυσης ως πηγή άνθρακα, όταν στο γενετικό υλικό αυτού του βακτηρίου είχε εισαχθεί (με την διαδικασία της κλωνοποίησης) το γονίδιο που κωδικοποιεί το ένζυμο levoglucosan kinase (LGK), το οποίο είχε απομονωθεί από τον μύκητα *Aspergillus niger*.

Παρατηρώντας την σύσταση του ελαίου πυρόλυσης στον Πίνακα 5, μπορούμε να διαπιστώσουμε τα πλεονεκτήματα αλλά και τα μειονεκτήματα του ελαίου, που μπορεί να δημιουργηθούν με την χρήση του ως βασικό συστατικό κατά τη μικροβιακή ζύμωση.

Πίνακας 5. Μέγιστη περιεκτικότητα των χημικών ουσιών που περιέχονται στο έλαιο πυρόλυσης (wt%).

	wt%		wt%
Λεβογλουκοζάνη	30.4	Φορμαλδεύδη	2.4
Υδροξύ-ακεταλδεύδη	15.4	Φαινόλη	2.1
Οξικά οξύ	10.1	Προπιονικό οξύ	2.0
Μυρμηγκικό οξύ	9.1	Ακετόνη	2.0
Ακεταλδεύδη	8.5	Μέθυλο-κυκλό-πεντάνιο I	1.9
Φουλφουρική αλκοόλη	5.2	Μυρμηγκικός μεθυλεστέρας	1.9
Κατεχόλη	5.0	Υδροκινόνη	1.9
Μεθυλική γλυοξάλη	4.0	Ακετόλη	1.7
Αιθανόλη	3.6	Λακτόνη angelica	1.6
Αιθυλοκυτταρίνη	3.2	Συριγγοαλδεύδη	1.5
1,6- ανυδρογλυκοφουρανόζη	3.1	Μεθανόλη	1.4

Πηγή: BTG – Enshede, The Netherlands.

Το βασικότερο πλεονέκτημα που θα μπορούσαμε να αναγνωρίσουμε στο έλαιο της πυρόλυσης είναι ότι περιέχει στην σύστασή του μόνο-σάκχαρα μέχρι και 30%, γεγονός που το καθιστά ικανό να ζυμωθεί από μικροοργανισμούς.

Τα δύο βασικότερα προβλήματα που μπορούν να προκύψουν από την χρήση του ελαίου πυρόλυσης ως βασικό υπόστρωμα μικροβιακής ζύμωσης, είναι τα εξής:

- Το γεγονός ότι περιέχει ως κύρια πηγή άνθρακα και ενέργειας τη λεβογλουκοζάνη, ένα ανυδροσάκχαρο, το οποίο όμως δεν μπορεί να χρησιμοποιηθεί εύκολα από τους μικροοργανισμούς ζύμωσης, μπορεί ωστόσο να υδρολυθεί σε γλυκόζη. Η γλυκόζη που παράγεται μέσω της υδρόλυσης της λεβογλουκοζάνης μπορεί να χρησιμοποιηθεί από τους μικροοργανισμούς για τη ζύμωση του ελαίου και την παραγωγή αιθανόλης. Η υδρόλυση της λεβογλουκοζάνης μπορεί να γίνει είτε χημικά είτε βιολογικά μέσω του ενζυμικού συστήματος (π.χ. levoglucosane kinase) ορισμένων μικροοργανισμών.

- Επιπλέον, αρκετά από τα υπόλοιπα συστατικά του ελαίου πυρόλυσης (όπως αρωματικά, αλδεύδη, φουράνιο και παράγωγα του φουρανίου), είναι κατά μεγάλο ποσοστό τοξικά για πολλούς μικροοργανισμούς.

Προηγούμενα πειράματα υπέδειξαν ότι η τοξικότητα του βιοελαίου μειώνεται όταν αποστειρώνεται σε αυτόκαυστο μαζί με θρεπτικό υλικό, πριν από την χρήση του στην διαδικασία της ζύμωσης. Για να αναπτυχθούν οι μικροοργανισμοί *S. cerevisiae* και *C. curvatus* σε έλαιο πυρόλυσης, το έλαιο υδρολύεται με οξύ, έτσι ώστε να μετατραπεί η λεβογλουκοζάνη σε γλυκόζη.

Τα πειράματα που περιγράφηκαν σε αυτή την μελέτη, υπέδειξαν ότι οι συγκεκριμένες ζύμες (*S. cerevisiae*, *C. curvatus*) μπορούν να αναπτυχθούν σε υδρολυμένο έλαιο πυρόλυσης με ποσοστό επιτυχίας 40% και για τις δύο. Επίσης, ο *S. cerevisiae* μπορεί να παράγει αιθανόλη σε ποσοστό 1.7% και ο *C. curvatus* λιπαρά οξέα σε ένα εύλογο ποσοστό, αφού ζυμωθούν με έλαιο πυρόλυσης (κυρίως κατηγορίας 2B), το οποίο περιέχει στην σύστασή του διάφορα θρεπτικά υλικά.

Δεδομένου ότι η υδρόλυση του ελαίου πυρόλυσης είναι μία χρονοβόρα και βλαβερή διαδικασία, διότι παράγει πολλά απόβλητα (CaSO_4) επικίνδυνα για τον άνθρωπο και το περιβάλλον, εξετάστηκε η παράμετρος αποφυγής αυτής της διαδικασίας.

Το ένζυμο LGK που απομονώθηκε από τον *A. niger*, απέδειξε σε προηγούμενα πειράματα ερευνητών ότι έχει την ικανότητα να μετατρέπει την λεβογλουκοζάνη σε 6-φωσφορική γλυκόζη (G6PD), η οποία έχει την δυνατότητα να χρησιμοποιείται από μικροοργανισμούς ως πηγή άνθρακα. Κατά συνέπεια, εξετάστηκε το κλωνοποιημένο (με το LGK γονίδιο) βακτήριο *E. coli* για να διαπιστωθεί η ικανότητα του να μεταβολίσει την λεβογλουκοζάνη και φυσικά, ως αποτέλεσμα, την αποφυγή της υδρόλυσης του ελαίου πυρόλυσης.

Τα αποτελέσματα των πειραμάτων ήταν θετικά, αφού το *E. coli* κατάφερε να αναπτυχθεί σε LB θρεπτικό υπόστρωμα υπό την παρουσία λεβογλουκοζάνης, με ποσοστό ανάπτυξης περίπου 5-7%.

Με αφορμή αυτό το πείραμα, οι ερευνητές προσπαθούν τώρα να ανακαλύψουν κι άλλους μικροοργανισμούς, που με την βοήθεια του γονιδίου LGK να μπορούν να αναπτυχθούν σε έλαιο πυρόλυσης αποφεύγοντας την διαδικασία της υδρόλυσης. Το επόμενο βήμα θα είναι η κλωνοποίηση ζύμης με LGK, όπως περιγράφεται συνοπτικά στο παρακάτω διάγραμμα:

ZYMH + LGK -----> Levoglucosan ???

ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

Ελληνική

Γουσουρωιώτης Η.Ι. (2005). «Αξιολόγηση επενδυτικών σχεδίων ανάπτυξης συστημάτων θέρμανσης με στερεά βιομάζα». Τμήμα μηχανικών παραγωγής και διοίκησης, Αθήνα.

Διαχειριστής Ελληνικού Συστήματος Μεταφοράς Ενέργειας Α. Ε. (2000). Διαθέσιμο στην ιστοσελίδα:

http://www.desmie.gr/content/index.asp?parent_id=44&cat_id=1403&page_id=2346&lang=1. Τελευταία επίσκεψη: 10-03-2011.

Ινστιτούτο Τεχνικής Χημικών Διεργασιών (2006). «Βιοκαύσιμα και βιοδιυλιστήρια». Εργαστήριο Περιβαλλοντικών Καυσίμων και Υδρογονανθράκων, Θεσσαλονίκη.

Καλαμπογιά Ε. (2005). «Ανάλυση κύκλου ζωής βιοαιθανόλης και βιοντίζελ ως καύσιμα μεταφοράς». Τμήμα μηχανικών περιβάλλοντος, Χανιά.

Κέμου Α. (2010). «Μελέτη βιοντίζελ μέσω πυρηνικού μαγνητικού συντονισμού NMR-1H». Τμήμα τεχνολογιών αντιρρύπανσης Δυτικής Μακεδονίας.

Ντογκούλης Α.Π. (2008). «Αξιοποίηση των υπολειμμάτων βάμβακος του Ν. Λάρισας για τηλεθέρμανση». Γεωπονική σχολή, Θεσσαλονίκη.

Παπανικολάου Β. (2006). «Μέθοδοι και υλικά ακινητοποίησης βιοκαταλυτών για την παραγωγή καύσιμης και βιομηχανικής αλκοόλης σε βιοαντιδραστήρα διαλείποντος έργου». Τμήμα βιολογίας, Πάτρα.

Τζιμόπουλος Β. (2009). «Παραγωγή βιοαιθανόλης». Τμήμα μηχανικών περιβάλλοντος, Ξάνθη.

Τριανταφυλλίδης Κ. (2008). «Έρευνα για βιοκαύσιμα δεύτερης γενεάς». Τμήμα χημείας, Αριστοτέλειο Πανεπιστήμιο Θεσσαλονίκης.

Τσούτσος Θ. (2004). «Ανανεώσιμες Πηγές Ενέργειας». Εργαστήριο Ανανεώσιμων Πηγών Ενέργειας, Κρήτη.

Φατσικώστας Α.Ν. (2005). «Καταλυτική αναμόρφωση της αιθανόλης με ατμό για την παραγωγή υδρογόνου για την τροφοδοσία στοιχείων καυσίμου». Τμήμα χημικών μηχανικών, Πάτρα.

Χαραλαμπίδης Δ. (2005). «Τα θετικά και αρνητικά των Ανανεώσιμων Πηγών Ενέργειας». Συνέδριο με θέμα: «Ανανεώσιμες Πηγές Ενέργειας», Μυτιλήνη.

Ξενογλώσση

Balat M. (2005). «Current alternative engine fuels». *Energy Sources*, 27: p. 569-77.

Bargy M.O. (1987). «Vegetable oils for diesel fuel: Opportunities for development». *American Society of Agricultural and Biological Engineers (Microfiche Collection) no. 7*: p. 87-1588.

Biomass Energy (2010). Environmental Friendly and Profitable Energy. Available at: www.biomassenergy.gr

Boerrigter H., Galis H.P., Slort D.J., and Bodenstaff H. «Gas Cleaning for Integrated Biomass Gasification (BG) and Fischer-Tropsch (FT) Systems; Experimental Demonstration of Two BG-FT Systems». Presented at the 2nd World Conference and Technology Exhibition on Biomass for Energy, Industry and Climate Protection, Rome, Italy, May 2004.

Bridgewater A.V., Czernik S., Piskorz J. (2002). «The status of biomass fast pyrolysis. Fast pyrolysis of biomass: A handbook». *CPL Press, vol. 2*: p. 243-296.

British Sugar plc. (2010). Available at: www.britishsugar.co.uk. Last visit at: 12-03-2011.

Brown R.C. (2007). «Hydric Thermochemical/Biological Processing». *Iowa State University, Center for Sustainable Environmental Technologies, 286 Metals Development Building, 7*: p. 136-140.

BTG Biomass Technology Group. (2001-2011). Available at: <http://www.btgworld.com/>. Last visit at: 16-02-2011

Dale B. (2008). «Biofuels: Thinking clearly about the issues». *J. Agric. Food Chem.*, 56: p. 3885-3891.

Davies R.J. (1988). «Yeast oil from cheese whey: Process development». In Moreton R. S. (Ed), *Single cell oil*. Longman Scientific & Technical, London, p. 99-145.

de la Piscina R.P and Homs N. (2008). «Use of biofuels to produce hydrogen (reformation process)». *Chemical Society Reviews*, 37: p. 2459-2467.

Demirbas A. (2003). «Current advantages in alternative motor fuels». *Energy Explore and Exploit*, 21: p. 475-87.

Demirbas A. (2004). «Bioenergy, global warming and enviromental impacts». *Energy sources*, 26: p. 225-36.

Demirbas M.F. and Balat M. (2006). «Recent advantages on the production and utilization trends of biofuels: A global percpective». *Energy conversion and management*, 47: p. 2371-2381.

Dyer J.M., Stymne S., Green A.G., Carlsson A.S. (2008). «High value oils from plants». *Plant Journal*, 54: p. 640-655.

Ericsson K. and Nilsson L. J. (2004). «International biofuel trade-a study of a Swedish import». *Biomass Bioenergy*, 26: p. 205-20.

Evans R.J. and Milne T.A. (1987). «Molecular characterization of the pyrolysis of biomass. 2. Applications». *Energy Fuels*, 1: p. 123-137.

Giroux R., Freel B., Graham R. (2003). «Natural resin formulations». *Ensin group Inc. US Patent*, 6: p. 555-649.

Hall D.O. (1997). «Biomass energy in industrialized countries – a view of the future». *Forest ecology and management*, 91: p. 18-19.

Inderwildi O.R. and King D.A. (2009). «Quo Vadis Biofuels». *Energy and Enviromental Science*, 2: p. 343.

Johnson J.M.F., Coleman M.D., Gesch R., Jaradat A., Mitchell R., Reicoscy D., Wilhelm W. W. (2007). «Biomass-Bioenergy crops in the United States: A changing paradigm», *American Journal of Plant Science and Biotechnology*, 1: p. 1-28.

Kapdi S.S., Vijay V.K., Rajesh S.K., Prasad R. (2005) «Biogass scrubbing, compression and storage: perspective and prospectus in Indian contex». *Renew Energy*, 30: p. 1195-202.

Kitamura Y., Abe Y., Yasui T. (1990). «Metabolism of Levoglucosan in (1, 6-anhydro- β - D-glucopyranose) microorganisms». *Agricultural and Biological Chemistry*, 55 (2): p. 515-521.

Lakshmanan C.M., Hoelsher H.E. (1970). «Production of Levoglucosan by Pyrolysis of Carbohydrates. Pyrolysis in Hot Inert Gas Stream». *Industrial and Engineering Chemistry Product Research and development*, 9: p. 57–59.

Lee J. (1997). «Biological conversion of Lignocellulosic biomass to ethanol». *Journal of Biotechnology*, 56: p. 1-24.

Lynd L. (1996). «Overview and evaluation of fuel ethanol from cellulosic biomass: Technology, economics and policy». *Annual Review of Energy and Environment*, 21: p. 403-465.

Moon N.J., Hammond E.G., Glatz B.A. (1978). «Conversion of cheese whey and whey permeate to oil and single cell protein». *Journal of Dairy Science*, 61: p. 1537-1547.

Nwafor O.M.I. (2004). «Emission characteristics of diesel engine operating on rapessed methyl ester». *Renew Energy*, 29: p. 119-29.

Prosen E.M., Radlein D., Piskorz J., Scott D.S. (1993). «Microbial Utilization of Levoglucosan in Wood Pyrolysate as a Carbon and Energy Source». *Biotechnology and Bioengineering*, 42: p. 538-541.

Sivakumar G., Vail D.R., Xu J., Burner D.M., Jackson O., Lay J., Xumeng G., Weathers P.J. (2009). «Bioethanol and biodiesel: Alternative liquid fuels for future generations». *Engineering in Life Science no. 1*: p. 8-18.

U.S. Department of Energy. (2009). Agronne Transportation Technology R&D Center. Director Larry Johnson, September 2009. Available at: www.transportation.anl.gov/competitions/ethanol_challenge/ethanol.html

Vergopoulou-Markessini E. and Tsianzi S. (2003). «Bonding resins». Publication no. US 6579963. Enigma N. V. Thessalonikh, GR.

Wageningen University (1999-2009). «General characteristics of *E. coli*». *Food Info.net is an initiative of Wageningen University, The Netherlands*.

Walker G.M. (1998). «Yeast Physiology and Biotechnology». John Wiley and Sons, New York, p. 350.

Waltz E. (2008). «Cellulosic ethanol booms despite unproven business models». *Nat. Biotechnology*, 26: p. 8-9.

Wang D., Czernik S., Montane D., Mann M., Chornet E. (1997). «Biomass to Hydrogen via Fast Pyrolysis and Catalytic Steam Reforming of the Pyrolysis Oil or its Fractions». *Ind. Eng. Chem. Res.*, 36: p. 1507-1518.

Wierzbicka A., Lillieblad L., Pagels J., Strand M., Gundrudsson A., Gharibi A. (2005). «Particle emissions from district heating units operating on three commonly used biofuels». *Atmospheric Environment*, 39: p. 139-50.

Wyman C. (1994). «Alternative fuels from biomass and their impact on carbon dioxide accumulation». *Applied Biochemistry and Biotechnology*, 45-46: p. 897-915.

Xiaohua W. and Zhenmin F. (2004). «Biofuel use and its emission of noxious gases in rural China». *Renew Sustain Energy review*, 8: p. 183-92.

Ykema A. (1989). «Lipid production in the oleaginous yeast *Apiotrichum curvatum*». Ph. D Thesis. Free University Amsterdam, The Netherlands.

Ykema A., Verbree E.C., Verwoert I.I.G.S., Van der Linden K.H., Nijkamp H.J.J., and Smit H. (1990). «Lipid production of revertants of Ufa mutants from the oleaginous yeast *Apiotrichum curvatum*». *Applied Microbiology and Biotechnology*, 33: p. 176-182.

Zhuang X.L., Zhang H.X., Yang J. Z., Qi H.Y. (2000). «Preparation of Levoglucosan by Pyrolysis of Cellulose and its Citric Acid Fermentation». *Bioresource Technology*, 79: p. 63-66.

Νομοθετήματα

Directive 2003/30/EC of the European Parliament and of the council of 8 May 2003, on the promotion of the use of biofuels or other renewable fuels for transport.

European Commission (2004). Promoting biofuels in Europe. European Commission, Directorate-General for Energy and Transport, B-1049 Bruxelles, Belgium 2004.

Kyoto Protocol (2005). The European Commission confirmed Kyoto's protocol on May 2002, and it came into force on February 2005 after the confirmation of Russia.