



ΕΘΝΙΚΟ ΜΕΤΣΟΒΙΟ ΠΟΛΥΤΕΧΝΕΙΟ
ΣΧΟΛΗ ΧΗΜΙΚΩΝ ΜΗΧΑΝΙΚΩΝ

**Προεπεξεργασία με μύκητες και
εύρεση ενζύμων υπεύθυνων για την
υδρόλυση και την σακχαροποίηση
λιγνοκυτταρινούχου βιομάζας**

Αθήνα,
2016

Διπλωματική Διατριβή:
Κέντρη Θεοχάρις

Επιβλέπων καθηγητής:
Γ.Λυμπεράτος

Ευχαριστίες

Η παρούσα διπλωματική εργασία εκπονήθηκε στο Εργαστήριο Οργανικής Χημικής Τεχνολογίας της Σχολής Χημικών Μηχανικών του Εθνικού Μετσόβιου Πολυτεχνείου το ακαδημαϊκό έτος 2015-2016, στα πλαίσια της ολοκλήρωσης του κύκλου σπουδών μου στη σχολή. Θα ήθελα να εκφράσω τις ευχαριστίες μου σε όσους με βοήθησαν στην ολοκλήρωσή της και κυρίως:

Τον Καθηγητή της Σχολής Χημικών Μηχανικών του Εθνικού Μετσόβιου Πολυτεχνείου κ. Γεράσιμο Λυμπεράτο για την ευκαιρία που μου προσέφερε να ασχοληθώ με το θέμα αυτό και για την καθοδήγηση του στην πειραματική διαδικασία και στη συγγραφή της εργασίας.

Το σύνολο του δυναμικού του εργαστηρίου για τη βοήθειά τους και το κλίμα συνεργασίας που παρείχαν κατά την παραμονή μου στο εργαστήριο. Ιδιαίτερα θα ήθελα να ευχαριστήσω την Κωνσταντίνα Παπαδοπούλου, τον Γιώργο Λύτρα και την Δήμητρα Χατζηκωνσταντίνου για την αδιάλειπτη προθυμία και συνεισφορά τους σε όλα τα στάδια της εκτέλεσης και συγγραφής της διπλωματικής μου εργασίας.

Τέλος την οικογένεια μου και τους φίλους μου για την υποστήριξη που μου παρείχαν καθ' όλη τη διάρκεια των σπουδών μου.

Πίνακας Περιεχομένων

Ευχαριστίες.....	4
Περίληψη.....	6
Abstract.....	8
Θεωρητικό Μέρος.....	9
1. Ενεργειακό ζήτημα και βιοκαύσιμα δεύτερης γενιάς.....	9
2. Προϊόντα υψηλής προστιθέμενης αξίας από λιγνοκυτταρινούχο βιομάζα.....	11
2.1. Αναγωγικά σάκχαρα.....	11
2.2. Ένζυμα.....	11
2.3. Βιοκαύσιμα.....	12
Βιοιθανόλη.....	12
Υδρογόνο.....	12
Βιοαέριο.....	12
2.4. Οργανικά οξέα.....	12
2.5. Κομπόστ.....	12
2.6. Βιοσυνθετικά υλικά.....	13
2.7. Τρόφιμα και ζωοτροφές.....	13
2.8. Βιοπροσροφητικά.....	13
2.9. Φάρμακα.....	13
3. Η ιτιά ως λιγνοκυτταρινούχος βιομάζα.....	14
4. Φυσικοχημικά χαρακτηριστικά λιγνοκυτταρινούχου βιομάζας.....	15
4.1. Φυσικοχημικά και δομικά χαρακτηριστικά κυτταρίνης.....	17
4.2. Φυσικοχημικά και δομικά χαρακτηριστικά ημικυτταρινασών.....	18
4.3. Φυσικοχημικά και δομικά χαρακτηριστικά λιγνίνης.....	19
5. Τεχνολογίες βιοαποδόμησης λιγνοκυτταρινούχου βιομάζας.....	21
5.1. Εισαγωγή.....	21
5.2. Στάδια αποδόμησης λιγνοκυτταρινούχου βιομάζας.....	21
5.2.1 Προεπεξεργασία λιγνοκυτταρινούχου βιομάζας.....	22
5.2.1.1. Κριτήρια επιλογής μεθόδου προεπεξεργασία λιγνοκυτταρινούχου βιομάζας.....	22
5.2.1.2. Μέθοδοι προεπεξεργασίας λιγνοκυτταρινούχου βιομάζας.....	24
5.2.1.2.1. Φυσική προεπεξεργασία.....	24
5.2.1.2.1.1. Λείανση και άλεση (Grinding and milling).....	24
5.2.1.2.1.2. Προεπεξεργασία με υπέρηχους (Ultrasonic pretreatment).....	24
5.2.1.2.1.3. Φυγοκεντρική λείανση (Centrifugal grinding).....	25
5.2.1.2.1.4. Προεπεξεργασία με εξώθηση (Extrusion pretreatment).....	25
5.2.1.2.2. Χημική προεπεξεργασία.....	25
5.2.1.2.2.1. Προεπεξεργασία με αραιό οξύ (Dilute-acid pretreatment).....	25
5.2.1.2.2.2. Όξινη προεπεξεργασία με ακετόνη (Acid-acetone pretreatment).....	25
5.2.1.2.2.3. Προεπεξεργασία με χρήση ιοντικών υγρών (Pretreatment using ionic liquids).....	25
5.2.1.2.2.4. Προεπεξεργασία με αλκαλικό υπερμαγγανικό κάλιο (Alkaline potassium permanganate pretreatment).....	26
5.2.1.2.2.5. Προεπεξεργασία με οργανικό διαλύτη (Organosolv pretreatment).....	26
5.2.1.2.2.6. Προεπεξεργασία με χρήση μεταλλικών χλωριδίων (Pretreatment using metal chlorides).....	26
5.2.1.2.2.7. Προεπεξεργασία με πλάσμα (plasma pretreatment).....	26

5.2.1.2.3.	Φυσικοχημική προεπεξεργασία	26
5.2.1.2.3.1.	Έκρηξη ατμού (Steam explosion)	26
5.2.1.2.3.2.	Προεπεξεργασία με ζεστό νερό (Hot water pretreatment)	26
5.2.1.2.3.3.	Υγρή οξείδωση (Wet oxidation)	27
5.2.1.2.3.4.	Ammonia fiber expansion (AFEX)	27
5.2.1.2.3.5.	Έκρηξη υπερκρίσιμου διοξειδίου του άνθρακα (Super critical CO ₂ explosion)	27
5.2.1.2.3.6.	Προεπεξεργασία με υδροξυλικές ρίζες ενσωματωμένη σε προεπεξεργασμένο νερό (intergrated hydroxyl radicals and hot water pretreatment- IMRWT)	27
5.2.1.2.4.	Βιολογική προεπεξεργασία	27
5.2.1.2.4.1.	Μικροβιακή κοινότητα (Microbial consortium).....	28
5.2.1.2.4.2.	Προεπεξεργασία με χρήση μυκήτων (Pre-treatment using fungal species)	28
5.2.1.2.4.3.	Ενζυμική προεπεξεργασία (Enzymatic pre-treatment)	28
5.2.1.2.5.	Άλλες σχετικές μέθοδοι προεπεξεργασίας	28
5.2.1.2.5.1.	Προεπεξεργασία με θερμική διαστολή (Thermal expansion pretreatment)	28
	28
5.2.1.2.5.2.	Προεπεξεργασία με μικροκύματα (Microwave pretreatment).....	29
5.3.	Σχηματισμός παρεμποδιστών	30
5.4.	Μύκητες που συμμετέχουν στην προεπεξεργασία λιγνοκυτταρινούχου βιομάζας	30
6.	Μηχανισμοί αποδόμησης λιγνοκυτταρινούχου βιομάζας	32
6.1.	Βιοαποδόμηση λιγνίνης	32
6.2.	Υδρόλυση κυτταρίνης και ημικυτταρίνης.....	34
6.2.1.	Αποδόμηση κυτταρίνης	34
6.2.1.1.	Εξωκυτταρικές κυτταρινάσες	34
6.2.1.1.1.	Ενδοκυτταρινάσες	34
6.2.1.1.2.	Εξωκυτταρινάσες	35
6.2.1.1.3.	B-γλυκοζιδάση	36
6.3.	Μοριακή δομή κυτταρινασών	36
6.3.1.	Αποδόμηση ημικυτταρινασών	36
6.3.1.1.	Ημικυτταρινάσες σε μύκητες	36
6.4.	Εμπόδια στην υδρόλυση λιγνοκυτταρινούχου βιομάζας	37
7.	Μέθοδος προεπεξεργασίας στερεής κατάστασης με μύκητες	37
7.1.	Εμβόλιο	37
7.2.	Περιεχόμενη υγρασία	38
7.3.	Μέγεθος σωματιδίων στερεού υποστρώματος	38
7.4.	Πρόσθετα	38
7.5.	Θερμοκρασία	38
7.6.	Αερισμός	39
7.7.	Αποστείρωση της πρώτης ύλης	39
7.8.	Χρόνος επεξεργασίας	39
8.	Σκοπός	40
	<u>Πειραματικό Μέρος</u>	41
1.	Υλικά	41
1.1.	Χημικά αντιδραστήρια	41
1.2.	Υποστρώματα	41

1.3. Πρότυπες ουσίες- πρότυπα διαλύματα	42
1.4. Θρεπτικά μέσα	42
1.5. Ρυθμιστικά διαλύματα	42
2. Συσκευές – Όργανα	43
3. Πειραματικές Μέθοδοι	44
3.1. Προετοιμασία σωλήνων καλλιέργειας	44
3.2. Βιολογική προεπεξεργασία	44
3.2.1. Ανάπτυξη του μύκητα <i>G.resinaceum</i>	44
3.2.2. Καλλιέργεια του μύκητα <i>G.resinaceum</i> σε υπόστρωμα ιτιάς	44
3.3. Παρασκευή ενζυμικού διαλύματος	45
3.4. Μετρήσεις ανάπτυξης βιομάζας του μύκητα <i>G.resinaceum</i>	45
3.5. Μέτρηση ολικών πρωτεϊνών καλλιέργειας	46
3.6. Μετρήσεις ενζυμικής ενεργότητας	47
3.6.1. Λακκάση	47
3.6.2. Υπεροξειδάσες εξαρτημένες και ανεξάρτητες του μαγγανίου	47
3.6.3. Κυτταρινάσες	48
3.6.4. β-γλυκοζιδάση	48
3.6.5. β-ξυλοζιδάση	49
4. Διάγραμμα ροής πειραματικής διαδικασίας	51
<u>Αποτελέσματα – Συμπεράσματα</u>	52
1. Σωλήνες καλλιέργειας	52
2. Αποτελέσματα των μετρήσεων ανάπτυξης βιομάζας και ολικών πρωτεϊνών	53
3. Αποτελέσματα ενεργότητας ενζύμων αποδόμησης λιγνοκυτταρινούχου βιομάζας	57
3.1. Ένζυμα αποδόμησης λιγνίνης	57
3.2. Ένζυμα αποδόμησης κυτταρίνης και ημικυτταρίνης	62
<u>Συζήτηση αποτελεσμάτων και μελλοντικές προοπτικές</u>	68
<u>ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ 1</u>	71
1. Πρότυπη καμπύλη βαθμονόμησης γλυκοζαμίνης	71
2. Πρότυπη καμπύλη βαθμονόμησης γλυκόζης με η μέθοδο DNS	72
3. Πρότυπη καμπύλη βαθμονόμησης γλυκόζης με εμπορικό διαγνωστικό σκεύασμα (glucotest) 73	73
4. Πρότυπη καμπύλη βαθμονόμησης παρανιτροφαινόλης (pNP)	74
5. Πρότυπη καμπύλη βαθμονόμησης για το πρότυπο πρωτεϊνικό διάλυμα BSA	75
<u>ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ 2</u>	77
1. Μετρήσεις βιομάζας	77
2. Μετρήσεις ολικών πρωτεϊνών	78
3. Μετρήσεις ενζυμικής ενεργότητας λακκάσης	79
4. Μετρήσεις ενζυμικής ενεργότητας υπεροξειδάσης εξαρτημένης του μαγγανίου	87
5. Μετρήσεις ενζυμικής ενεργότητας υπεροξειδάσης ανεξάρτητης του μαγγανίου	92
6. Μετρήσεις ενζυμικής ενεργότητας β-γλυκοζιδάσης	97
7. Μετρήσεις ενζυμικής ενεργότητας β-ξυλοζιδάσης	98
8. Μετρήσεις ενζυμικής ενεργότητας κυτταρινασών	99
<u>Βιβλιογραφία</u>	101

Περίληψη

Τα βιοκαύσιμα προωθούνται σε παγκόσμια κλίμακα ως μέσο για την επίτευξη της ενεργειακής ασφάλειας και τη μείωση των εκπομπών αερίων του θερμοκηπίου (**Nanda et al., 2015**). Η λιγνοκυτταρινούχος βιομάζα χρησιμοποιείται ως πηγή παραγωγής υψηλής αξίας προϊόντων σε βιομηχανική κλίμακα με πολλά υποσχόμενο τρόπο (**Krzyzaniaka et al., 2014**). Τα βιοκαύσιμα που παράγονται από λιγνοκυτταρινούχου βιομάζα υποστηρίζονται μαζικά σε όλο τον κόσμο για την επίτευξη πολλαπλών στόχων, όπως η άμβλυση της αλλαγής του κλίματος, η ενεργειακή ασφάλεια και η ανάπτυξη της οικονομίας. Οι επιπτώσεις από τη χρήση των καλλιιεργειών (τροφίμων) για τα καύσιμα ωστόσο θεωρείται ότι είναι μια σημαντική απειλή για την παγκόσμια επισιτιστική ασφάλεια και τον ανταγωνισμό για την καλλιεργήσιμη γη. Αντιθέτως, η λιγνοκυτταρινούχος βιομάζα με τη μορφή αποβλήτων από συστήματα γεωργίας, δασοκομίας και των ενεργειακών καλλιεργειών, είναι γεωγραφικά άφθονη σε όλο τον κόσμο και έχει τη δυνατότητα να στηρίξει την αιεφόρο παραγωγή υγρών καυσίμων μεταφορών (**Nanda et al., 2015**). Η παραγωγή βιοκαυσίμων από λιγνοκυτταρινούχο βιομάζα ακολουθεί μια διαδικασία που υπαγορεύει την αποικοδόμηση της σε τρία στάδια: το στάδιο της προεπεξεργασίας που περιλαμβάνει την διάσπαση του φράγματος της λινίνης, κάνοντας πιο εύκολη την προσβασιμότητα στην κυτταρίνη και ημικυτταρίνη, το στάδιο της υδρόλυσης των πολυσακχαριτών: κυτταρίνης και ημικυτταρίνης προς ζυμώσιμα σάκχαρα και, τέλος, το στάδιο της ζύμωσης των σακχάρων προς παραγωγή βιοκαυσίμων.

Η παρούσα διπλωματική εργασία πραγματοποιήθηκε στα πλαίσια έρευνας για την αποδόμηση λιγνοκυτταρινούχου βιομάζας που προέρχεται από ξυλώδη υλικό (ιτιά), κοκκομετρίας 710 μ m, μέσω βιολογικής προκατεργασίας της βιομάζας από τον λευκής σήψης μύκητα *Ganoderma resinaceum*. Πιο συγκεκριμένα, επικεντρώνεται στο στάδιο της βιολογικής προεπεξεργασίας και μελετά την ενεργότητα των ενζύμων όπως: λακκάσης, υπεροξειδάσης, ανεξάρτητης και εξαρτημένης της λινίνης, που παράγονται από τους μύκητες, για την αποδόμηση του φράγματος της λινίνης και ενζύμων όπως η β -ξυλοζιδάση, η β -γλυκοζιδάση και οι κυτταρινάσες, που ευθύνονται για την υδρόλυση ημικυτταρίνης και κυτταρίνης της ιτιάς.

Η πειραματική διαδικασία πραγματοποιήθηκε σε συνθήκες καλλιέργειας $T=39^{\circ}\text{C}$, και εύρος pH 4-5. Επιπλέον μετρήθηκε παράλληλα η ανάπτυξη της βιομάζας των μυκήτων (μέτρηση γλυκοζαμίνης) και οι ολικές πρωτεΐνες ανά γραμμάριο ξηρής βάσης υποστρώματος που χρησιμοποιήθηκε στην καλλιέργεια. Οι μετρήσεις πραγματοποιήθηκαν στις 4, 8, 12, 16, 20, 24 και 28 μέρες καλλιέργειας και τα δείγματα προέκυψαν από εκχύλισμα της καλλιέργειας τις αντίστοιχες μέρες. Τα αποτελέσματα που προέκυψαν υποδεικνύουν την ολοκλήρωση σχεδόν ενός κύκλου ανάπτυξης του μύκητα στη διάρκεια των 28 ημερών, κατά τον οποίο μέγιστο περιεχόμενο πρωτεϊνών επιτεύχθηκε κατά τη μεταβατική φάση από την λανθάνουσα στην εκθετική κατάσταση ανάπτυξης, όταν δηλαδή ο μύκητας ολοκλήρωσε τον απαραίτητο για τον μεταβολισμό του ενζυμικό κύκλο. Μεγαλύτερη ενεργότητα ανά μονάδα μάζας ξηρού υποστρώματος και εμβολίου παρουσίασαν τα λιγνολυτικά ένζυμα, έναντι της σχεδόν μηδενικής ενεργότητας της ημικυτταρινάσης, β -ξυλοζιδάσης και της μηδενικής ενεργότητας των κυτταρινασών. Όμοια συμπεριφορά εμφανίστηκε ως προς την ειδική ενεργότητα των ενζύμων (ενεργότητα ενζύμων ανά μονάδα μάζας ολικών πρωτεϊνών). Από τα λιγνολυτικά ένζυμα, η λακκάση είχε μεγαλύτερη ενεργότητα ανά μονάδα μάζας ξηρού υποστρώματος και εμβολίου (762U/g inoculum, 5.34U/g ξ.β. ιτιάς, 762U/gprotein), δεύτερες έρχονται οι υπεροξειδάσες που είναι ανεξάρτητες του μαγγανίου (499U/g inoculum, 4.22U/g ξ.β. ιτιάς, 499U/g protein) και τη μικρότερη ενεργότητα παρουσίασαν οι υπεροξειδάσες που είναι εξαρτημένες του μαγγανίου (2.59U/g inoculum, 0.219U/g ξ.β. ιτιάς, 2.17U/gprotein). Όμοια συμπεριφορά εμφανίστηκε ως προς την ειδική ενεργότητα των ενζύμων (ενεργότητα ενζύμων ανά μονάδα μάζας ολικών πρωτεϊνών). Τέλος, αξίζει να σημειωθεί ότι οι μέγιστες τιμές ενεργότητας και ειδικής ενεργότητας των λιγνολυτικών ενζύμων

εμφανίστηκαν στην εκθετική φάση ανάπτυξης (16^η ημέρα για την λακκάση και 20^η ημέρα για τις υπεροξειδάσες), ενώ οι έστω αντίστοιχες τιμές ενεργότητας της β-ξυλοζιδάσης εμφανίζονται στη μεταβατική φάση (12^η ημέρα), μεταξύ λανθάνουσας και εκθετικής ανάπτυξης, γεγονός που υποδεικνύει ότι η ημικυτταρινάση διαπέρασε το φράγμα λιγνίνης πριν από τη μέγιστη απολιγνίνωση της βιομάζας.

Abstract

Biofuels have been recognized as a potential solution for energy security and reduction of greenhouse gas emissions (Nanda et al., 2015). Biofuels derived from lignocellulosic biomass is a promising technology for a low-cost large-scale process, which provides high added-value products (Krzyzaniaka et al., 2014). They are promoted at a global scale as a key factor in achieving multiple strategy objectives such as reduction of global climate change, energy security and development of the rural economy. However, some of the most crucial problems with using agricultural resources as a lignocellulosic feedstock is that they compete with world food resources, have a negative impact on food security and require land use changes. On the other hand, biofuels derived from lignocellulosic agricultural residues, forest residues and from energy crop systems are geographically abundant at a global scale and they provide sustainable production of liquid transport fuels. The production of biofuels from lignocellulosic biomass is a three-stage-degradation process: 1) delignification of biomass, which affects hemicellulose and cellulose accessibility in a profitable way, 2) saccharification of hemicellulose and cellulose and 3) fermentation of the produced sugars to biofuel.

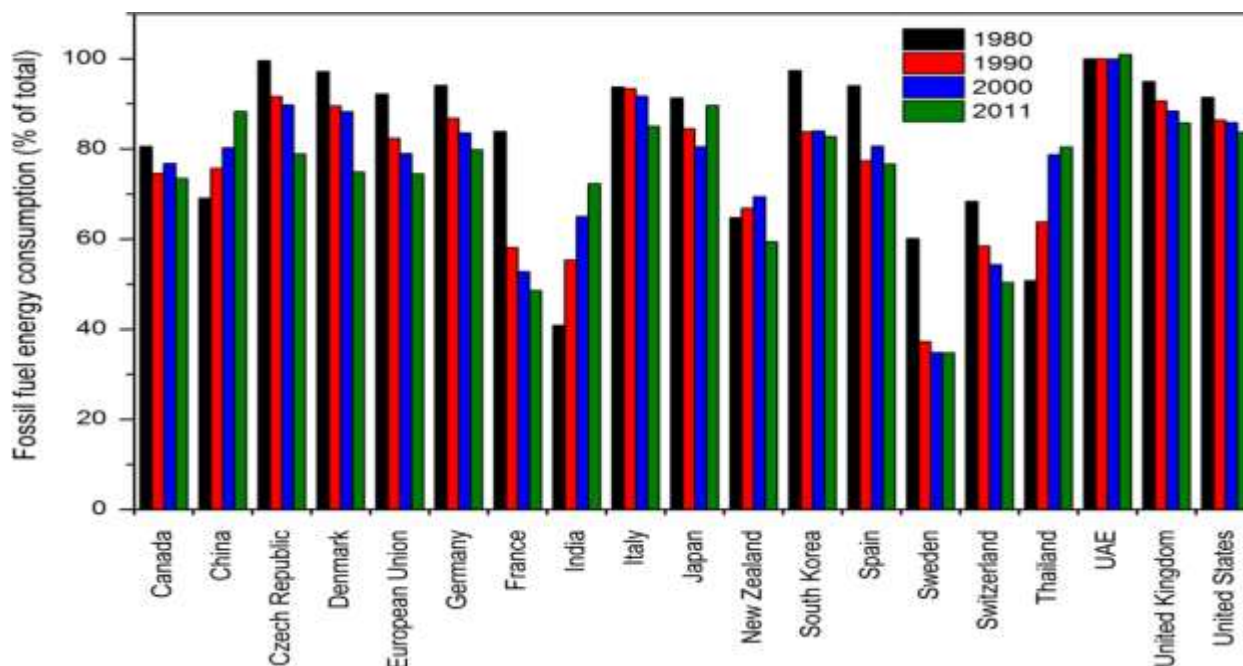
The present diploma thesis is concerned with the fungal pretreatment of willow feedstock (710 μm particle size) with *Ganoderma resinaceum* by a solid-state cultivation (SSC) process. Particularly, it focuses on the determination of the activity and the special activity of ligninolytic enzymes: laccase, manganese peroxidase (MnP), manganese-independent peroxidase (MnIP) and of enzymes that hydrolyse hemicelluloses and cellulose, such as β -xylosidase, β -glucosidase and cellulases. In addition, glucosamine measurement was used as an indirect method to estimate the biomass produced by *G. resinaceum* and Bradford's method was used to determine the amount of proteins produced during the 28-days-solid state cultivation. Samples were taken on cultivation days 4, 8, 12, 16, 20, 24 and 28. The maximum amount of proteins was obtained before the exponential phase, which confirms synthesis of the necessary proteins in the lag phase. Concerning enzymatic activities, ligninolytic enzymes exhibited high activities and specific activities, in contrast with β -xylosidase and cellulases, which exhibited low activities. The specific activities for laccase were (762U/g inoculum, 5.34U/g d.b. willow, 762U/g protein), for MnIP (499U/g inoculum, 4.22U/g d.b. willow, 499U/g protein) and finally for MnP (2.59U/g inoculum, 0.219U/g d.b. willow, 2.17U/g protein).

In conclusion, the most important enzyme activity during fungal pretreatment turned out to be laccase. In addition, it was observed that β -xylosidase had high activity, before the lignin decay was maximum, which indicates that partial removal of lignin doesn't affect the accessibility of the substrate by hemicellulases in a negative way.

Θεωρητικό Μέρος

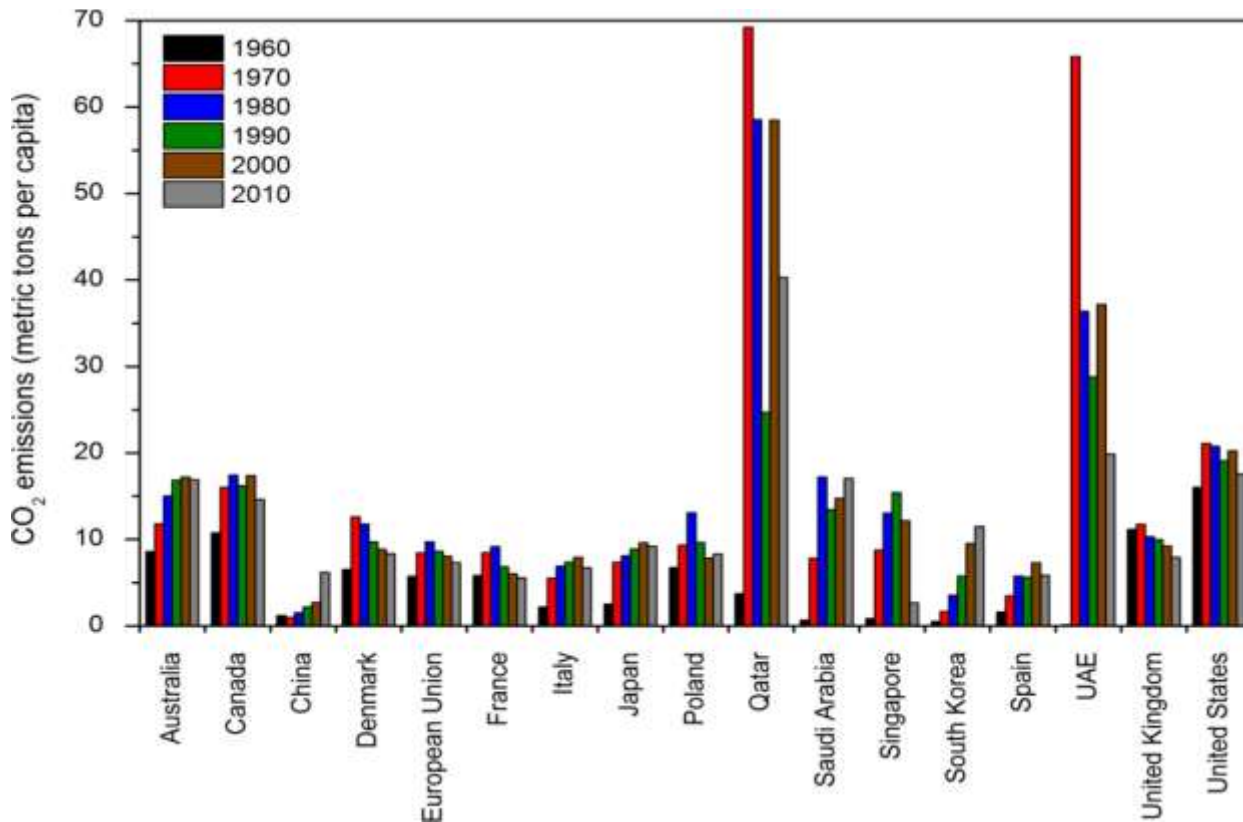
1. Ενεργειακό ζήτημα και βιοκαύσιμα δεύτερης γενιάς

Η παγκόσμια κατανάλωση ενέργειας, η οποία προέρχεται από ορυκτά καύσιμα, όλο και αυξάνεται. Τα ορυκτά καύσιμα είναι ακόμα, η κύρια πρώτη ύλη που χρησιμοποιείται από τη χημική βιομηχανία. Η συνεχής αύξηση της κατανάλωσής τους σε συνδυασμό με την εξάντληση των πηγών, τα καθιστούν όλο και πιο ακριβά (Krzyzaniaka et al., 2014). Στην εικόνα 1 που ακολουθεί παρουσιάζονται στοιχεία κατανάλωσης ορυκτού καυσίμου σε διάφορες χώρες τις τελευταίες δεκαετίες.



Εικόνα 1 : Κατανάλωση ορυκτών καυσίμων το διάστημα 1980-2011 (Nanda et al., 2015)

Η παραγωγή βιοκαυσίμων προτείνεται ως μια βιώσιμη λύση που μπορεί να υποκαταστήσει τα ορυκτά καύσιμα που εξαντλούνται, καθώς και να λύσει το πρόβλημα των συνεχώς αυξανόμενων τιμών των καυσίμων (Nanda et al., 2015). Επιπλέον, οι εκπομπές των αερίων του θερμοκηπίου, που προκύπτουν από την παραγωγή και τη χρήση των ορυκτών καυσίμων, ιδίως του διοξειδίου του άνθρακα, είναι ευθέως ανάλογες με την κατανάλωση των ορυκτών καυσίμων (εικόνα 2) (Nanda et al., 2015).



Εικόνα 2: Εκπομπές CO₂ από το 1960-2010 (Nanda et al., 2015).

Μεγάλο μέρος αυτής της εκπομπής CO₂ οφείλεται στην καύση ορυκτών καυσίμων για την παραγωγή ηλεκτρικής ενέργειας και ισχύος των οχημάτων. Συνοπτικά, οι βασικοί παράγοντες που προμηνύουν λοιπόν την αναγκαιότητα των ανανεώσιμων πηγών ενέργειας είναι οι εξής (Nanda et al., 2015):

- Αύξηση της ενεργειακής ζήτησης,
- Η εξάντληση των πόρων ορυκτών καυσίμων,
- Η αύξηση των τιμών των καυσίμων,
- Η εγχώρια ενεργειακή ασφάλεια,
- Η αύξηση των εκπομπών αερίων του θερμοκηπίου
- Η υπερθέρμανση του πλανήτη

Διεθνείς φορείς, που ασχολούνται με την προώθηση της γεωργικής και περιβαλλοντικής αειφορίας, στρέφουν το ενδιαφέρον τους στα βιοκαύσιμα. Επιπλέον πολιτικοί φορείς επενδύουν τις προσπάθειές τους για την αξιοποίηση τεχνολογιών παραγωγής βιοκαυσίμων ως πιθανή σημαντική συμβολή προς την κοινωνικοοικονομική ανάπτυξη των αγροτικών κοινοτήτων και ως ένα μέσο για τη μείωση της φτώχειας με τη δημιουργία τοπικής απασχόλησης και εισοδήματος (Nanda et al., 2015). Έτσι το παγκόσμιο ενδιαφέρον εστιάζει στη χρήση ανανεώσιμων πηγών, που θα αντικαταστήσουν τα μη ανανεώσιμα προϊόντα της χημικής και ενεργειακής βιομηχανίας. (Krzyzaniaka et al., 2014). Παρόλα αυτά, οι περισσότερες εναλλακτικές πηγές ενέργειας, όπως η αιολική, η ηλιακή, η γεωθερμική και η πυρηνική παράγουν ηλεκτρική ενέργεια και ισχύ, αλλά δεν μπορεί να χρησιμοποιηθεί ως καύσιμη ύλη. Αντιθέτως, η λιγνοκυταρινούχος βιομάζα είναι πλούσια σε οργανικό φορτίο, το οποίο μπορεί να μετατραπεί σε καύσιμο υδρογονανθράκων (Nanda et al., 2015).

Υπάρχουν έντονες ερευνητικές πρωτοβουλίες που στοχεύουν στην ανάπτυξη εναλλακτικών ανανεώσιμων και ενδεχομένως με ουδέτερο ενεργειακό αποτύπωμα, υγρών και αέριων βιοκαυσίμων. Ωστόσο, εναλλακτικές πηγές ενέργειας όπως τα βιοκαύσιμα πρώτης γενιάς που προέρχονται από γεωργικά προϊόντα, όπως το ζαχαροκάλαμο, τα ζαχαρότευτλα, το καλαμπόκι και η ελαιοκράμβη, ανταγωνίζονται τα παγκόσμια αποθέματα τροφίμων, ενώ επιπλέον συμβάλλουν στη λειψυδρία και στην καταστροφή των δασών. Η δεύτερη γενιά βιοκαυσίμων που προέρχεται από λιγνοκυτταρινούχα υλικά αγροτικών και δασικών υπολειμάτων και μη εδώδιμων προϊόντων τροφίμων, θέτει ως ανασταλτικό παράγοντα την εκμετάλλευση τεράστιων εκτάσεων γης, που θα μπορούσαν να χρησιμοποιηθούν για την παραγωγή τροφίμων (Χριστακόπουλος και Τόπακας, 2013).

Μια βελτιωμένη διαχείριση της διαθεσιμότητας των λιγνοκυτταρινούχων πρώτων υλών, των τεχνολογικών εξελίξεων για τη μετατροπή τους σε καύσιμα, σε συνδυασμό με την ανάλυση του κύκλου ζωής, απαιτείται για να δυναμώσει το εγχείρημα της λειτουργίας βιοδιυλιστηρίων. Οι γεωπολιτικές ανησυχίες γύρω από τα βιοκαύσιμα πρώτης γενιάς, που αφορούν στις υψηλές τιμές των τροφίμων και στην αλλαγή χρήσης της γης, προωθούν την παραγωγή βιοκαυσίμων δεύτερης γενιάς για τον σύγχρονο τομέα των ανανεώσιμων πηγών στον τομέα των μεταφορών. Η ανάλυση κύκλου ζωής παίζει έναν κρίσιμο ρόλο, προκειμένου να αναγνωριστούν οι σχετικοί κίνδυνοι και οι ευκαιρίες που συνδέονται με τη διαδικασία βιοδιύλισης. Εξετάζει μια συγκεκριμένη τεχνολογία παραγωγής βιοκαυσίμων και τεχνοοικονομικά θέματα που εμπλέκονται στην παραγωγή βιομάζας, στη μετατροπή, στην κατανάλωση καυσίμων και στη χρήση παραπροϊόντων. Επιπλέον, η μελέτη εκτίμησης κόστους και περιβαλλοντικών επιπτώσεων της παραγωγής βιοκαυσίμων διερευνά τις αλλαγές που μπορεί να προκληθούν σε θέματα όπως το πόσιμο νερό, τις αλλαγές χρήσης γης και τις εκπομπές αερίων του θερμοκηπίου (Nanda et al., 2015).

2. Προϊόντα υψηλής προστιθέμενης αξίας από λιγνοκυτταρινούχα υπολείμματα

Η βιομετατροπή λιγνοκυτταρινούχων υπολειμάτων σε χρήσιμα και υψηλής αξίας προϊόντα απαιτεί μια διαδικασία πολλών σταδίων, που παρουσιάζεται συνοπτικά παρακάτω (Sánchez, 2009):

- Προεπεξεργασία λιγνοκυτταρινούχου βιομάζας (μηχανική, φυσική, χημική, ή βιολογική)
- Υδρόλυση των πολυμερών σακχάρων προκειμένου να παραχθούν μονάδες ζυμώσιμων σακχάρων πιο εύκολα μεταβολίσιμες (π.χ. εξόζες ή πεντόζες)
- Χρήση αυτών των μονάδων σακχάρων είτε για την υποστήριξη μικροβιακής ανάπτυξης είτε για την παραγωγή χημικών προϊόντων
- Διαχωρισμός και καθαρισμός προϊόντος

Τα προϊόντα που παράγονται μέσω της διαδικασίας αυτής, καθώς και ο τρόπος παραγωγής των παρουσιάζεται παρακάτω.

2.1. Αναγωγικά σάκχαρα

Τα ζυμώσιμα σάκχαρα όπως η γλυκόζη, η ξυλόζη, η ξυλιτόλη, η κελλοβιόζη, η αραβινόζη, η πεντόζη και η γαλακτόζη είναι τα βασικά αναγωγικά σάκχαρα τα οποία παράγονται μέσω της διαδικασίας που αναφέρθηκε παραπάνω (Godliving and Mtui, 2009).

2.2. Ένζυμα

Λιγνοκυτταρινικά ένζυμα, κυρίως από μύκητες και βακτήρια. Είναι σημαντικά εμπορικά προϊόντα που παράγονται από βιοεπεξεργασία λιγνοκυτταρινούχων αποβλήτων και χρησιμοποιούνται σε πολλές βιομηχανικές εφαρμογές συμπεριλαμβανομένων την παραγωγή χημικών, καυσίμων, τροφίμων, ζύθου και

κρασιού, ζωοτροφών, μονάδων κλωστοϋφαντουργείας, χαρτοπολτού και χαρτιού καθώς και σε γεωργικές μονάδες (**Godliving and Mtui, 2009**).

2.3. Βιοκαύσιμα

Βιοαιθανόλη

Σε παγκόσμια κλίμακα, υπάρχει αυξημένο ενδιαφέρον για την αύξηση των τιμών των ορυκτών καυσίμων, την ασφάλεια στην παροχή πετρελαίου και τις αρνητικές επιπτώσεις του σε περιβαλλοντικό επίπεδο. Η μετατροπή αποβλήτων λιγνοκυτταρινούχου βιομάζας σε βιοκαύσιμα προσφέρει μια οικονομικά εφικτή εναλλακτική τεχνολογία, η οποία δεν έχει προβλήματα ανταγωνισμού με την παραγωγή των τροφίμων, όπως συμβαίνει με τις τεχνολογίες δεύτερης γενιάς βιοκαυσίμων. Για τον λόγο αυτό μεγάλο είναι το ερευνητικό ενδιαφέρον για τις τεχνολογίες σακχαροποίησης και ζύμωσης που απαιτούνται για την μετατροπή την λιγνοκυτταρινικής βάσης σε αναγωγικά σάκχαρα και στη συνέχεια σε βιοαιθανόλη (**Godliving and Mtui, 2009**).

Υδρογόνο

Το υδρογόνο θεωρείται το καύσιμο του μέλλοντος, καθώς δεν περιέχει άνθρακα και οξειδώνεται σε μόριο νερού σε μια αντίδραση καύσης. Ενώ η συμβατική καύση ή η κομποστοποίηση δείχνουν οικονομικά μη ωφέλιμες διαδικασίες, υπάρχουν βακτήρια όπως *Enterobacter aerogenes* και *Clostridium* sp τα οποία μπορούν να μετατρέψουν τη λιγνοκυτταρινούχο βιομάζα σε βιοϋδρογόνο (**Godliving and Mtui, 2009**).

Βιοαέριο

Η παραγωγή βιοαερίου από λιγνοκυτταρινούχα υλικά είναι μια αναερόβια διαδικασία. Το βιοαέριο που παράγεται περιέχει ως κύριο συστατικό το μεθάνιο, το οποίο προέρχεται κυρίως από την ημικυτταρίνη και την κυτταρίνη της πρώτης ύλης (**Godliving and Mtui, 2009**).

2.4. Οργανικά οξέα

Τα οργανικά οξέα είναι κάποια από τα προϊόντα που προκύπτουν μέσω διαδικασίας ζύμωσης λιγνοκυτταρινούχου βιομάζας. Τα πτητικά λιπαρά οξέα συμπεριλαμβανομένων των: οξικό οξύ, προπιονικό οξύ (propionic) και βουτυρικό οξύ, παράγονται από ένα ευρύ φάσμα λιγνοκυτταρινικών υπολειμμάτων όπως κελύφη δημητριακών, απόβλητα τροφίμων. Επιπλέον, το γαλακτικό οξύ παράγεται από υπολείμματα βγάσσης και ζυμώσιμα οικιακά απορρίμματα με τη χρήση του μύκητα *Lactobacillus*. Ακόμα η παραγωγή και η απομόνωση του μυρμηκικού οξέος, του λεβουλικού οξέος, του κιτρικού οξέος, του βαλερικού οξέος, του καπροϊκού οξέος και του βαλινικού οξέος επιτυγχάνονται από τη βιοεπεξεργασία λιγνοκυτταρινικών αποβλήτων. Γενικά, η παραγωγή των οργανικών οξέων απαιτεί αντιδραστήρες διαλείποντος ή συνεχούς έργου με χαρακτηριστικές συνθήκες 35°C pH=6 και υδραυλικό χρόνο παραμονής μεγαλύτερο των 8 ημερών (**Godliving and Mtui, 2009**).

2.5. Κομπόστ

Το κομπόστ, πλούσιο σε θρεπτικά οργανικό λίπασμα και βελτιωτικό εδάφους, είναι προϊόν χουμοποίησης οργανικής ύλης. Η διαδικασία δημιουργίας του περιλαμβάνει την συνύπαρξη ενός συνδυασμού βακτηρίων, μυκήτων και γαιοσκώληκων που μετατρέπουν και ενισχύουν τη λιγνοκυτταρινούχο ύλη σε υπόστρωμα ευνοϊκό σε χουμοποίηση. Η κομποστοποίηση είναι μια διαδικασία βιο-οξείδωσης και σταθεροποίησης της οργανικής ύλης. Συσχετίζεται με την κοινή δράση γαιοσκώληκων και μικροοργανισμών, που μετατρέπει το απόβλητο σε ένα πολύτιμο για το έδαφος προϊόν. Αποτελεί μια χαμηλού κόστους διεργασία για την μετατροπή λιγνοκυτταρινικών αγρωστωδών βιομηχανικών αποβλήτων σε υψηλής προστιθέμενης αξίας βιολογικά λιπάσματα (**Godliving and Mtui, 2009**).

2.6. Βιοσυνθετικά υλικά

Τα βιοαποδομήσιμα πολυμερή αποτελούν μια ομάδα πολυμερών που έχουν σχεδιαστεί για να αποικοδομούνται από αποικίες μικροοργανισμών. Μερικά γνωστά εμπορικά βιοαποδομήσιμα υλικά είναι τα: πολυκαπρολακτόνη, πολύ-γαλακτικό οξύ, πολυυδροξυαλκανοϊκά, πολύ-αιθυλενογλυκόλη, και αλειφατικοί πολυεστέρες, όπως (poly-butylenesuccinate) (PBS) και butylene succinate-co-butylene adipate). Τα βιοσυνθετικά υλικά είναι μια βιώσιμη τεχνολογία για την παραγωγή πράσινων υλικών (**Godliving and Mtui, 2009**).

2.7. Τρόφιμα και ζωτροφές

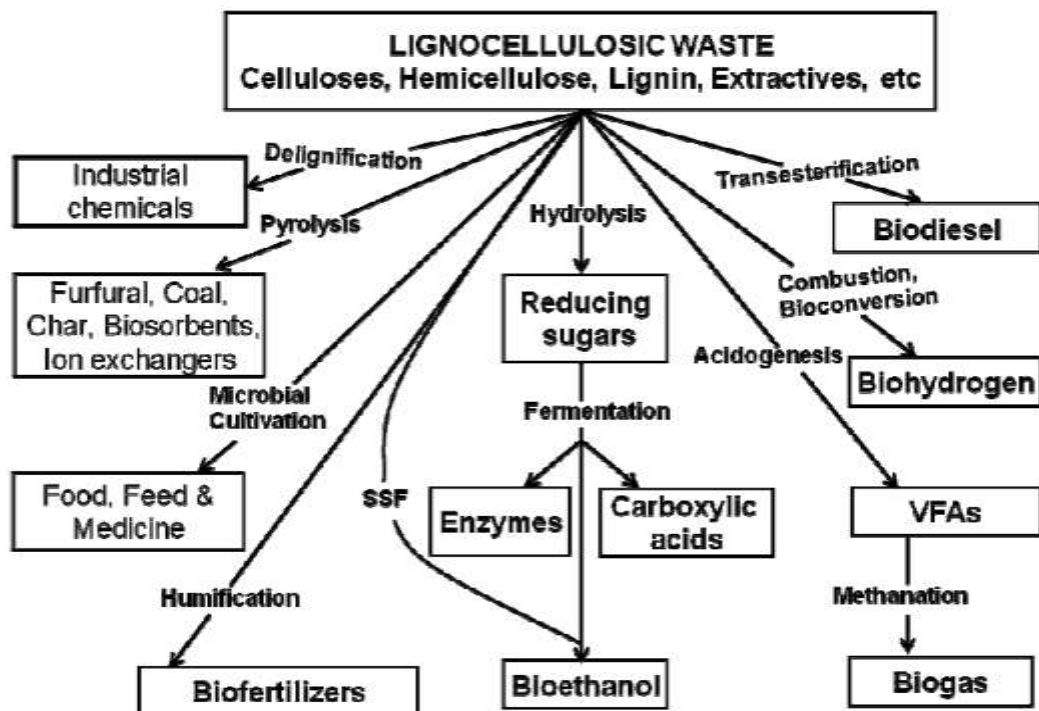
Η βιομετατροπή των λιγνοκυτταρινικών αγροτικών αποβλήτων μέσω της καλλιέργειας βασιδιομυκήτων και της παραγωγής πρωτεϊνών σε κύτταρα, προσφέρεται για την παραγωγή πλούσιων σε πρωτεΐνες τροφών καθώς και για την μείωση των επιπτώσεων των αποβλήτων αυτών στο περιβάλλον. Η καλλιέργεια μυκήτων αποτελεί μια οικονομικά αποδεκτή εναλλακτική τεχνολογία παραγωγής τροφίμων, ανώτερων γευστικά και ποιοτικά, τα οποία δεν χρειάζονται απομόνωση και καθαρισμό. Βιομάζα βασιδιομυκήτων πλούσια σε πρωτεΐνες και υδατάνθρακες επιτυγχάνεται, όταν χρησιμοποιούνται λιγνοκυτταρινικά απόβλητα ως υπόστρωμα. Επιπλέον, η διαδικασία παραγωγής κυτταρικών πρωτεϊνών από λιγνοκυτταρινούχο ύλη δίνει τη δυνατότητα μετατροπής χαμηλής ποιότητας βιομάζας σε βελτιωμένη ζωτροφή αλλά και ανθρώπινη τροφή. Τέλος, η τεχνολογία αυτή που κάνει χρήση αγροτικών και βιομηχανικών αποβλήτων μπορεί να μειώσει την τιμή του τελικού προϊόντος, λόγω του χαμηλού κόστους και της υψηλής διαθεσιμότητας της πρώτης ύλης (**Godliving and Mtui, 2009**).

2.8. Βιοπροσροφητικά

Τα προσροφητικά, που προέρχονται από υπολείμματα καλλιεργειών, είναι μια εφικτή εναλλακτική τεχνολογία για την αντικατάσταση των κοστοβόρων συμβατικών μεθόδων απομάκρυνσης ρύπων (ιόντα βαρέων μετάλλων, χρωστικές, αμμώνιο και νιτρικά άλατα) από το περιβάλλον. Η χρήση λιγνοκυτταρινούχων γεωργικών αποβλήτων αποτελεί μια χρηστική προσέγγιση εξαιτίας των ιδιοτήτων αυξημένης προσροφητικότητας, που έχουν ως αποτέλεσμα την δυνατότητα ανταλλαγής ιόντων. Αγρωστώδη υλικά όπως φλοιοί/κελύφη ρυζιού (rice husks/rice hulls), ζαχαροκάλαμο, βαγάση, απορρίμματα φρούτων/λαχανικών, φλοιοί δέντρων, απορρίμματα εσπεριδοειδών και άλλα, διαθέτουν ικανότητα απορρόφησης των Cd, Cu, Pb, Zn και Ni. Η τεχνολογία αυτή αποδίδει σε καλύτερη ποιότητα τελικού προϊόντος, βοηθά στη μείωση του κόστους της πρώτης ύλης και προωθεί μια φθηνή εναλλακτική λύση στις μέχρι τώρα εμπορικές μεθόδους. Η υδρόλυση της λιγνοκυτταρινούχου βιομάζας, ως μέθοδος προεπεξεργασίας με θειικό οξύ, ενισχύει τη διαδικασία της προσρόφησης, μέσω της απομάκρυνσης της ημικυτταρίνης (**Godliving and Mtui, 2009**).

2.9. Φάρμακα

Τα λιγνοκυτταριούχα απόβλητα παρέχουν το καλύτερο περιβάλλον ανάπτυξης βασιδιομυκήτων, οι οποίοι χρησιμοποιούνται ως πρώτη ύλη για νέα φαρμακευτικά προϊόντα. Συγκεκριμένα μύκητες όπως *Lentinula edodes*, *Tremella fuciformis* και *Ganoderma lucidum* περιέχουν βιοδραστικές ενώσεις, όπως αντιφλεγμονώδης, αντι-ιικούς και αντιβακτηριακούς πολυσακχαρίτες και πολυσακχαρίτες με δράση που αποτρέπει τη δημιουργία καρκινικών όγκων. Επιπλέον, διαθέτουν ουσίες με ανοσορρυθμιστικές ιδιότητες όπως και δραστικές ουσίες για μείωση της χοληστερόλης. Μελλοντικές προοπτικές για έρευνα τέτοιων μυκήτων σε υποστρώματα χαμηλού κόστους και με μεγάλη διαθεσιμότητα μπορεί να οδηγήσουν σε καινοτομίες στο πεδίο της αντιβακτηριακής, αντι-ιικής και αντικαρκινικής δράσης (**Godliving and Mtui, 2009**).



Εικόνα3:Χρήση λιγνοκυτταρινικών αποβλήτων για την παραγωγή προϊόντων προστιθέμενης αξίας (Godliving and Mtui, 2009).

3. Η ιτιά ως λιγνοκυτταρινούχος βιομάζα

Τα ξυλώδη υλικά ταξινομούνται σε δύο κατηγορίες: των μαλακών και των σκληρών ξυλώδων ειδών. Τα μαλακά ξυλώδη υλικά προέρχονται από κωνοφόρα δέντρα και γυμνόσπερμα και σε αντίθεση με τα σκληρά, έχουν μικρότερη πυκνότητα και αναπτύσσονται ταχύτερα. Το γυμνόσπερμα, περιλαμβάνει ως επί το πλείστον αιθαλή είδη δένδρων, όπως πεύκο, κέδρο, έλατο, κυπαρίσσι κ.α. Τα σκληρά ξυλώδη υλικά είναι αγγειοσπέρμων δέντρων και είναι κυρίως φυλλοβόλα. Βρίσκονται κυρίως στο βόρειο ημισφαίριο και περιλαμβάνουν δέντρα, όπως λεύκες, ιτιές, βελανιδιές και ξύλο από βαμβάκι (Limayem and Ricke, 2012). Στον παρακάτω πίνακα (πίνακας 1) παρουσιάζονται οι λιγνοκυτταρινικές συστάσεις της ξυλώδους βιομάζας σε σχέση με τις αγρωστώδεις πηγές βιομάζας.

Πίνακας 1: Λιγνοκυτταρινούχος σύσταση ξυλώδους και αγρωστώδους βιομάζας [Anwar,Z. et al., 2014].

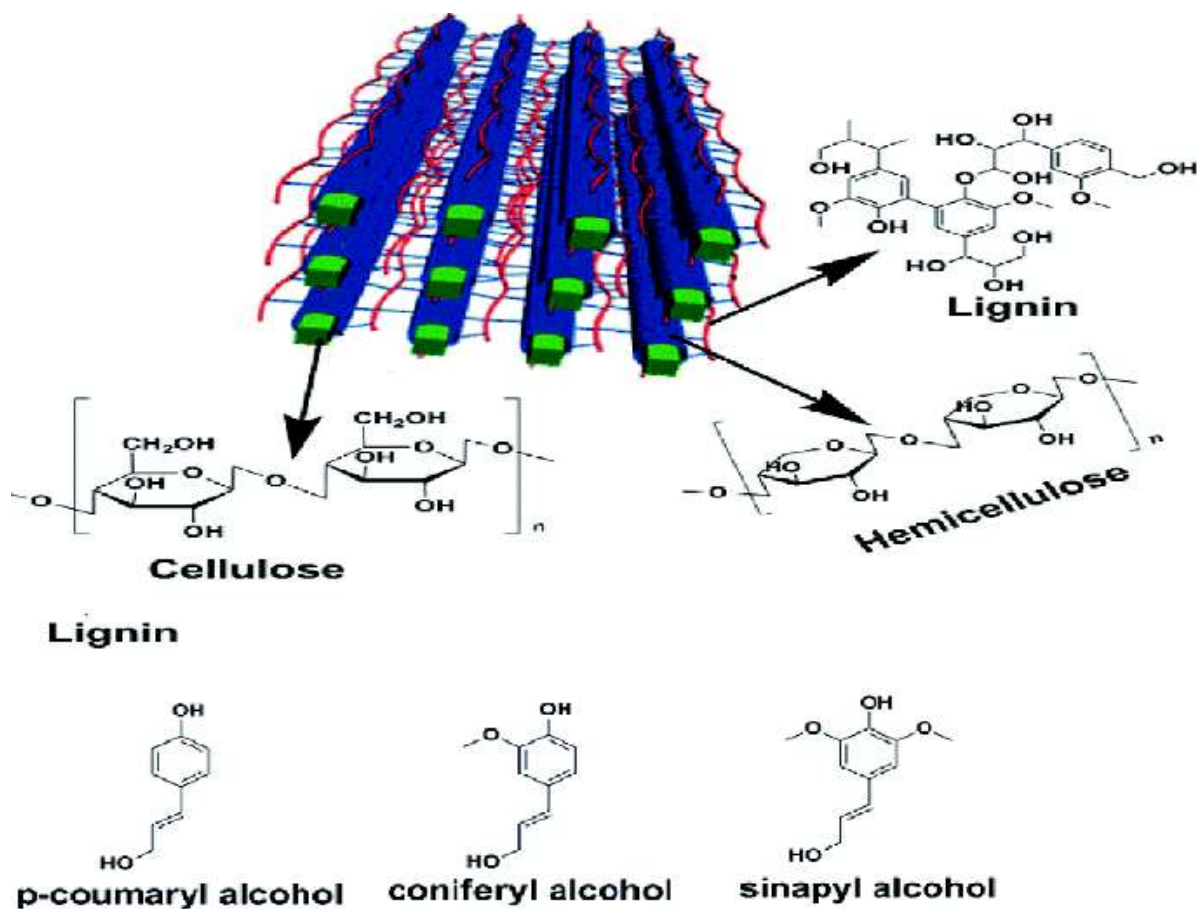
Λιγνοκυτταρινούχος πρώτη ύλη	(%) Λιγνίνη	(%) Ημικυτταρίνη	(%) Κυτταρίνη
Σκληρή ξυλώδης ύλη	18-25	24-40	40-45
Μαλακή ξυλώδης ύλη	25-35	25-35	45-50
Αγρωστώδη υλικά	13-30	25-50	25-40

Ένα ξυλώδες φυτό, το οποίο θεωρείται μια πολλά υποσχόμενη πηγή καυσίμου είναι η ιτιά. Η ιτιά αναπτύσσεται καλύτερα σε κρύες και υγρές περιοχές (κυρίως στο βόρειο Ημισφαίριο) ενώ μόνο λίγα είδη μεγαλώνουν στο Νότιο Ημισφαίριο. Η συγκομιδή της μπορεί να γίνει πάνω από έξι φορές στη διάρκεια 3-5 ετών, αφού η βιομάζα της αυξάνεται σε μικρό χρονικό διάστημα. Επίσης, η ιτιά μπορεί να αναπτυχθεί με ελάχιστα συμπληρώματα λιπασμάτων. Μετά τη συγκομιδή, η ιτιά μπορεί να αναβλαστάνει και η ενέργεια που λαμβάνεται από τη χρήση της μπορεί να είναι 20 φορές υψηλότερη από την ενέργεια που

χρησιμοποιείται για την ανάπτυξη της καλλιέργειας (**Rebello de Mira and Kroeze, 2006**). Ανάμεσα στα χαρακτηριστικά της ιτιάς είναι η ομοιόμορφη χημική σύνθεση και οι μικρές ποσότητες προσμείξεων και ανεπιθύμητων συστατικών που μπορεί να περιέχει (**Krzyzaniaka et al., 2014**). Επιπλέον, μπορεί να έχει υψηλές ετήσιες αποδόσεις και είναι κατάλληλη για καλλιέργεια σε χαμηλής ποιότητας έδαφος. Η γη που χρησιμοποιείται για να αναπτυχθούν οι πολυετείς καλλιέργειες δεν απαιτεί όργωμα κατά τη διάρκεια της καλλιέργειας (έως και 30 χρόνια για την ιτιά). Έτσι λοιπόν, μπορεί να λειτουργήσει ως δεξαμενή για άνθρακα κατά τη διάρκεια αυτής της περιόδου, βελτιώνοντας την ποιότητα του εδάφους με την αύξηση της περιεκτικότητάς του σε οργανική ύλη. Προς το παρόν, λίγη καλλιεργήσιμη γη είναι αφιερωμένη στην καλλιέργεια ιτιάς, ως ενεργειακή καλλιέργεια στην ΕΕ. Εφόσον η ζήτηση για τρόφιμα αναμένεται να παραμείνει περίπου σταθερή στην Ευρώπη τις επόμενες δεκαετίες, επιχειρούνται βελτιωμένες γεωργικές πρακτικές για καλλιέργειες, έτσι ώστε περισσότερη γη να είναι διαθέσιμη για άλλες χρήσεις, όπως για την καλλιέργεια ενεργειακών φυτών (**Stephenson et al., 2010**).

4. Φυσικοχημικά χαρακτηριστικά λιγνοκυτταρινούχου βιομάζας

Όλοι οι φυτικοί ιστοί αποτελούνται ως επί το πλείστον από τρεις βασικές μονάδες: κυτταρίνη, ημικυτταρίνη και λιγνίνη. Τα λιγνοκυτταρινούχα υλικά, συμπεριλαμβανομένων των αγροτικών αποβλήτων, των δασικών υπολειμμάτων, τα αγρωστώδη και τα ξυλώδη υλικά, έχουν μεγάλες δυνατότητες για παραγωγή βιοκαυσίμων. Η κυτταρίνη είναι ένα βασικό δομικό χαρακτηριστικό του κυτταρικού τοιχώματος, το οποίο είναι υπεύθυνο για τη μηχανική αντοχή, ενώ η ημικυτταρίνη είναι ένα πολυμερές με επαναλαμβανόμενες μονάδες πεντόζης και εξόζης. Η λιγνίνη περιέχει τρεις αρωματικές αλκοόλες, που σχηματίζουν ένα προστατευτικό μανδύα γύρω από την κυτταρίνη και την ημικυτταρίνη (**Godliving and Mtui, 2009**). Στην εικόνα 4 φαίνεται η τυπική δομή της λιγνοκυτταρίνης:



Εικόνα 4: Απεικόνιση της λιγνοκυτταρινικής δομής: κυτταρίνη, ημικυτταρίνη, λιγνίνη (Liu et al., 2015.).

Γενικά η σύσταση της λιγνοκυτταρίνης εξαρτάται κυρίως από το υλικό που προέρχεται. Στον πίνακα (πίνακας 2) που ακολουθεί περιέχονται κάποιες τυπικές χημικές συστάσεις λιγνίνης, κυτταρίνης και ημικυτταρίνης διαφόρων λιγνινοκυτταρινούχων πηγών.

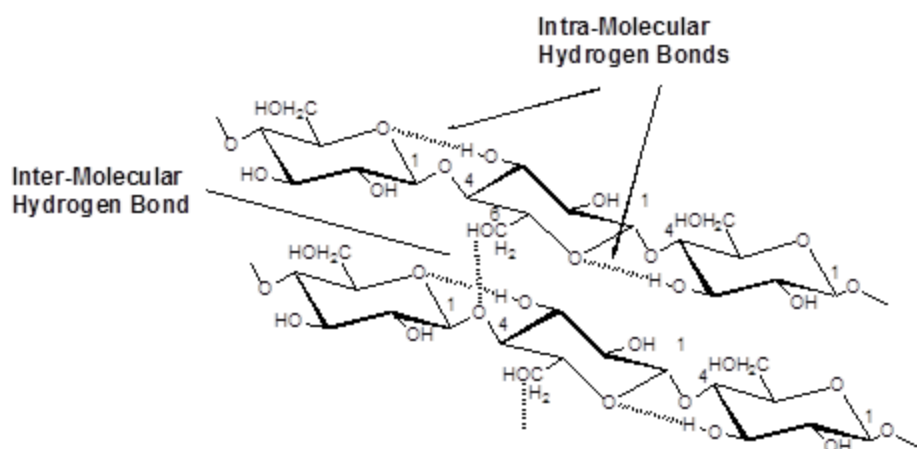
Πίνακας 2: Ποσοστιαία σύσταση λιγνινοκυτταρίνης σε διάφορα λιγνινοκυτταρινούχα υλικά [Anwar et al., 2014].

Λιγνοκυτταρινούχος πρώτη ύλη	(%) Λιγνίνη	(%) Ημικυτταρίνη	(%) Κυτταρίνη
Σκληρή ξυλώδης ύλη	18-25	24-40	40-45
Μαλακή ξυλώδης ύλη	25-35	25-35	45-50
Στάχυα καλαμποκιού	15	35	45
Κοτσάνια καλαμποκιού	19	26	38
Άχυρο ρυζιού	18	24	32,1
Κελύφη καρπών	30-40	25-30	25-30
Αγρωστώδη υλικά	13-30	25-50	25-40
Άχυρο σίτου	16-21	26-32	29-35
Βαγάση	23,33	16,52	54,87

4.1. Φυσικοχημικά και δομικά χαρακτηριστικά της κυτταρίνης

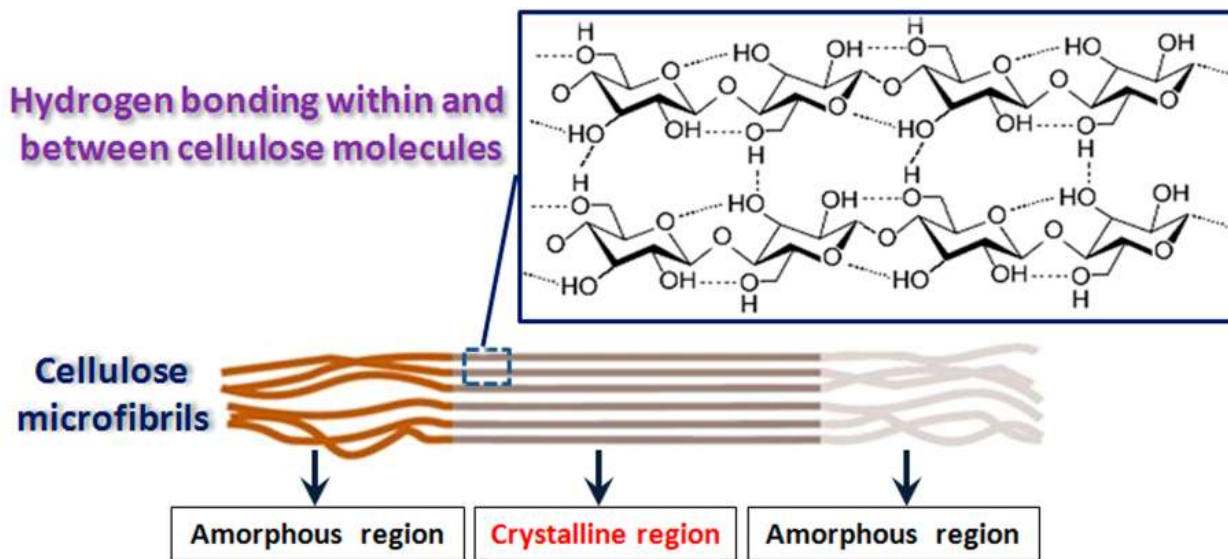
Η κυτταρίνη πήρε το όνομά της «cellulose» (cell=κύτταρο) από τον Anselme Payyer (19^{ος} αιώνας), ο οποίος την όρισε ως «τον πολυσακχαρίτη που αποτελούσε στοιχειώδη και ομοιόμορφο συστατικό όλων των φυτικών κυττάρων» (Χριστακόπουλος και Τόπακας, 2013). Αποτελείται από μονάδες D-γλυκόζης συνδεδεμένες με β-1,4-γλυκοζιτικό δεσμό, οι οποίες σχηματίζουν τη δομική μονάδα της αλυσίδας της κυτταρίνης, τον δυσασακχαρίτη κελλοβιόζη (εικόνα 4). Ο βαθμός πολυμερισμού της αλυσίδας της κυτταρίνης κυμαίνεται σε εύρος μονάδων γλυκόζης από 7000 έως 15000 (Χριστακόπουλος και Τόπακας, 2013).

Ο βασικός ρόλος της κυτταρίνης είναι να εξασφαλίζει την ακαμψία του κυτταρικού τοιχώματος, μέσω της οργάνωσης των πολυμερών μονάδων της σε μικροϊνίδια. Η κυτταρίνη αποτελείται από κρυσταλλικές (περίπου 70% κρυσταλλικότητα) και άμορφες, έντονα υγροσκοπικές περιοχές. Στις κρυσταλλικές της περιοχές δεσμοί υδρογόνου εγγυόνται την σύνδεση μορίων γλυκόζης στην ίδια αλλά και σε διαφορετικές αλυσίδες κυτταρίνης (εικόνα 5). Οι δεσμοί υδρογόνου τοποθετούν τις κυτταρινικές αλυσίδες σε παράλληλη διάταξη, προκαλώντας με αυτόν τον τρόπο δεσμούς υδρογόνου μεταξύ των παράλληλων επιπέδων κυτταρίνης, σχηματίζοντας έτσι συμπαγείς, κρυσταλλικές δομές (Χριστακόπουλος και Τόπακας, 2013).



Εικόνα 5: Απεικόνιση υδρογονικών δεσμών μεταξύ μορίων γλυκόζης της ίδιας αλυσίδας κυτταρίνης-Intra-Molecular Hydrogen Bond (O3-H → O5' και O6 → H-O2') και μεταξύ μορίων γλυκόζης που ανήκουν σε διαφορετικές αλυσίδες-Inter-Molecular Hydrogen Bond (O6-H → O3'). [43]

Οι άμορφες περιοχές παρεμβάλλονται ανάμεσα στις κρυσταλλικές (Χριστακόπουλος και Τόπακας, 2013), όπως φαίνεται στην **εικόνα 6**.

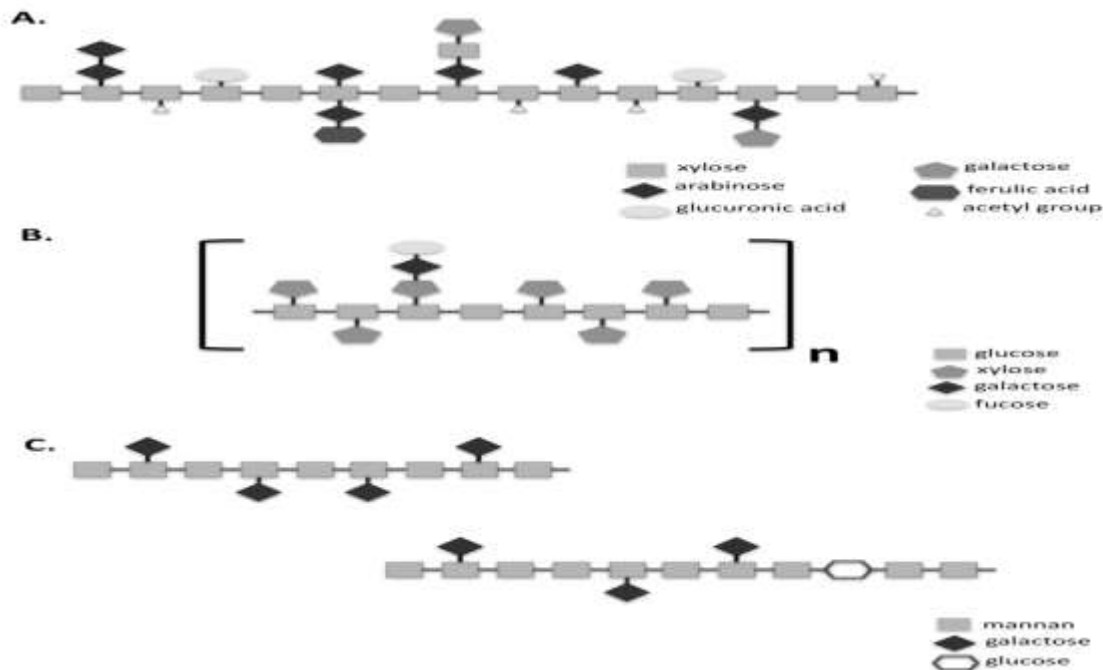


Εικόνα 6: Άμορφες και κρυσταλλικές περιοχές στην κυτταρίνη (Zhou and Wu, 2012).

4.2. Φυσικοχημικά και δομικά χαρακτηριστικά ημικυτταρινών

Λανθασμένη είναι η χρήση του όρου «ημικυτταρίνη», καθώς υπάρχουν πολλά διαφορετικά είδη ημικυτταρινών (Χριστακόπουλος και Τόπακας, 2013). Οι ημικυτταρίνες είναι ετερογενείς πολυσακχαρίτες που αποτελούνται από διαφορετικές μονάδες σακχάρων, ενώ έχουν τη θέση του δεύτερου πιο άφθονου πολυσακχαρίτη στα κυτταρικά τοιχώματα των φυτικών ιστών (Wagner, 2013). Επίσης, είναι άμορφες, μη κρυσταλλικές, υγροσκοπικές, με χαμηλό βαθμό πολυμερισμού και με υψηλή χημική δραστηριότητα. Σχηματίζουν πλέγμα διασταυρωμένων πολυσακχαριτών αποτελούμενο από διάφορες πεντόζες (D-ξυλόζη, L-αραβινόζη, L-ραμνόζη και L-φρουκτόζη), εξόζες (D-μαννόζη, D-γλυκόζη, D-γαλακτόζη) και ουρονικά οξέα (D-γλυκουρονικό οξύ, D-4-O-μεθυλ-γλυκουρονικό οξύ και D-γαλακτουρονικό οξύ). Οι ημικυτταρίνες ταξινομούνται βάσει του κυριότερου μονομερούς σακχάρου τους που βρίσκεται στο σκελετό του δομικού πολυμερούς σε γλυκάνες, μαννάνες, αραβινάνες, γαλακτάνες και ξυλάνες (Χριστακόπουλος και Τόπακας, 2013). Τα αγρωστώδη υλικά και το άχυρο περιέχουν αραβινάνες, γαλακτάνες και ξυλάνες, ενώ οι μαννάνες είναι συστατικό που βρίσκεται στα σκληρά και μαλακά ξυλώδη υλικά [Anwar et al., 2014].

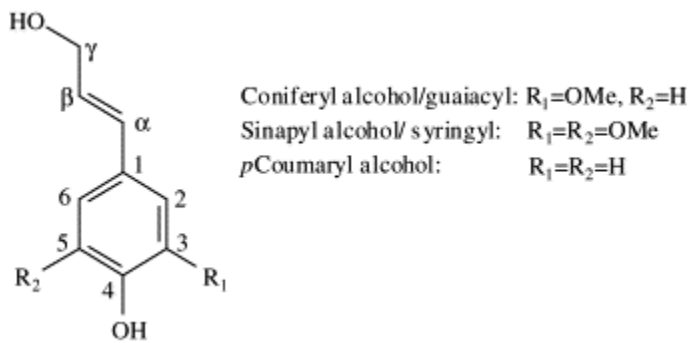
Η ξυλάνη είναι το κυριότερο πολυμερές της ημικυτταρίνης στα δημητριακά (cereals) και στο σκληρό ξύλο, αποτελείται από μια κεντρική αλυσίδα με μονάδες D-ξυλοπυρανόζης ενωμένες με β-1,4 γλυκοζιτικό δεσμό. Η αλυσίδα αυτή μπορεί να περιέχει διακλαδώσεις με μονάδες D-γαλακτόζης, L-αραβινόζης, γλυκουρονικού οξέος, φερουλικού οξέος, π-κουμαρικού οξέος και ακέτυλο-μονάδες (Wagner, 2013). Η ξυλάνη διαδραματίζει τον ρόλο του συνδετικού κρίκου ανάμεσα στην λινίνη και την κυτταρίνη, εξασφαλίζοντας συνεκτικότητα στον κυτταρικό ιστό. Ο τρόπος που αλληλεπιδρά με τις δομικές μονάδες του κυτταρικού τοιχώματος είναι οι ομοιοπολικοί και μη ομοιοπολικοί (δεσμοί υδρογόνου) που σχηματίζει με την κυτταρίνη και του λοιπούς πολυσακχαρίτες, αντίστοιχα. Ως προς τα δομικά της χαρακτηριστικά, η ξυλάνη παρουσιάζει ποικιλομορφία, η οποία διαμορφώνεται βάσει της πηγής προέλευσής της (εικόνα 7) (Χριστακόπουλος και Τόπακας, 2013). Δύο άλλες κύριες ημικυτταρίνες είναι οι γαλακτογλουκομαννάνες, που αποτελούνται από έναν κύριο σκελετό με μονάδες D-μαννόζης (μαννάνες) και D-γλυκόζης (γλυκομαννάνες) ενωμένες με δεσμό β-1,4 και με πλευρικές αλυσίδες D-γαλακτόζης και οι ξυλογλυκάνες οι οποίες αποτελούνται από ενωμένες με β-1,4 δεσμό D-γλυκόζης στον κύριο σκελετό με υποκατάστατα D-ξυλόζης (εικόνα 7). Οι L-αραβινόζη και D-γαλακτόζη μπορούν να συνδέονται με μονάδες ξυλόζης στις ξυλογλυκανάσες και η L-φρουκτόζη με μονάδες γαλακτόζης των πλευρικών αλυσίδων των γλυκομαννάνων (εικόνα 7) (Wagner, 2013).



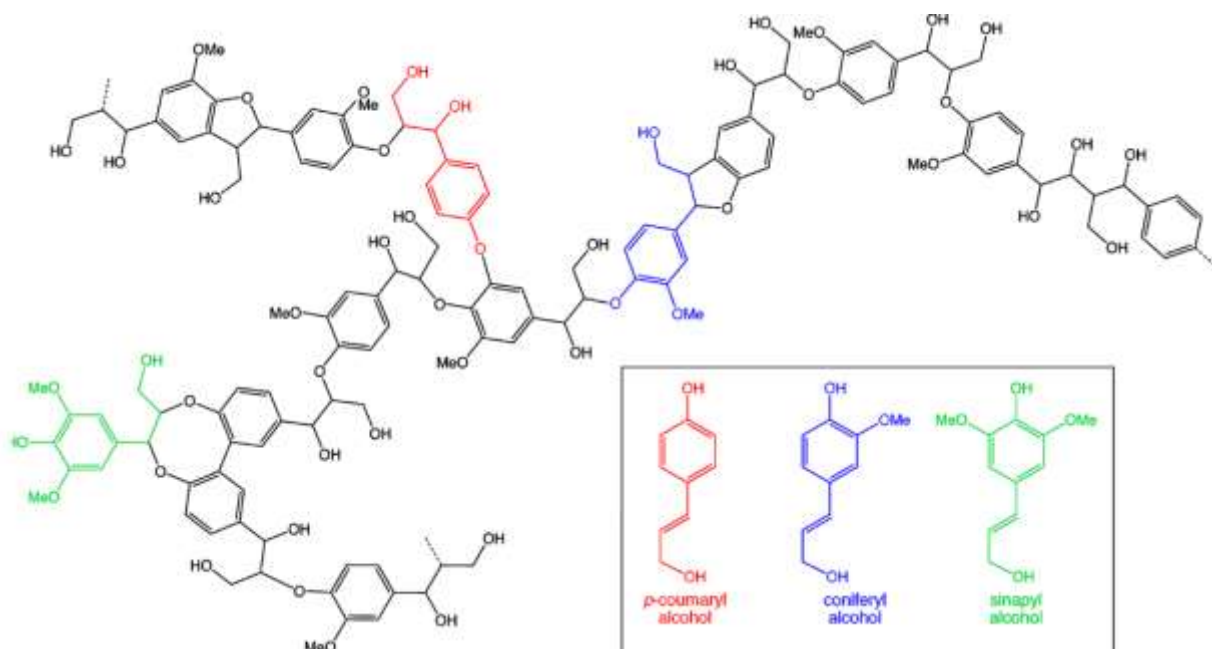
Εικόνα 7: Απεικόνιση δομών ημικυταρρινών, Α. Ξυλάνη, Β. Ξυλογλουκάνη, C. Γαλακτομαννάνη (πάνω αριστερά) και γαλακτογλυκομαννάνη (κάτω δεξιά) (Wagner, 2013)

4.3. Φυσικοχημικά και δομικά χαρακτηριστικά λιγνίνης

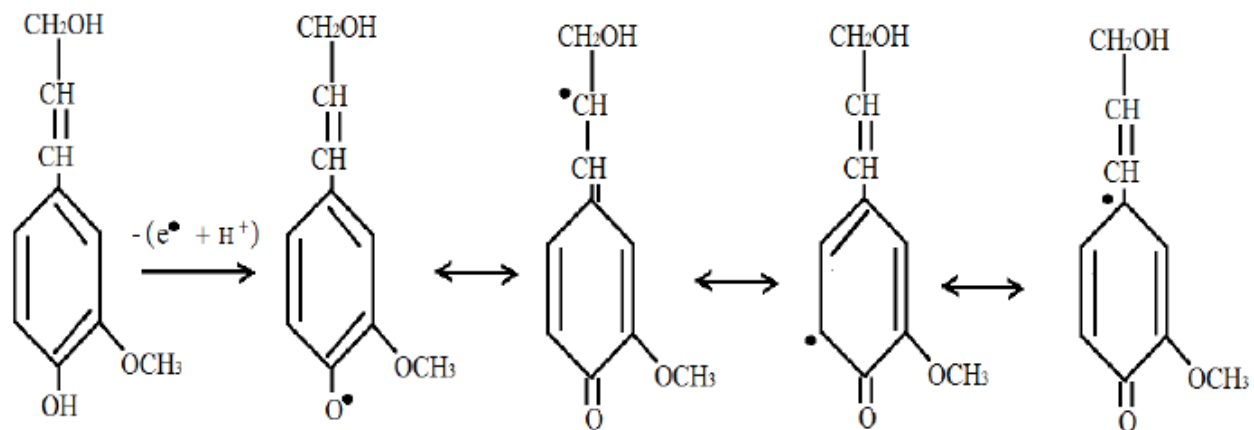
Η λιγνίνη είναι το πιο περίπλοκο και μικρότερο κλάσμα, καθώς αντιπροσωπεύει περίπου το 10-25% κ.β. της βιομάζας. Ο ρόλος της είναι να κλείνει τα κενά ανάμεσα και γύρω από το πλέγμα κυτταρίνης και της ημικυτταρίνης με πολυμερή [Anwar et al., 2014]. Επιπρόσθετα, συνιστά ένα τρισδιάστατο άμορφο πολυμερές που αποτελείται από δομές μεθοξυλιωμένου φαινυλοπροπανίου [Chakar et al., 2004] συνδεδεμένες με αιθερικούς δεσμούς [Anwar et al., 2014]. Οι δεσμοί στη λιγνίνη, εκτός από αιθερικοί είναι και δεσμοί άνθρακα-άνθρακα. Η βιοσύνθεση της λιγνίνης πηγάζει από τον πολυμερισμό των τριών τύπων μονάδων φαινυλοπροπανίου, που αναφέρονται επίσης ως μονολιγίνες. Αυτές οι μονάδες είναι η κονιφερυλο, σιναπυλική και p-κουμαρυλο αλκοόλη (εικόνα 8). Ο πολυμερισμός αρχίζει με την οξείδωση των ομάδων φαινολικών υδροξυλίων των μονολιγινών. Η αντίδραση αυτή καταλύεται μέσω ενζυμικής οδού. Η ενζυμική αφυδρογόνωση ξεκινάει με τη μεταφορά ενός ηλεκτρονίου από την οποία σχηματίζονται δραστικές ρίζες μονολιγινικών ομάδων που αντιδρούν μεταξύ τους (εικόνα 10). Ακολουθεί αντίδραση με μόρια νερού, με αλκοολικές ομάδες ή με ομάδες φαινολικών υδροξυλίων του βενζολικού άνθρακα του ενδιάμεσου μεθιδίου κινόνης, μέσω της οποίας θα υποκατασταθεί η αρωματικότητα του βενζολικού δακτυλίου. Τέλος, παράγονται διλιγνιόλες, οι οποίες θα συνεχίσουν με τον ίδιο τρόπο τον πολυμερισμό. [Chakar et al., 2004].



Εικόνα 8: Οι τρεις δομικές μονάδες της λιγνίνης [Chakar et al.,2004].



Εικόνα 9: Μοντέλο λιγνίνης [45].



Εικόνα 10: Αφυδρογόνωση κονιφερυλο- αλκοόλης και οι μεσομερείς ρίζες (Nasir et al., 2015).

5. Τεχνολογίες βιοαποδόμησης λιγνοκυτταρινούχου βιομάζας

5.1. Εισαγωγή

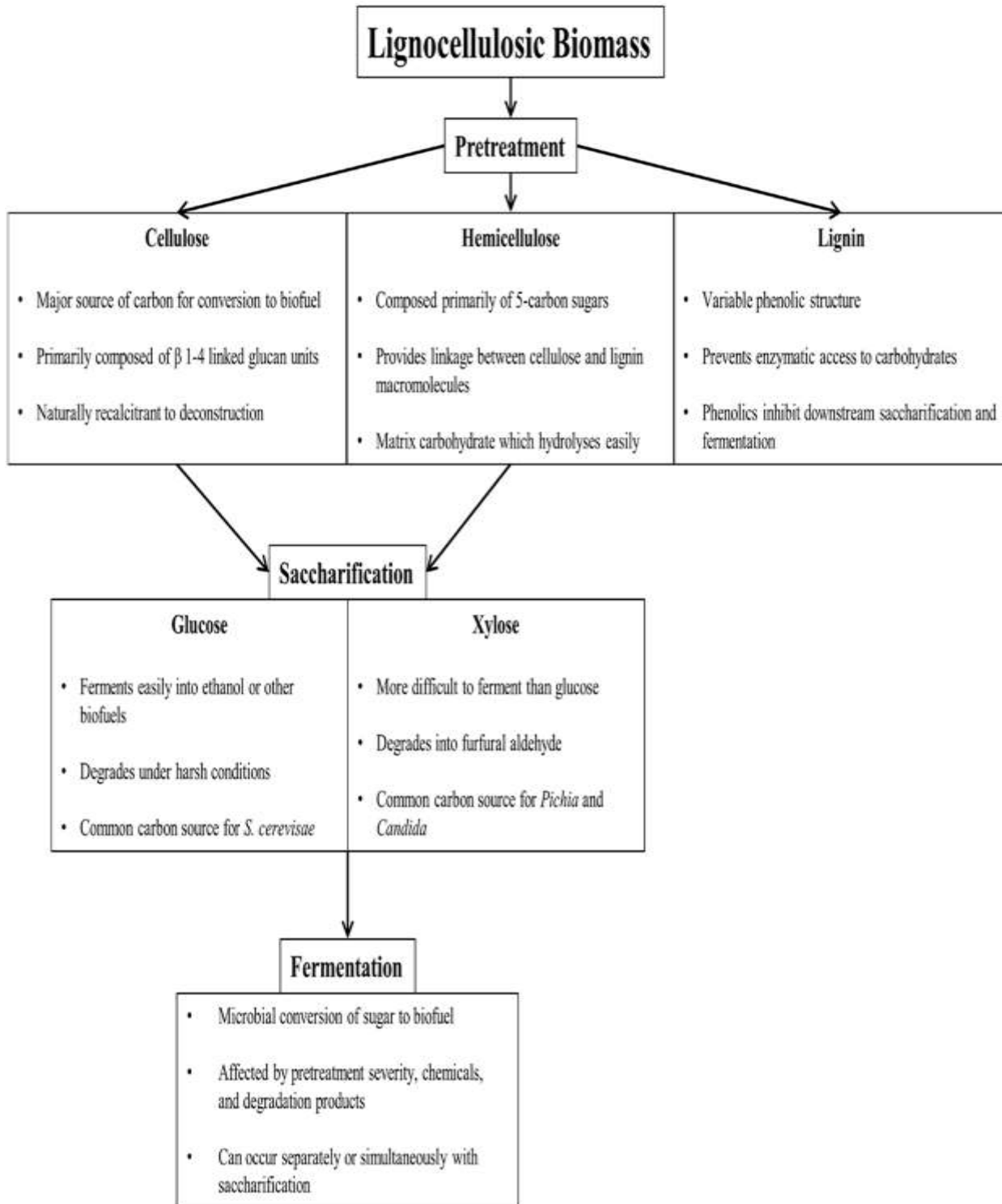
Η λιγνοκυτταρινούχος ύλη από γεωργικά απόβλητα είναι η πιο άφθονη, χαμηλού κόστους και ανανεώσιμη βιομάζα (Wanga et al., 2013). Επιπλέον, η λιγνοκυτταρινούχος βιομάζα, εκτός από αγροτικά υπολείμματα, απομονώνεται και από ξυλώδη υπολείμματα της βιομηχανίας του ξύλου καθώς και από δασικά ξυλώδη υλικά (Χριστακόπουλος και Τόπακας, 2013). Στην αποτελεσματική αξιοποίηση των λιγνοκυτταρινούχων υλικών υπήρξε ένα ενδιαφέρον ερευνητικό πεδίο, καθώς τα σάκχαρα που παράγονται από τη λιγνοκυτταρινούχο βιομάζα έχουν την ικανότητα να βιομετατρέπονται σε υγρό βιοκαύσιμο και σε άλλα βιοχημικά προϊόντα. Ωστόσο, διάφορα εμπόδια που σχετίζονται με τη μετατροπή αυτή πρέπει να λυθούν. Ένα από τα βασικά προβλήματα που εμποδίζουν την αποδοτική μετατροπή είναι η χαμηλή ευαισθησία της λιγνοκυτταρίνης στην υδρόλυση. Το γεγονός αυτό οφείλεται στην αείθραρχη κρυσταλλική δομή των ινιδίων κυτταρίνης που περιβάλλονται γύρω από ημικυτταρίνη και φράγματα λιγνίνης. Ως εκ τούτου, η ανάπτυξη μιας διαδικασίας προεπεξεργασίας για την ενίσχυση της αποτελεσματικότητας αποδόμησης κρίνεται αναγκαία. Η αποδόμηση επιτυγχάνεται μέσω διαχωρισμού της λιγνίνης και των ημικυτταρινών από την κυτταρίνη, διαταράσσοντας την λιγνοκυτταρινούχο κρυσταλλική δομή και αυξάνοντας την προσβασιμότητα στη δομή της κυτταρίνης. Ένας αριθμός λιγνοκυτταρινικών τεχνολογιών προεπεξεργασίας έχει εκτεταμένα διερευνηθεί. Όλες αυτές οι τεχνολογίες απαιτούν ειδικά όργανα και υψηλή κατανάλωση ενέργειας. Επίσης, η προεπεξεργασία συχνά παράγει μια μεγάλη ποσότητα αναστολέων στην μετέπειτα υδρόλυση και μικροβιακή ζύμωση. Επιπλέον, παράγει όξινα ή αλκαλικά υπολείμματα, τα οποία χρειάζονται ειδική κατεργασία για να διασφαλιστεί η περιβαλλοντική ασφάλεια απόρριψής τους. Ωστόσο, η τεχνολογία της μικροβιακής προεπεξεργασίας κυρίως από τους μύκητες λευκής σήψης υπόσχεται μια προσέγγιση για την απομάκρυνση της λιγνίνης με ασφαλή, περιβαλλοντικά βιώσιμο τρόπο, ενώ συνδυάζει και το χαμηλό κόστος. Οι μύκητες που επιλέγονται παράγουν ένζυμα που δρουν στη λιγνίνη, όπως λακκάση, υπεροξειδάση της λιγνίνης (LiP) και υπεροξειδάση του μαγγανίου (MnP), τα οποία την αποδομούν εν μέρει και την καθιστούν δομικά πιο ευάλωτη (Wanga et al., 2013).

5.2. Στάδια αποδόμησης λιγνοκυτταρινούχου βιομάζας

Από βιοτεχνολογική πλευρά, μια ποικιλία λιγνοκυτταρινούχων υλικών είναι πηγή ικανή για να παραχθούν υψηλής αξίας προϊόντα, όπως τα βιοκαύσιμα, καθώς διαθέτουν υδρογονάνθρακες που μπορούν να μετατραπούν σε απλά ζυμώσιμα σάκχαρα και μετέπειτα μέσω ζύμωσης να μετατραπούν σε βιοκαύσιμα. Η μετατροπή της λιγνοκυτταρινούχου βιομάζας σε υψηλής αξίας προϊόντα εκτελείται μέσω σταδίων, όπως αυτά φαίνονται παρακάτω [Anwar et al., 2014]:

- Προεπεξεργασία λιγνοκυτταρινούχου ύλης
- Ενζυμική υδρόλυση-σακχαροποίηση
- Διαδικασία της ζύμωσης.

Στην εικόνα 11 παρουσιάζεται συνοπτικά η διαδικασία αποδόμησης της λιγνοκυτταρινούχου βιομάζας.



Εικόνα 11: Συνοπτική απεικόνιση αποδόμησης λιγνοκυτταρινούχου βιομάζας (Healey et al.,2015).

5.2.1. Προεπεξεργασία λιγνοκυτταρινούχου βιομάζας

Η προεπεξεργασία της βιομάζας αποτελεί ένα πολύ σημαντικό βήμα για την ανάκτηση της κυτταρίνης και την υδρόλυση αυτής σε ζυμώσιμα σάκχαρα, αφού μέσω αυτής έρχεται η διάσπαση του φράγματος της λιγνίνης [Anwar et al., 2014]. Επίσης, η προεπεξεργασία είναι υπεύθυνη για τη μείωση της

κρυσταλλικότητας της κυτταρίνης, ώστε να γίνει πιο εύκολη η διαδικασία της υδρόλυσης (**Χριστακόπουλος και Τόπακας, 2013**). Κατά τη διάρκεια των τελευταίων δεκαετιών, έχουν αναπτυχθεί διάφορες προσεγγίσεις προεπεξεργασίας, προκειμένου να δημιουργηθούν με οικονομικά ωφέλιμο τρόπο ζυμώσιμα σάκχαρα από λιγνοκυτταρινικά υλικά [**Anwar et al., 2014**].

5.2.1.1. Κριτήρια επιλογής μεθόδων προεπεξεργασίας λιγνοκυτταρινούχου βιομάζας

Μια μέθοδος προεπεξεργασίας χαρακτηρίζεται αποτελεσματική από διάφορα κριτήρια όπως: από τη διατήρηση των κλασμάτων των ημικυτταρινών, από την απόδοση σε ζυμώσιμα σάκχαρα, από τον περιορισμό της απώλειας υδρογονανθράκων, από την ελαχιστοποίηση του σχηματισμού παρεμποδιστών των προϊόντων αποικοδόμησης, από την ελαχιστοποίηση της απαιτούμενης ενέργειας, καθώς και από το αν η διαδικασία είναι οικονομικά αποδοτική και επωφελής από πλευρά κόστους. Όταν συγκρίνονται διάφορες μέθοδοι προεπεξεργασίας, όλα τα παραπάνω κριτήρια θα πρέπει να λαμβάνονται ως βάση για να επιτευχθεί το τελικό προϊόν. Τέλος, έχουν μελετηθεί τα χαρακτηριστικά της βιομάζας που επιδρούν στην επιλογή μεθόδου προεπεξεργασίας, και αυτά είναι τα εξής (**Ravindran and Jaiswal, 2016**) :

- Η κρυσταλλικότητα της λιγνοκυτταρινούχου ύλης που αφορά στις κρυσταλλικές περιοχές της κυτταρίνης σε σχέση με τις άμορφες περιοχές της. Η δράση ενζύμων και μικροβίων στη λιγνοκυτταρινούχο ύλη ενισχύουν τη διάσπαση των δεσμών στην κυτταρίνη και προωθούν τον αποπολυμερισμό της αλυσίδας της. Ωστόσο, η αυξημένη κρυσταλλικότητα της κυτταρίνης έχει ως αποτέλεσμα οι δεσμοί υδρογόνου που αναπτύσσονται να παρεμποδίζουν την ενζυμική και μικροβιολογική δράση.
- Ο βαθμός πολυμερισμού της κυτταρίνης
- Η διαθέσιμη επιφάνεια υποστρώματος. Η διαδικασία υδρόλυσης της κυτταρίνης εξαρτάται σε μεγάλο βαθμό από την ικανότητα απορρόφησης ενζύμων στο υπόστρωμα. Η ικανότητα αυτή καθορίζεται από την διαθέσιμη επιφάνεια υποστρώματος. Επιπλέον, εξαρτάται από το μέγεθος, την ποροσιμετρία και τον όγκο των πόρων του υποστρώματος.
- Οι ακετυλομάδες που υπάρχουν στον κύριο σκελετό της δομής των ημικυτταρινών παρεμποδίζουν την αποτελεσματική σακχαροποίηση της κυτταρίνης. Ωστόσο, με την προεπεξεργασία με θερμό νερό μπορεί να επιτευχθεί απομάκρυνση αυτών των ακετυλομάδων και μετατροπή τους σε οξικό οξύ. Οι ομάδες αυτές μπορεί να λειτουργήσουν ως παρεμποδιστές στην ενζυμική δράση, παρεμβαίνοντας στην δημιουργία δεσμών υδρογόνου μεταξύ περιοχών της κυτταρίνης. Οι αρνητικές επιπτώσεις από τον σχηματισμό των ακετυλ-ομάδων μπορούν να περιοριστούν μέσω σαπωνοποίησης.

Η υδρόλυση της βιομάζας μπορεί να πραγματοποιηθεί με διάφορους τρόπους, οι οποίοι είναι κυρίως φυσικοχημικοί, χημικοί ή βιολογικοί [**Anwar et al., 2014**]. Η επιλογή της μεθόδου προεπεξεργασίας έχει αντίκτυπο στην υδρόλυση που ακολουθεί και για το λόγο αυτό θα πρέπει να στηρίζεται στις εξής θεωρήσεις (**Van and Pletscke, 2012**):

- Το κόστος της προεπεξεργασίας που εξαρτάται από τις ενεργειακές απαιτήσεις και τα χημικά απαιτούμενα στην τροφοδοσία. Συχνά, για τη χημική προεπεξεργασία είναι σημαντική η μηχανική μείωση μεγέθους, η οποία μπορεί να έχει υψηλό ενεργειακό κόστος.
- Το μέγεθος απομάκρυνσης της λιγνίνης δείχνει το ποσοστό αλλαγής στη δομή της λιγνίνης που οφείλεται στην προεπεξεργασία. Οι Varnai et al. (2010) (**Varnai et al., 2010**) κατέληξαν στο συμπέρασμα ότι η πλήρης απολιγνίνωση δεν φαίνεται να είναι απαραίτητη για να επιτευχθεί η υδρόλυση. Κάποιες μέθοδοι προεπεξεργασίας, που απλώς αλλάζουν τη θέση της λιγνίνης ενισχύοντας την υδρόλυση χωρίς την αφαίρεση της, έδειξαν ότι μεγάλο ποσοστό απολιγνίνωσης μπορεί να μειώσει τον αποπολυμερισμό της κυτταρίνης. Διαπίστωσαν ότι η απομάκρυνση σχεδόν

όλης της λιγνίνης μαζί με την ξυλάνη επιδρά αρνητικά στην προσβασιμότητα των ενζύμων, καθώς προκαλεί άθροιση των μικροϊνιδίων κυτταρίνης.

- Ο βαθμός υδρόλυσης πολυσακχαριτών που επιτυγχάνεται από την προεπεξεργασία. Στο παρελθόν, δόθηκε έμφαση σε ερευνητικό επίπεδο στον τρόπο πρόσβασης στην κυτταρίνη μέσω της αποδόμησης της λιγνίνης, και στις διάφορες μεθόδους προεπεξεργασίας με στόχο την απομάκρυνση των κλασμάτων ημικυτταρίνης, όπως η όξινη υδρόλυση. Ωστόσο, οι στόχοι έχουν μετατοπιστεί προς τη διατήρηση του μέγιστου κλάσματος πολυσακχαριτών για να ληφθεί μία βελτιωμένη απόδοση σε ολικά σάκχαρα.
- Η αποφυγή της δημιουργίας των παραπροϊόντων υποβάθμισης σακχάρων (όπως η φουρφουράλη από ξυλόζη) και υποβάθμισης λιγνίνης, που συνήθως προκύπτουν μετά από έντονη προεπεξεργασία, καθώς τα παραπροϊόντα παρεμποδίζουν τη ζύμωση. Αποτέλεσμα της ύπαρξης τέτοιων παραπροϊόντων είναι η αναγκαιότητα κάποιων σταδίων έκπλυσης, που κοστίζουν ενεργειακά.
- Η δραστηριότητα της ενζυμικής υδρόλυσης, μετά από την προεπεξεργασία, με την απαίτηση χαμηλών φορτίων ενζύμου. Αυτό συνδέεται με την καταλληλότητα της προεπεξεργασίας για το συγκεκριμένο υπόστρωμα. Για παράδειγμα η αλκαλική προεπεξεργασία δεν είναι πολύ αποτελεσματική σε μαλακά ξύλα αν και μπορεί να επιτύχει όλους τους ανωτέρω στόχους.
- Η ανάκτηση της λιγνίνης μπορεί επίσης να αποτελεί στόχο ενός σταδίου προεπεξεργασίας.

5.2.1.2. Μέθοδοι προεπεξεργασίας βιομάζας

Ο στόχος της προεπεξεργασίας είναι να διευκολύνει ή να αυξήσει την αποτελεσματικότητα της υδρόλυσης, βελτιώνοντας την προσβασιμότητα στα κλάσματα κυτταρίνης. Αυτό επιτυγχάνεται με την απομάκρυνση της λιγνίνης και των ημικυτταρινών. Τις τελευταίες τρεις δεκαετίες, μεγάλο ποσοστό ερευνών έχει πραγματοποιηθεί στο πεδίο της προεπεξεργασίας προκειμένου να διερευνηθεί η αποτελεσματικότητα των διάφορων μεθόδων. Τα αποτελέσματα της συνεταιριστικής χρήσης μεθόδων για την αποτελεσματική απομάκρυνση της λιγνίνης έχουν επίσης διερευνηθεί σε εκτενή κλίμακα. Οι μέθοδοι προεπεξεργασίας μπορούν να ταξινομηθούν με ποικίλους τρόπους. Ένας από τους τρόπους αυτούς είναι με βάση την τιμή pH που διατηρείται κατά τη διάρκεια της προεπεξεργασίας. Με το κριτήριο αυτό, οι μέθοδοι μπορούν να ομαδοποιηθούν σε όξινες, ουδέτερες και αλκαλικές. Ένας άλλος τρόπος ταξινόμησης των μεθόδων προεπεξεργασίας περιλαμβάνει την ομαδοποίησή τους με βάση τον τρόπο δράση τους, σε φυσικές, χημικές ή βιολογικές μεθόδους (**Ravindran and Jaiswal, 2016**).

5.2.1.2.1. Φυσική προεπεξεργασία

5.2.1.2.1.1. Λείανση και άλεση (cutting and milling).

Η λείανση είναι μια τεχνική μείωσης μεγέθους που χρησιμοποιείται για την προεπεξεργασία βιομάζας. Η μέθοδος αυτή αυξάνει την δυνατότητα αντίδρασης της βιομάζας και δεν απελευθερώνει κάποιο υπόλειμμα. Το μέγεθος του δείγματος μειώνεται σταδιακά με κόψιμο και άλεση (cutting and milling). Τα αποτελέσματα της λείανσέως περιλαμβάνουν μεταβολές στο βαθμό πολυμερισμού, στο πορώδες, στο εμβαδόν επιφάνειας και στην κρυσταλλικότητα. Τελικά, η ενζυμική αποικοδόμηση του υποστρώματος βελτιώνεται μέσω της διαδικασίας αυτής (**Ravindran and Jaiswal, 2016**).

5.2.1.2.1.2. Προεπεξεργασία με υπερήχους (Ultrasonic pretreatment)

Η μέθοδος αυτή χρησιμοποιεί υπερήχους προκειμένου να σπάσει το σύνθετο δίκτυο πολυμερισμού στη βιομάζα. Η κοιλότητα που δημιουργείται εξαιτίας των παλλόμενων υπερηχητικών κυμάτων υψηλής συχνότητας διαπερνά του πολυσακχαρίτες και διακόπτει το πλέγμα των διασταυρούμενα συνδεδεμένων πολυμερών, διευκολύνοντας έτσι τη δράση της ενζυμικής αποικοδόμησης (**Ravindran and Jaiswal, 2016**).

5.2.1.2.1.3. Φυγοκεντρική λείανση (Centrifugal grinding)

Όπως υποδηλώνεται και από το όνομα, η φυγοκεντρική λείανση είναι ένας τροποποιημένος μηχανισμός άλεσης που χρησιμοποιεί ειδικό μυλό. Η τεχνική αυτή μειώνει το μέγεθος της βιομάζας, με αποτέλεσμα να αυξηθεί η επιφάνεια του υποστρώματος, καθώς επίσης μειώνει την κρυσταλλικότητα της κυτταρίνης, προκαλώντας καλύτερη έκθεση των πολυμερών της για την υδρόλυσή τους. Η φυγοκεντρική λείανση υπερέχει σε σχέση με τη συνήθη πρακτική, λόγω των έντονων συγκρούσεων και των διατμητικών τάσεων που προκαλεί. Η τεχνική αυτή πραγματοποιείται σε διαδοχικά στάδια και έχει ως αποτέλεσμα την μείωση σε μεγάλο βαθμό των κόκκων βιομάζας **(Ravindran and Jaiswal, 2016)**.

5.2.1.2.1.4. Προεπεξεργασία με εξώθηση (Extrusion pretreatment)

Η εξώθηση είναι μια διαδικασία κατά την οποία βιομάζα που είναι ομοιόμορφα βρεγμένη περνάει μέσα από ένα σύμπλεγμα με κοχλίες υπό υψηλή πίεση και σε υψηλή θερμοκρασία με συγκεκριμένη συχνότητα. Απαιτεί μια συσκευή που ονομάζεται εξωθητής. Η βιομάζα μπορεί να αναμιχθεί και με διάφορα χημικά όπως υδροξείδιο του νατρίου, ουρία ή θειουρία, ώστε η μέθοδος να καταστεί πιο αποτελεσματική **(Ravindran and Jaiswal, 2016)**.

5.2.1.2.2. Χημική προεπεξεργασία

5.2.1.2.2.1. Προεπεξεργασία με αραιό οξύ (Dilute-acid pretreatment)

Η προεπεξεργασία με αραιό οξύ υδρολύει τις ημικυτταρίνες και κάνει την κυτταρίνη πιο επιρρεπή στην αποδόμηση. Ισχυρά οξέα, όπως το θειικό οξύ, σε αραιωμένη μορφή, χρησιμοποιούνται συνήθως για την επεξεργασία της βιομάζας. Τα δείγματα βιομάζας βυθίζονται στο αραιό οξύ, η θερμοκρασία αυξάνει στους 160°C, όπου παραμένει για 10 λεπτά. Με την προεπεξεργασία με αραιό οξύ επιτυγχάνεται σημαντική μείωση γαλακτόσυλ- και ξυλοσυλ- ομάδων (ημικυτταρίνης), ενώ διατηρείται υψηλή η περιεκτικότητα σε κυτταρίνη **(Ravindran and Jaiswal, 2016)**.

5.2.1.2.2.2. Όξινη προεπεξεργασία με ακετόνη (Acid-acetone pretreatment)

Η προεπεξεργασία με ακετόνη στηρίζεται στην οξεόλυση που συμβαίνει σε υψηλές θερμοκρασίες ακολουθούμενη από κρύο σοκ. Μελέτες έχουν δείξει ότι πάνω από το 99% της συνολικής περιεκτικότητας σε κυτταρίνη της λιγνοκυτταρινούχου βιομάζας, στην όξινη προεπεξεργασία με ακετόνη, είναι διαθέσιμο για ενζυμική υδρόλυση προς παραγωγή γλυκόζης. Συγκεκριμένη ποσότητα βιομάζας αναμιγνύεται με πυκνό φωσφορικό οξύ και περιστρέφεται σε λουτρό αέρα για μία ώρα στα 120rpm και στους 50°C. Ο πολτός που δημιουργείται αναμιγνύεται στην συνέχεια με ψυχρή ακετόνη μέχρι την πλήρη ομογενοποίηση. Μετά τη φυγοκέντρηση του πολτού συλλέγεται το υπερκείμενο για ανάλυση αναγωγικών σακχάρων, καθώς το στερεό υπόλειμμα εκπλένεται και χρησιμοποιείται για ενζυμική υδρόλυση **(Ravindran and Jaiswal, 2016)**.

5.2.1.2.2.3. Προεπεξεργασία με χρήση ιοντικών υγρών (Pretreatment using ionic liquids)

Τα ιοντικά υγρά είναι θερμικά σταθεροί οργανικοί διαλύτες ικανοί για τη διάλυση πολικών και μη πολικών οργανικών, ανόργανων και πολυμερών ενώσεων. Έχουν χαμηλή μεταβλητότητα, δεν είναι εύφλεκτα και μπορούν να ανακυκλωθούν. Επιπλέον, η προεπεξεργασία με χρήση ιοντικών υγρών δεν απαιτεί υψηλή κατανάλωση ενέργεια. Κάποια ιοντικά υγρά που χρησιμοποιούνται για την προεπεξεργασία λιγνοκυτταρινούχου βιομάζας είναι τα: ανιονικό χλωρίδιο, μυρμηκικό, οξικό ή αλκυλοφωσφορικό άλας και χαρακτηριστικές ομάδες που σχηματίζουν ισχυρούς δεσμούς υδρογόνου με την κυτταρίνη και άλλους υδρογονάνθρακες **(Ravindran and Jaiswal, 2016)**.

5.2.1.2.2.4. Προεπεξεργασία με αλκαλικό υπερμαγγανικό κάλιο (Alkaline potassium permanganate pretreatment)

Αυτή η μέθοδος προεπεξεργασίας εκμεταλλεύεται την έντονη ιδιότητα οξείδωσης του υπερμαγγανικού καλίου. Το υπερμαγγανικό κάλιο θεωρείται πιο ασφαλές συγκρινόμενο με το όζον ή με ιονικά υγρά. Το αλκαλικό διάλυμα υπερμαγγανικού καλίου έχει την ικανότητα της απολίγνισης της βιομάζας μέσω οξείδωσης, διατηρώντας όμως του υδρογονάνθρακες. Η δράση αυτή επιτυγχάνεται με τη διάσπαση εστερικών και αιθερικών δεσμών μεταξύ της λινίνης και των υδρογονανθράκων (**Ravindran and Jaiswal, 2016**).

5.2.1.2.2.5. Προεπεξεργασία με οργανικό διαλύτη (organosoln pretreatment)

Η προεπεξεργασία organosoln πραγματοποιεί ισχυρούς καταλύτες ανόργανων οξέων όπως το θειϊκό οξύ, οι οποίοι υδρολύουν τους δεσμούς στη λινίνη. Το πλεονέκτημα αυτής της μεθόδου είναι η επιλογή της ανάκτησης της λινίνης ως προϊόν προστιθέμενης αξίας. Επιπλέον, η ανάκτηση του διαλύτη απαιτεί ελάχιστη ενέργεια. Αυτός ο τρόπος προεπεξεργασίας περιλαμβάνει τη χρήση χημικών όπως η φορμαλδεΐδη (**Ravindran and Jaiswal, 2016**).

5.2.1.2.2.6. Προεπεξεργασία με χρήση μεταλλικών χλωριδίων (Pretreatment using metal chlorides)

Η μέθοδος προεπεξεργασίας με χρήση μεταλλικών ιόντων απαιτεί αντιδραστήρα υψηλής πίεσης. Η βιομάζα τροφοδοτείται στον αντιδραστήρα μαζί με μεταλλικά χλωρίδια ($FeCl_3$, $FeCl_2$, $CrCl_3$, $ZnCl_2$, και $AlCl_3$). Τα αντιδραστήρια θερμαίνονται στους $170\text{ }^\circ C$ για 30 λεπτά, επιτυγχάνεται απολίγνιση και τα προεπεξεργασμένα στερεά απομακρύνονται με διήθηση (**Ravindran and Jaiswal, 2016**).

5.2.1.2.2.7. Προεπεξεργασία με πλάσμα (Plasma pretreatment)

Η μέθοδος αυτή χρησιμοποιεί το πλάσμα για να φέρει αλλαγές στην επιφάνεια της κυτταρίνης. Η προεπεξεργασία με πλάσμα έχει ως αποτέλεσμα την αύξηση της τραχύτητας της κυτταρίνης. Το πλάσμα δημιουργεί υψηλής δραστηριότητας χημικά είδη, όπως OH^\cdot και H_2O_2 , τα οποία αποικοδομούν την κυτταρίνη προς γλυκόζη (**Ravindran and Jaiswal, 2016**).

5.2.1.2.3. Φυσικοχημική προεπεξεργασία

5.2.1.2.3.1. Έκρηξη ατμού (Steam explosion)

Ο ατμός, ο οποίος βοηθάει στην κλασμάτωση της βιομάζας στα συστατικά της, (καλείται επίσης και αυτοϋδρόλυση) είναι η πιο παλιά, και προς το παρόν, η πιο αποτελεσματική μέθοδος προεπεξεργασίας που διευκολύνει την υδρόλυση. Η διαδικασία περιλαμβάνει την έκθεση της βιομάζας σε υψηλή πίεση και θερμοκρασία για ένα ορισμένο χρονικό διάστημα μετά το οποίο το δείγμα ταχέως αποσυμπίεζεται με αποτέλεσμα την διάσπαση του συμπλόκου λινίνης-υδρογονανθράκων (**Ravindran and Jaiswal, 2016**).

5.2.1.2.3.2. Προεπεξεργασία με θερμό νερό (Hot water pre-treatment)

Η προεπεξεργασία με θερμό νερό είναι ιδανική για λιγνινοκυτταρικά υποστρώματα, στα οποία η προσθήκη χημικών για την απολίγνιση θα οδηγούσε σε απώλεια χρήσιμης βιομάζας. Αυτή η μέθοδος, δεν απαιτεί αντιδραστήρα ανθεκτικό στη διάβρωση, καθώς και χημικά, ενώ ο σχηματισμός τοξικών ουσιών απουσιάζει. Η διαδικασία πραγματοποιείται σε αντιδραστήρα υψηλής πίεσης (**Ravindran and Jaiswal, 2016**).

5.2.1.2.3.3. Υγρή οξείδωση (Wet oxidation)

Η τεχνική της υγρής οξειδωσης στηρίζεται στην υψηλή πίεση και θερμοκρασία στην υγρή φάση για την υδρόλυση της λιγνοκυτταρινούχου ύλης. Χρειάζεται οξειδωτικούς παράγοντες και έχει ως αποτέλεσμα το σχηματισμό ριζών υδροξυλίου, οι οποίες σπάνε την λιγνοκυτταρινούχο βιομάζα σε λιγνίνη και υδρογονάνθρακες (**Ravindran and Jaiswal, 2016**).

5.2.1.2.3.4. Ammonia fibre expansion (AFEX)

Η ammonia fibre expansion (AFEX) είναι μια από τις πιο πετυχημένες μεθόδους προεπεξεργασίας της λιγνοκυτταρινούχου βιομάζας για την παραγωγή ζυμώσιμων σακχάρων. Άνυδρη ή πυκνή αμμωνία διαβρέχει το υπόστρωμα σε προκαθορισμένες συνθήκες θερμοκρασίας και πίεσης. Η κατάσταση αυτή διατηρείται για κάποιο χρονικό διάστημα (χρόνος παραμονής) προτού πραγματοποιηθεί εκτόνωση πίεσης. Ως αποτέλεσμα, προκύπτει η εξάτμιση της αμμωνίας, η οποία μπορεί να συλλεχθεί, να ανακυκλωθεί και να επαναχρησιμοποιηθεί. Αυτή η μέθοδος προεπεξεργασίας είναι η καλύτερη προκειμένου να αποφευχθεί η προσρόφηση της κυτταρίνης στην λιγνίνη (**Ravindran and Jaiswal, 2016**).

5.2.1.2.3.5. Έκρηξη υπερκρίσιμου διοξειδίου του άνθρακα- CO₂ (Super critical CO₂ explosion)

Το υπερκρίσιμο διοξείδιο του άνθρακα είναι μια τροποποιημένη μέθοδος έκρηξης ατμού που χρησιμοποιεί διοξείδιο του άνθρακα αντί για ατμοσφαιρικό αέρα. Συγκεκριμένα, ποσοστό βιομάζας διαβρέχεται και τροφοδοτείται στον αντιδραστήρα, στον οποίο στη συνέχεια η πίεση ανεβαίνει σταδιακά με τη βοήθεια του υπερκρίσιμου CO₂. Η κατάσταση αυτή διατηρείται στον αντιδραστήρα για κάποιο χρονικό διάστημα και ακολουθεί εκτόνωση της πίεσης που έχει ως αποτέλεσμα την κλασμάτωση της λιγνοκυτταρινούχου βιομάζας. Το υπερκρίσιμο διοξείδιο του άνθρακα διαχέεται εντός της κρυσταλλικής δομής της κυτταρίνης και πραγματοποιείται έκρηξη. Με τον τρόπο αυτό, διαταράσσεται το κυτταρικό τοίχωμα της βιομάζας, ενώ διευκολύνεται η πρόσβαση των κυτταρινολυτικών ενζύμων προς το υπόστρωμα (**Ravindran and Jaiswal, 2016**).

5.2.1.2.3.6. Προεπεξεργασία με υδροξυλικές ρίζες σε συνδυασμό με προεπεξεργασία με θερμό νερό (Integrated hydroxyl radicals and hot water pretreatment -IHRWT)

Η προεπεξεργασία αυτή αποτελεί έναν συνδυασμό προεπεξεργασίας με θερμό νερό και προεπεξεργασίας που χρησιμοποιεί ρίζες υδροξυλίου. Οι ρίζες υδροξυλίου έχουν την ικανότητα να διασπούν τους δεσμούς υδρογόνου ανάμεσα στη λιγνίνη και στους υδρογονάνθρακες. Σε πείραμα που πραγματοποιήθηκε (**Gao et al, 2015**), υδροξυλικές ρίζες παρήχθησαν με ανάμιξη H₂O₂ (0.018%) και FeSO₄ (11.9mM). Η βιομάζα αρχικά υποβάλλεται σε προεπεξεργασία με θερμό νερό (100°C/30min), με την οποία το σύμπλοκο πολυμερικής δομής της λιγνοκυτταρινούχου ύλης διασπάται. Ως αποτέλεσμα, εκτίθενται η λιγνίνη και οι πολυσακχαρίτες, διευκολύνοντας την ενζυμική υδρόλυση της κυτταρίνης (**Ravindran and Jaiswal, 2016**).

5.2.1.2.4. Βιολογική προεπεξεργασία

Τα βιολογικά συστήματα προεπεξεργασίας που βασίζονται σε βιολογικούς παράγοντες διευκολύνουν την απολιγνίνωση της λιγνοκυτταρινούχου βιομάζας και συνεπώς την ενζυμική υδρόλυση. Σε αντίθεση με φυσικές και χημικές μεθόδους προεπεξεργασίας, η βιολογική προεπεξεργασία δεν περιλαμβάνει υψηλή θερμοκρασία ή / και πίεση και δεν απαιτεί οξέα, αλκάλια ή οποιαδήποτε είδη αντιδραστηρίων. Επιπλέον, η διαδικασία δεν δημιουργεί οποιαδήποτε ανεπιθύμητα παραπροϊόντα. Ωστόσο, το μειονέκτημα της χρήσης βιολογικών στρατηγικών προεπεξεργασίας είναι το γεγονός ότι υπάρχει περιορισμένος έλεγχος της όλης διαδικασίας. Ακόμα, είναι μια αργή διαδικασία (**Ravindran and Jaiswal, 2016**), χαρακτηριστικό το οποίο επηρεάζει το χρόνο παραμονής, επομένως και το μέγεθος που απαιτείται για τον αντιδραστήρα (**Van and Pletscke, 2012**). Παρ' όλα αυτά, μπορεί κανείς να χρησιμοποιήσει αυτές τις τεχνικές προεπεξεργασίας για μικρότερο κόστος κεφαλαίου και περιβαλλοντικά οφέλη. Οι βιολογικές διαδικασίες προεπεξεργασίας

μπορούν σε γενικές γραμμές να ταξινομηθούν σε σχέση με τη χρήση μικροβιακών κοινωνιών, την επεξεργασία με μύκητες και την ενζυμική επεξεργασία (Ravindran and Jaiswal, 2016).

5.2.1.2.4.1. Μικτή Μικροβιακή καλλιέργεια (Microbial consortium)

Η ιδέα της χρήσης μικτών μικροβιακών καλλιεργειών για την επεξεργασία λιγνινοκυτταρίνης γεννάται από το γεγονός ότι η χρήση ενός μόνο είδους μικροβίου για την απομάκρυνση της λιγνίνης δεν συμφωνεί με τη διαδικασία που ακολουθείται στη φύση. Η αποικοδόμηση λιγνοκυτταρινούχου βιομάζας είναι μια προσπάθεια συνεργασίας πολλών ειδών μικροβίων ανεξάρτητα από τις αερόβιες/ αναερόβιες συνθήκες. Η χρήση ομάδας μικροβίων για την απολιγνίνωση εξαλείφει πολλά μειονεκτήματα που συναντώνται στην προεπεξεργασία με ένα είδος μικροβίου, όπως την καταστολή του μεταβολίτη και τη ρύθμιση της ανάδρασης (Ravindran and Jaiswal, 2016).

5.2.1.2.4.2. Προεπεξεργασία με χρήση μυκήτων (Pre-treatment using fungal species)

Η απολιγνίνωση της βιομάζας με τη χρήση διαφόρων ειδών μυκήτων είναι μια μέθοδος που έχει γνωρίσει μεγάλη ερευνητική δραστηριότητα τα τελευταία χρόνια. Οι μύκητες λευκής σήψης είναι μια ομάδα βασιδιομυκήτων που ευδοκούν σε ξυλώδη ύλη. Είναι ικανοί για τη διάσπαση και την απομετάλλωση της λιγνίνης. Οι ενέργειες αυτές πραγματοποιούνται με τη βοήθεια δύο ομάδων ενζύμων, την ομάδα των οξειδωτικών λιγνινολυτικών ενζύμων που δρουν στους φαινολυκούς δακτυλίους στη λιγνίνη και το σύστημα των υδρολυτικών ενζύμων που αποδομούν την κυτταρίνη και την ημικυτταρίνη προκειμένου να απελευθερωθούν ζυμώσιμα σάκχαρα. Το σύστημα των οξειδωτικών ενζύμων αποτελείται από τρία κύρια ένζυμα: την υπεροξειδάση της λιγνίνης, τις υπεροξειδάσες εξαρτημένες του μαγγανίου και τις λακκάσες. Οι μύκητες καστανής σήψης είναι μια άλλη ομάδα μυκήτων αποδόμησης λιγνοκυτταρινούχου ύλης που χρησιμοποιεί ένζυμα για την υποβάθμιση της κυτταρίνης και των ημικυτταρινανών με ελάχιστη απομάκρυνση της λιγνίνης. Θεωρείται ότι η απομάκρυνση της λιγνίνης από τους μύκητες καστανής σήψης ακολουθεί μη-ενζυμικό μονοπάτι με χρήση υδροξυλικών ριζών (Ravindran and Jaiswal, 2016).

5.2.1.2.4.3. Ενζυμική προεπεξεργασία (Enzymatic pre-treatment)

Καθώς οι μέθοδοι προεπεξεργασίας με μύκητες χρησιμοποιούν μύκητες λευκής σήψης για την απομάκρυνση της λιγνίνης από τη βιομάζα, η ενζυμική προεπεξεργασία χρησιμοποιεί καθαρά ένζυμα που προέρχονται από τους ίδιους οργανισμούς για την επίτευξη κοινού στόχου. Η λακκάση, το υπεροξειδίο του μαγγανίου και το βερσατικό υπεροξειδίο είναι τα ένζυμα που χρησιμοποιούνται εκτενώς για τη επεξεργασία του λιγνοκυτταρινικού υποστρώματος. Οι λακκάσες είναι φαινολοξειδάσες που περιέχουν πολλαπλά ιόντα χαλκού και καταλύουν την οξείδωση των φαινολών, ανιλινών και αρωματικών θειολών. Η απομάκρυνση της φαινόλης από τη λακκάση ενισχύει την ανάπτυξη μικροβίων, βελτιώνει την ικανότητα ζύμωσης και μειώνει το χρόνο υστέρησης. Το υπεροξειδίο εξαρτημένο του μαγγανίου είναι ένα άλλο ένζυμο που παράγεται από λευκής σήψης μύκητες, το οποίο εκμεταλλεύεται το μαγγάνιο στα ξυλώδη υποστρώματα. Από την άλλη, η αδυναμία των καστανής σήψης μυκήτων για την παραγωγή αυτού του ενζύμου, τους έχει υποχρεώσει να εξαρτάται από τις ρίζες υδροξυλίου και την αντίδραση Fenton η υποβάθμιση της λιγνίνης. Η υπεροξειδάση του μαγγανίου περιέχει ένα συστατικό αίμης με ένα καταλυτικό κύκλο και είναι επιλεκτική σε ιόντα Mn^{2+} για την οξείδωση. Η οξείδωση του Mn^{2+} σε Mn^{3+} συνδέεται με την αναγωγή του υπεροξειδίου του υδρογόνου σε νερό. Το Mn^{3+} είναι ιδιαίτερα δραστικό είδος ικανό να αλληλεπιδράσει με φαινόλες, μη φαινολικές αρωματικές ενώσεις και μακράς αλυσίδας ακόρεστα λιπαρά οξέα που οδηγούν σε διάσπαση δεσμών της λιγνίνης (Ravindran and Jaiswal, 2016).

5.2.1.2.5. Άλλες σχετικές μέθοδοι προεπεξεργασίας

5.2.1.2.5.1. Προεπεξεργασία με θερμική διαστολή (Thermal expansion pretreatment)

Η προεπεξεργασία κυμαινόμενης θερμότητας συνιστά μια διαδικασία δύο σταδίων που περιλαμβάνει το βρασμό της βιομάζας σε υψηλή πίεση που ακολουθείται από ταχεία αποσυμπίεση. Η θερμοκρασία κυμαίνεται στους 170-200 °C και εφαρμόζεται για χρόνο παραμονής 0-60 λεπτά. Η μέθοδος αυτή πραγματοποιείται σε εύρος θερμοκρασιών 200-300 °C. Μπορεί να κατηγοριοποιηθεί ως υγρή και ξηρή ανάλογα με την παρουσία και την απουσία ύδατος. Η υγρή προεπεξεργασία με θερμική διαστολή περιλαμβάνει ζεστό συμπιεσμένο νερό σε θερμοκρασίες από 200-260 °C σε αντιδραστήρα πίεσης. Στην ξηρή μέθοδο, επίσης γνωστή ως πυρόλυση χαμηλής θερμοκρασίας, η βιομάζα εκτίθεται σε περιβάλλον με αδρανές αέριο, όπως το άζωτο, σε θερμοκρασίες κυμαινόμενες από 200 έως 300 °C (**Ravindran and Jaiswal, 2016**).

5.2.1.2.5.2. Προεπεξεργασία με μικροκύματα (Microwave pretreatment)

Η προεπεξεργασία με μικροκύματα είναι μια τροποποιημένη έκδοση της θερμικής προεπεξεργασίας. Αντίθετα με την θερμική προεπεξεργασία, η θερμότητα προσφέρεται άμεσα στη βιομάζα με τη μορφή της ακτινοβολίας μικροκυμάτων η οποία μετατρέπεται σε θερμική ενέργεια. Τα μικροκύματα διαπερνούν το υλικό και θερμαίνουν το σύνολο του όγκου από το εσωτερικό. Η διαδικασία είναι ταχεία και ομοιόμορφη στη φύση. Τα πλεονεκτήματα της διαδικασίας αυτής δεν περιορίζονται στην ομοιόμορφη θέρμανση και τη μικρότερη απαίτηση χρόνου, αλλά στην αύξηση της ενεργειακής απόδοσης, στην ελεγχόμενη θέρμανση και τον εξαιρετικό έλεγχο της συνολικής διαδικασίας (**Ravindran and Jaiswal, 2016**).

Μέθοδοι Προεπεξεργασίας				
Φυσική	Χημική	Φυσικοχημική	Βιολογική	Άλλες μέθοδοι
Λείανση και άλεση Προεπεξεργασία με υπερήχους Προεπεξεργασία με εξώθηση	Προεπεξεργασία με χρήση αραιού οξέος Όξινη προεπεξεργασία με ακετόνη Προεπεξεργασία με χρήση ιοντικών υγρών Προεπεξεργασία με αλκαλικό υπερμαγγανικό κάλιο Προεπεξεργασία με οργανικό διαλύτη Προεπεξεργασία με χρήση μεταλλικών χλωριδίων	Έκρηξη ατμού Προεπεξεργασία με θερμό ατμό Ammonia fibre expansion (AFEX) Έκρηξη υπερκρίσιμου διοξειδίου του άνθρακα Προεπεξεργασία με υδροξυλικές ρίζες σε συνδυασμό με Προεπεξεργασία με θερμό νερό Προεπεξεργασία με πλάσμα Υγρή οξειδωση	Μικτή μικροβιακή καλλιέργεια Προεπεξεργασία με χρήση μυκήτων	Προεπεξεργασία με θερμική διαστολή Προεπεξεργασία με μικροκύματα

Εικόνα 12: Συνοπτική παρουσίαση των μεθόδων προεπεξεργασίας βιομάζας (**Ravindran and Jaiswal, 2016**).

5.3. Σχηματισμός παρεμποδιστών

Ενώσεις που σχηματίζονται κατά τη διαδικασία προεπεξεργασίας λιγνοκυτταρίνης μπορεί να αποδειχθεί ότι αναστέλλουν την ενζυμική δράση, τη μικροβιακή ανάπτυξη και το μεταβολισμό. Πιθανές ανασταλτικές χημικές ουσίες που μπορεί να απελευθερωθούν από κυτταρίνη, ημικυτταρίνη και λιγνίνη όταν χρησιμοποιούνται θερμοχημικές προεπεξεργασίες είναι τα αλειφατικά οξέα, όπως οξικό, μυρμηκικό και λεβουλινικό οξύ, οι φουραλδεΐδες, όπως φουρφουράλη και 5- υδροξυμεθυλοφουρφουράλη (HMF) και τα ουρονικό οξύ, 4-υδροξυβενζοϊκό οξύ, βανιλλικό οξύ, βανιλίνη, φαινόλη, κινναμαλδεΐδη, και φορμαλδεΐδη. Τα παράγωγα φουρανίου σχηματίζονται με θερμική διάσπαση πεντοζών και εξοζών. Οι δύο εκπρόσωποι που προέρχονται από φουράνιο, η 2-φουραλδεΐδη (φουρφουράλη) και η υδροξυλ-μεθυλ-φουρφουράλη, προκύπτουν από την αποσύνθεση σακχάρων πεντοζών και εξοζών στην προεπεξεργασία της λιγνοκυτταρινικής βιομάζας με αραιό θειικό οξύ. Τα παράγωγα φουρανίου είναι επιζήμια για τη δραστηριότητα των διαφόρων ενζύμων που εμπλέκονται σε μικροβιακό μεταβολισμό, όπως η εξοκινάση, η αλδολάση, η φωσφοφρουκτοκινάση, η αφυδρογονάση τριόζης και η αλκοολική αφυδρογονάση [Behera et al, 2014]. Τα αλειφατικά οξέα είναι υποπροϊόντα της θερμικής επεξεργασίας σακχάρων με οξύ. Η λιγνοκυτταρινική υδρολάση που προέρχεται από αλειφατικά οξέα περιλαμβάνει τα: οξικό οξύ, μυρμηκικό οξύ και λεβουλινικό οξύ. Το οξικό οξύ σχηματίζεται με δύο τρόπους: α) οι ακετυλομάδες στην ημικυτταρίνη διαχωρίζονται κατά τη διάρκεια της υδρόλυσης για να σχηματιστεί οξικό οξύ, β)ως υποπροϊόν της διαδικασίας ζύμωσης. Το μυρμηκικό οξύ είναι το προϊόν διάσπασης της φουρφουράλης ενώ το λεβουλινικό οξύ προκύπτει από την HMF. Οι φαινολικές ενώσεις αποτελούν ένα από τα παράγωγα της αποικοδόμησης της λιγνίνης, όταν η λιγνοκυτταρινούχος ύλη υφίσταται θερμική προεπεξεργασία με όξινη κατάλυση. Οι φαινολικές ενώσεις παράγονται από τη διάσπαση των σακχάρων. Αρκετές πρόσφατες έρευνες έδειξαν ότι οι φαινολικές ενώσεις αναστέλλουν την ανάπτυξη των μικροοργανισμών, ωστόσο η ακριβής διαδικασία αναστολής της ανάπτυξης και της ζύμωσης που έχει διαπιστωθεί, δεν έχουν ακόμη διαλευκανθεί (Ravindran and Jaiswal, 2016).

Υπάρχουν διάφορες στρατηγικές για την αποφυγή των επιπτώσεων των παρεμποδιστών, ωστόσο θεωρητικά υπάρχουν τέσσερις τρόποι για το σκοπό αυτό (Ravindran and Jaiswal, 2016):

- Αποφυγή του σχηματισμού παρεμποδιστών κατά τη διάρκεια της ζύμωσης και της υδρόλυσης
- Αποτοξίνωση του υδρολύματος πριν από την ζύμωση
- Ανάπτυξη γενετικά τροποποιημένων μικροοργανισμών που μπορούν να αντισταθούν στον σχηματισμό αναστολέων
- Μετατροπή των τοξικών ενώσεων σε ουδέτερα προϊόντα.

5.4. Μύκητες που συμμετέχουν στην προεπεξεργασία λιγνοκυτταρινούχου βιομάζας

Μύκητες λευκής, καστανής, και μαλακής σήψης χρησιμοποιούνται για την αποδόμηση της λιγνίνης, της κυτταρίνης και των ημικυτταρινών. Οι μύκητες καστανής σήψης επιτίθενται κυρίως στην κυτταρίνη, όταν οι μύκητες λευκής και μαλακής σήψης επιτίθενται και στη λιγνίνη και στην κυτταρίνη. Οι μύκητες λευκής σήψης είναι πιο αποτελεσματικοί από τους βασιδιομύκητες για βιοπροεπεξεργασία λιγνοκυτταρινούχου βιομάζας (Godliving and Mtui, 2009). Οι μύκητες που παράγουν λιγνοκυτταρινολυτικά ένζυμα είναι ευρέως διαδεδομένοι και περιλαμβάνουν είδη ασκομυκήτων, βασιδιομυκήτων συμπεριλαμβανομένων των μυκήτων λευκής σήψης, καστανής σήψης και τέλος κάποια αναερόβια είδη τα οποία αποδομούν την κυτταρίνη. Η αποδόμηση της βιομάζας από τέτοιους μύκητες γίνεται με πολύπλοκα μίγματα κυτταρινασών, ημικυτταρινασών και λιγνινασών, αντανακλώντας την πολυπλοκότητα των υλικών. Οι κυτταρινάσες και οι ημικυτταρινάσες ανήκουν σε ομάδα ενζύμων γνωστή ως γλυκοζιτικές υδρολάσες (ΓΥ). Μέχρι τώρα πάνω από 2500 γλυκοζιτικές υδρολάσες έχουν κατηγοριοποιηθεί σε 115 οικογένειες. Ενδιαφέρον παρουσιάζει το γεγονός ότι η ίδια οικογένεια μπορεί να περιέχει μέλη από βακτήρια και μύκητες με πολλές διαφορετικές δραστηριότητες και διαφορετική εκλεκτικότητα σε υποστρώματα. Παρόλα αυτά, οι κυτταρινάσες των μυκήτων, που υδρολύουν β-1,4-γλυκοζιτικούς δεσμούς, έχουν βρεθεί ως επί το πλείστον σε λίγες οικογένειες γλυκοζιτικών κυτταρινασών, περιλαμβανομένων των 5,6,7,8,9,12,44,45,48,61 και 74 [Dashtban et al.,2009].

Πίνακας 3: Ενδεικτικά στοιχεία μυκήτων που έχει διαπιστωθεί ότι παράγουν λιγνοκυτταρινικά ένζυμα στα υποστρώματα στα οποία αναπτύσσονται [Dashtban et al.,2009].

	Είδος	Στέλεχος	Ένζυμα	Υπόστρωμα
Anaerobic fungi (Extracellular lignocellulolytic enzymes)	Ασκομύκητες	T.reesei	Κυτταρινάσες (CMC, CBH, CGL), Ημικυτταρινάσες (ξυλανάσες)	Άχυρο σίτου
		T. harzianum	Κυτταρινάσες (CMC, CBH), β-1,3-γλυκανάση	Πίτουρο σίτου (Wheat bran), άχυρο σίτου
		A.niger	Κυτταρινάσες, ξυλανάσες	Ζαχαροκάλαμο από βαγγάση
		Pestalotiopsis sp.	Κυτταρινάσες (CBCase, CBM), Λακκάση	Δασικά υπολείμματα
	Βασιδιομύκητες	P.chrysosporium	Κυτταρινάσες (CMC, CBH, CGL), Ημικυτταρινάσες (xylanase),Υπεροξειδάσες της λιγνίνης (LiP), Υπεροξειδάσες εξερτημένες του μαγγανίου (MnP)	Βρώμη, σπόροι σταφυλιών, ξυλώδη βιομάζα, πίτουρο κριθαριού (barley bran)
		F. palustris	Κυτταρινάσες (CMCase, CBH, BGL)	Μικροκρυσταλλική κυτταρίνη

	Είδος	Στέλεχος	Ένζυμα	Υπόστρωμα
Anaerobis rumen fungi (Chytridiomycetes) (Cell-wall associated lignocellulolytic enzymes, "cellulosome")	Anaeromyces	Anaeromyces mucronatus 543	Κυτταρινάση (CMCase), Ημικυτταρινάση (ξυλανάση)	Orchard grass hay
	Caecomyces	Caecomyces communis	Κυτταρινάση (CMCase), Ημικυτταρινάσες (ξυλανάση, β-D-ξυλοζιδάση)	Maize stem
	Cyllamyces	Cyllamyces	Κυτταρινάσες, ξυλανάσες	Grass silage
	Neocallimastix	Neocallimastix frontalis	Κυτταρινάσες, ημικυτταρινάσες (ξυλανάση, β-γαλακτοζιδάση)	Άχυρο σίτου
	Promyces	Piromyces sp.	Κυτταρινάσες (CMCase, CBH, β-glucosidase),	Maize stem

Η αποδόμηση με μύκητες συμβαίνει εξωκυτταρικά, σε συνεργασία με το εξωτερικό στρώμα περιβλήματος κυττάρου, λόγω της αδιαλυτότητας της λιγνίνης, κυτταρίνης και των ημικυτταρινών. Οι μύκητες έχουν δύο τύπους εξωκυτταρικών ενζυμικών συστημάτων: το υδρολυτικό σύστημα, το οποίο παράγει υδρολάσες που είναι υπεύθυνες για την υποβάθμιση πολυσακχαριτών και ένα μοναδικό σύστημα οξειδωτικού και εξωκυτταρικού λιγνινολυτικού συστήματος, το οποίο αποδομεί τη λιγνίνη και ανοίγει τους φαινολυκούς δακτυλίους. Διάφοροι μικροοργανισμοί, κυρίως μύκητες, έχουν απομονωθεί και ταυτοποιηθεί ως λιγνινολυτικοί οργανισμοί. Δεν είναι αποδεδειγμένο για τους λευκής σήψης μύκητες, ότι είναι ικανοί να χρησιμοποιήσουν τη λιγνίνη ως μοναδική πηγή άνθρακα και ενέργειας. Ωστόσο, η διάσπαση της λιγνίνης είναι απαραίτητη για την πρόσβαση σε κυτταρίνη και ημικυτταρίνες (Sánchez, 2009).

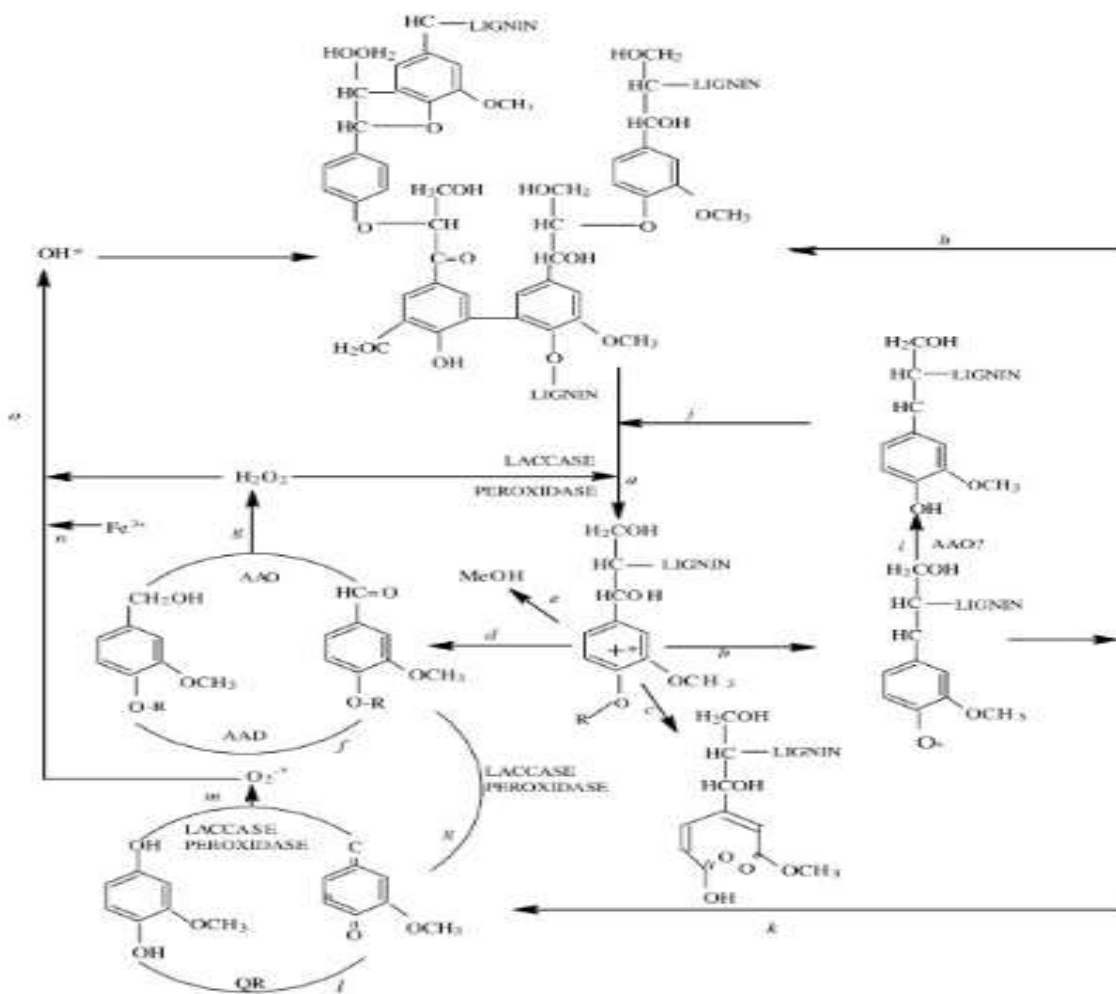
6. Μηχανισμοί αποδόμησης

6.1. Βιοαποδόμηση λιγνίνης

Η λιγνίνη, το πιο άφθονο ανανεώσιμο αρωματικό πολυμερές στη φύση, αποτελείται από μη φαινολικές (80-90%) και φαινολικές δομές. Οι μύκητες αποδομούν την λιγνίνη με σύμπλοκο ενζύμων που ονομάζονται λιγνινάσες. Αυτές περιλαμβάνουν δύο οικογένειες λιγνινολυτικών ενζύμων: i) τις φαινολυκές οξειδάσες (λακκάση) και ii) τις υπεροξειδάσες (υπεροξειδάσες τις λιγνίνης- LiP και υπεροξειδάσες εξαρτημένες του μαγγανίου- MnP) (Dashtban et al., 2009).

Τα LiP και MnP οξειδώνουν το υπόστρωμα σε δύο διαδοχικά στάδια οξείδωσης ενός ηλεκτρονίου με σχηματισμό ρίζας ως ενδιάμεσο κατιόν. Ανακαλύφθηκαν στα μέσα της δεκαετίας του 1980 στον μύκητα *P. chrysosporium* και αναφέρθηκαν ως λιγνάσες, λόγω της υψηλής οξειδοαναγωγικής τους αξίας. Τα LiP αποικοδομούν τις μη-φαινολικές μονάδες της λιγνίνης (πάνω από 90% του πολυμερούς), όταν τα MnP παράγουν Mn^{+3} , τα οποία ενεργούν ως οξειδωτικό που διαχέεται εύκολα σε φαινολικές ή μη-φαινολικές μονάδες λιγνίνης μέσω αντιδράσεων υπεροξειδωσής λιπιδίων. Οι λακκάσες είναι οξειδάσες κυανού χαλκού, που καταλύουν την αντίδραση οξείδωσης ενός ηλεκτρονίου φαινολικών και άλλων υποστρωμάτων πλούσιων σε ελεύθερα ηλεκτρόνια. Πρόσφατα και άλλα ένζυμα παρατηρήθηκε ότι σχετίζονται με την αποδόμηση της λιγνίνης. Μερικά από αυτά είναι η αρυλ-αλκοολική οξειδάση (AAO) που περιγράφεται στον *Pleurotus eryngii* και σε άλλους μύκητες και η οξειδάση γλυοξάλη στον μύκητα *P. Chrysosporium*. Οι μυκητιακές αρυλ-αλκοολικές αποϋδρογονάσες (AAA) και οι αναγωγάσες της κινόνης (AK) σχετίζονται επίσης με την αποδόμηση της λιγνίνης. Όπως φαίνεται στο παρακάτω σχήμα (σχήμα 13) οι λακκάσες ή οι υπεροξειδάσες (LiP και MnP) που παράγονται από λευκούς σήψης μύκητες οξειδώνουν το πολυμερές της λιγνίνης, μέσω της παραγωγής αρωματικών ριζών (a). Αυτό εξελίσσεται σε διάφορες μη-ενζυμικές αντιδράσεις, που περιλαμβάνουν τη διάσπαση C-4-αιθέρα (b), τη διάσπαση αρωματικών δακτυλίων (c), τη διάσπαση των Ca-Cb(d) και την απομεθοξυλίωση (e). Οι αρωματικές αλδεΐδες, που απελευθερώνονται από τη διάσπαση των Ca-Cb στη λιγνίνη ή συνθέτονται από τον μύκητα (f,g), είναι το υπόστρωμα για τη δημιουργία H_2O_2 από AAO σε κυκλικές οξειδοαναγωγικές αντιδράσεις (εικόνα 13). Οι φαινόξυ ρίζες από τη διάσπαση των C-4-αιθέρων (b) μπορούν να επαναπολυμεριστούν στο πολυμερές της λιγνίνης (h), εφόσον πρώτα δεν έχουν μειωθεί από οξειδάσες στις φαινολικές ενώσεις (j). Οι σχηματισμένες φαινολικές ενώσεις μπορούν να επανοξειδωθούν από λακκάσες ή υπεροξειδάσες (j). Οι φαινόξυ ρίζες μπορούν επίσης να υποβληθούν σε διάσπαση των Ca-Cb (k) δίνοντας π-κινόνες. Οι κινόνες από το g ή / και k συμβάλλουν στην ενεργοποίηση του οξυγόνου σε κυκλικές οξειδοαναγωγικές αντιδράσεις συσχετίζοντας την ενεργοποίηση οξυγόνου στις αντιδράσεις αυτές με τις AK, τις λακκάσες και τις υπεροξειδάσες (l, m). Αυτό έχει ως

αποτέλεσμα τη μείωση του τρισθενούς σιδήρου που υπάρχει στην ξυλώδη βιομάζα. Η δράση αυτή πραγματοποιείται είτε έμμεσα μέσω ριζών κατιόντων υπεροξειδίου, είτε άμεσα με ημικινονικές ρίζες και την οξείδωσή τους με την ταυτόχρονη μετατροπή του H_2O_2 σε ελεύθερη υδροξυλική ρίζα (OH) (o). Η ρίζα αυτή είναι τόσο εύκολο να κινηθεί και τόσο ισχυρά οξειδωτική, ώστε μπορεί να δράσει στη λιγνίνη (p), όταν το μικρό μέγεθος των πόρων του ακόμα άθικτου κυτταρικού τοιχώματος εμποδίζει τη διείσδυση των λιγνοκυτταρικών ενζύμων. Στη συνέχεια, η αποδόμηση της λιγνίνης συμβαίνει με τον τρόπο που μόλις περιγράφηκε παραπάνω. Στα τελικά στάδια, απλά προϊόντα από την αποδόμηση της λιγνίνης εισάγονται στις μυκητιακές υφές και ενσωματώνονται μέσα στις ενδοκυτταρικές καταβολικές διαδρομές. Οι φερουλόυλ- και π-κουμαρόυλ-εστεράσες είναι ικανές να απελευθερώσουν μονάδες φερουλόυλ- και π-κουμαρόυλ-, ενώ παίζουν σημαντικό ρόλο στη βιοδιάσπαση των ανθεκτικών κυτταρικών τοιχωμάτων στην αγρωστώδη βιομάζα. Τα ένζυμα αυτά δρουν συνεργατικά με τις ξυλανάσες προκειμένου να διαρρήξουν το δεσμό ημικυτταρίνης-λιγνίνης, χωρίς την ανοργανοποίηση της λιγνίνης. Ως εκ τούτου, η αποδόμηση της ημικυτταρίνης είναι απαραίτητη πριν ξεκινήσει η αποτελεσματική απομάκρυνση της λιγνίνης (Sánchez, 2009).



Εικόνα 13: Μηχανισμός αποδόμησης λιγνίνης (Sánchez, 2009).

6.2. Υδρόλυση κυτταρινών και ημικυτταρινών.

Μετά την προεπεξεργασία, η κυτταρίνη και η ημικυτταρίνη υδρολύονται σε μονομερή σάκχαρα (εξόζες και πεντόζες) με χρήση κυτταρινασών και ημικυτταρινασών αντίστοιχα. Πολλοί μύκητες είναι ικανοί να παράξουν εξωκυτταρικά κυτταρινάσες και ημικυτταρινάσες. Τα ένζυμα δρουν καλύτερα σε υψηλή θερμοκρασία και χαμηλό pH στην υδρόλυση, εξαιτίας του γεγονότος ότι οι μέθοδοι προεπεξεργασίας λειτουργούν σε περιβάλλον όξινο και θερμό. Επιπλέον, τα θερμοάνοχα ένζυμα έχουν διάφορα πλεονεκτήματα συμπεριλαμβανομένων της υψηλής ειδικής δραστηριότητας και της υψηλής σταθερότητας, δύο χαρακτηριστικά που βελτιώνουν εξ ολοκλήρου την υδρολυτική τους συμπεριφορά [Dashtban et al.,2009].

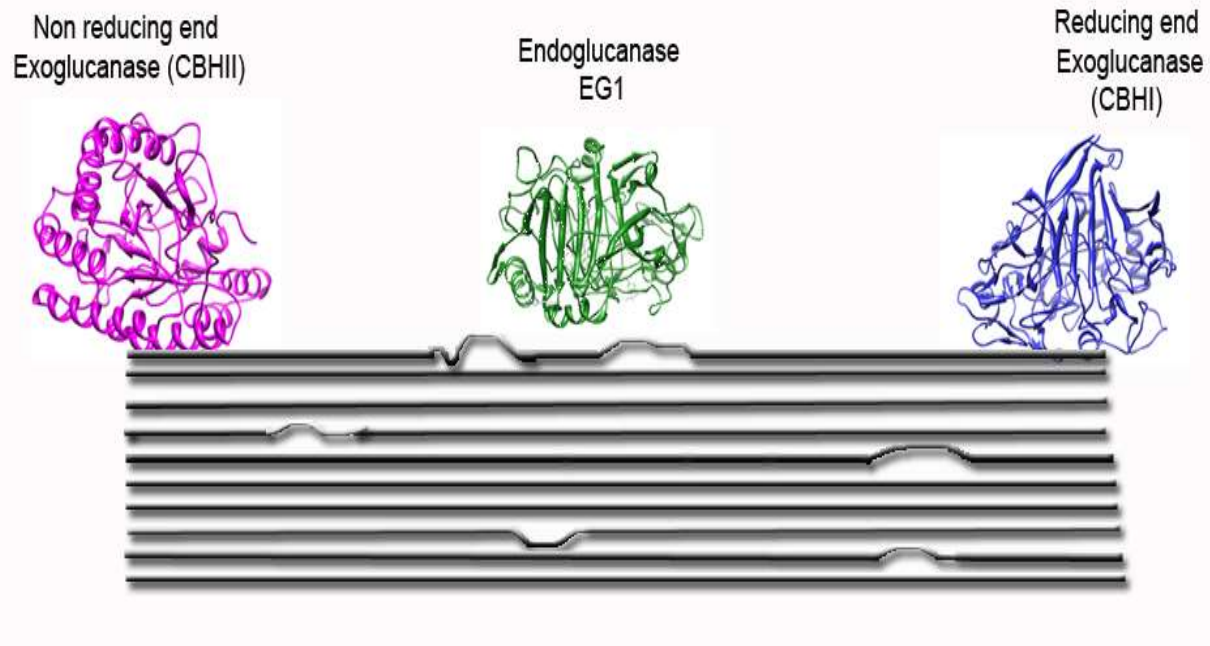
6.2.1. Αποδόμηση κυτταρίνης

6.2.1.1. Εξωκυτταρικές κυτταρινάσες μυκήτων

Η υδρόλυση του β-1,4-γλυκοζιτικού δεσμού στην κυτταρίνη επιτυγχάνεται με ένζυμα γνωστά ως κυτταρινάσες, τα οποία χρησιμοποιούν δύο διαφορετικούς καταλυτικούς μηχανισμούς, το μηχανισμό της διατήρησης και της αναστροφής. Όλες οι γλυκοζιτικές υδρολάσες 12 (ΓΥ) κυτταρινάσες, για παράδειγμα, υδρολύουν τον γλυκοζιτικό δεσμό με το μηχανισμό διατήρησης, όταν οι κυτταρινάσες της οικογένειας 6 χρησιμοποιούν τον μηχανισμό αναστροφής. Και στους δύο μηχανισμούς, δύο καταλυτικές καρβοξυλικές ομάδες καταλύουν την αντίδραση με όξινη κατάλυση. Πολλά διαφορετικά είδη μυκήτων έχουν την ικανότητα να αποδομούν την κυτταρίνη παράγοντας εξωκυτταρικά ένζυμα αποδόμησης της κυτταρίνης, συμπεριλαμβανομένων ενζύμων ενδο-διάσπασης (ενδογλουκανάσες-EG) και έξω-διάσπασης (κελλοβιοϋδρολάσες ή εξωγλουκανάσες-CBH). Οι ενδογλουκανάσες υδρολύουν τυχαία τους γλυκοζιδικούς δεσμούς στο εσωτερικό των αλυσίδων κυτταρίνης, ενώ οι κελλοβιοϋδρολάσες δρουν κατά προτίμηση στα άκρα της αλυσίδας. Τα προϊόντα της ενζυμικής αντίδρασης είναι κυρίως ένας διασακχαρίτης γνωστός ως κελλοβιόζη και, σε μικρότερο βαθμό, κελλο-ολιγοσακχαρίτες. Στη συνέχεια, οι κελλο-ολιγοσακχαρίτες υδρολύονται περαιτέρω προς απελευθέρωση D-γλυκόζης από μια τρίτη ομάδα ενζύμων που ονομάζονται β-γλυκοζιδάσες. Οι περισσότερες κυτταρινάσες διαθέτουν μια μικρή μονάδα πρόσδεσης σε σακχάρα (CBM-carbohydrate binding module ή CBD-carbohydrate binding domain), η οποία είναι συνδεδεμένη στην καταλυτική περιοχή με έναν ευλύγιστο δεσμό. Η μονάδα αυτή είναι υπεύθυνη για τη δέσμευση του ενζύμου στην κρυσταλλική περιοχή της κυτταρίνης, προκειμένου να αυξηθεί η ενεργότητα του ενζύμου [Dashtban et al.,2009].

6.2.1.1.1. Ενδογλουκανάσες

Οι ενδογλουκανάσες (EG), που αναφέρονται και ως καρβοξυμέθυλ-κυτταρινάσες (CMCs), διασπούν εσωτερικούς δεσμούς στις άμορφες περιοχές της κυτταρίνης. Με τον τρόπο αυτό παράγουν διάφορων μεγεθών ολιγοσακχαρίτες και δημιουργούν νέα άκρα στην αλυσίδα της κυτταρίνης τα οποία έλκουν εξωγλουκανάσες. Η κυτταρινολυτική διαδικασία ξεκινά με ενδογλουκανάσες που διασπούν τυχαία εσωτερικούς δεσμούς στην άμορφη περιοχή της κυτταρίνης και δημιουργούν αναγωγικά και μη αναγωγικά άκρα, ευαίσθητα στη δράση εξωγλουκανασών (εικόνα 14). Η διαδικασία που μόλις αναφέρθηκε ονομάζεται πρωτογενής υδρόλυση. Η πρωτογενής υδρόλυση από ενδο και εξω-κυτταρινάσες λαμβάνει χώρα στην επιφάνεια στερεών υποστρωμάτων και απελευθερώνει διαλυτά σάκχαρα με βαθμό πολυμερισμού έως 6, σε υγρή φάση. Η δευτερογενής υδρόλυση περιλαμβάνει κυρίως την υδρόλυση της κελλοβιόζης σε δύο μονάδες γλυκόζης με τη δράση της β-γλυκοζιδάσης. Ωστόσο, μερικές φορές οι β-γλυκοζιδάσες υδρολύουν και μεγαλύτερες κελλοδεξτρίνες. Οι συνδυασμένες δράσεις των ενδογλουκανασών και εξωγλουκανασών τροποποιούν τα χαρακτηριστικά της επιφάνειας της κυτταρίνης με την πάροδο του χρόνου, με αποτέλεσμα ταχείες μεταβολές στο ρυθμό υδρόλυσης (Quiroz-Castañeda and Folch-Malloi 2013). Οι περισσότερες ενδογλουκανάσες λειτουργούν βέλτιστα σε τιμές pH 4-5 και εύρος θερμοκρασιών 40-70°C [Dashtban et al.,2009].

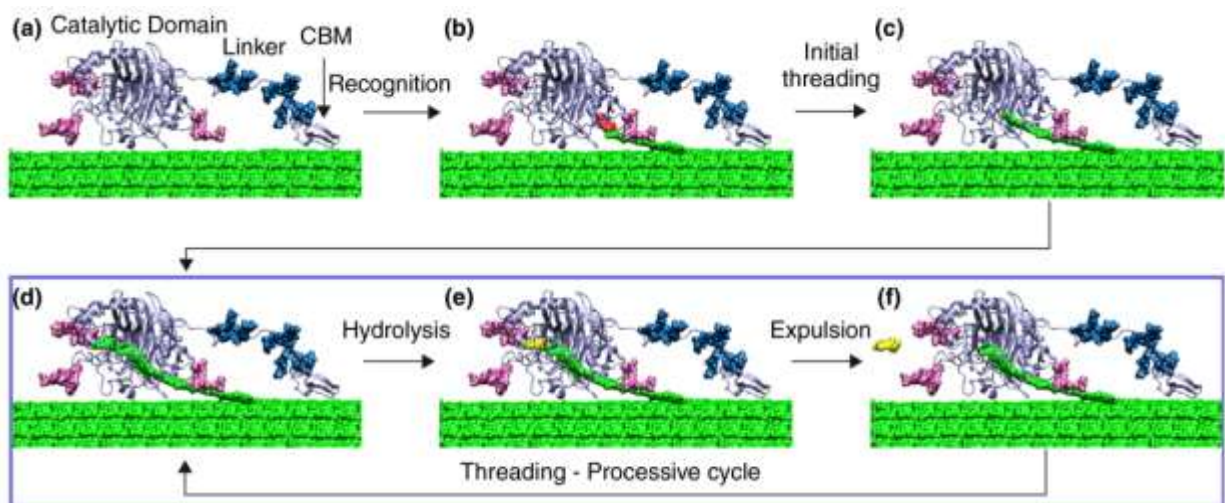


Εικόνα14: Απεικόνιση συνεργατικής δράσης κυτταρινασών (Quiroz-Castañeda and Folch-Mallol 2013).

Το ενεργό κέντρο της ενδογλουκανάσης είναι εύκολα προσεγγίσιμο από τις αλυσίδες της κυτταρίνης, λόγω της ανοικτής διαμόρφωσής του. Τέλος, δρα σε τυχαίες θέσεις της αλυσίδας της κυτταρίνης. Το ενεργό κέντρο της ενδογλουκανάσης έχει μια ανοικτή διαμόρφωση, που επιτρέπει την προσέγγιση των αλυσίδων της κυτταρίνης χωρίς κάποια παρεμπόδιση και έτσι το ένζυμο καταλύει την υδρόλυση των γλυκοζιδικών δεσμών σε τυχαίες θέσεις του πολυσακχαρίτη (Χριστακόπουλος και Τόπακας, 2013).

6.2.1.1.2. Εξωκυτταρινάσες

Οι κελλοβιοϋδρολάσες ή εξωκυτταρικές, συνιστούν τα ένζυμα αυτά που καταλύουν την διαδοχική υδρόλυση των αναγωγικών και μη-αναγωγικών άκρων της κυτταρίνης, απελευθερώνοντας μόρια κελλοβιόζη ως κύριο προϊόν. Αντιπροσωπεύουν το 40- 70% των συνολικών συστατικών του συστήματος κυτταρινασών και είναι σε θέση να υδρολύουν την κρυσταλλική κυτταρίνη. Τα ένζυμα αυτά παρουσιάζουν χαμηλά επίπεδα γλυκοζυλίωσης (περίπου 12% έως καθόλου), με το βέλτιστο εύρος pH στο οποίο δρουν να είναι 4 έως 5 και το βέλτιστο εύρος θερμοκρασιών από 37 έως 60°C, ανάλογα με το συνδυασμό ενζύμου-υποστρώματος (Quiroz-Castañeda and Folch-Mallol 2013). Το ενεργό κέντρο των εξωγλουκανασών είναι τοποθετημένο σε ένα τούνελ 6 θέσεων πρόσδεσης σακχάρων. Ο ρόλος του τούνελ είναι εκτός από το να τοποθετήσει σωστά την αλυσίδα της κυτταρίνης στο ενεργό κέντρο, να διατηρήσει προσδεμένη την κυτταρίνη μετά από κάθε καταλυτική δράση του ενζύμου (Χριστακόπουλος και Τόπακας, 2013).



Εικόνα 15: Στάδια δράσης εξωκυτταρινασών στην κυτταρίνη (Quiroz-Castañeda and Folch-Mallol 2013).

6.2.1.1.3. β -glucosidases

Η β -γλυκοζιδάση διασπάει β -γλυκοζιτικούς δεσμούς σε δυσασκαχάριτες ή υποκατεστημένα μόρια γλυκόζης και κατέχει σημαντικό ρόλο σε βασικές βιολογικές διαδικασίες (Jeng et al., 2011). Είναι υπεύθυνη για τη ρύθμιση ολόκληρης της κυτταρινολυτικής διαδικασίας και αποτελεί παράγοντα περιορισμού του ρυθμού κατά τη διάρκεια της ενζυμικής υδρόλυσης της κυτταρίνης, αφού η δραστηριότητα της ενδογλουκανάσης και της εξωγλουκανάσης συχνά παρεμποδίζεται από την κελλοβιόζη. Έτσι, η β -γλυκοζιδάση, όχι μόνο παράγει γλυκόζη από κελλοβιόζη, αλλά μειώνει επίσης την ανασταλτική δράση της κελλοβιόζης, επιτρέποντας στα δύο ένζυμα (ενδογλουκανάση και εξωγλουκανάση) να λειτουργούν πιο αποτελεσματικά [11]. Οι βέλτιστες τιμές pH που δρα είναι 3.5 με 5.5 και εύρος θερμοκρασιών 40 με 75°C [Dashtban et al.,2009].

6.3. Μοριακή δομή κυτταρινασών

Η ενεργότητα και η εκλεκτικότητα των ενδο- και εξω-γλουκανασών εξαρτάται άμεσα από τη μοριακή τους διαμόρφωση. Τα δύο ένζυμα, εκτός από ελάχιστες εξαιρέσεις αποτελούνται από δύο υπομονάδες:

- Την καταλυτική, η οποία υδρολύει γλυκοζιτικούς δεσμούς της κυτταρίνης και
- Μια μικρή, μη-καταλυτική υπομονάδα, η οποία συνδέεται με την κυτταρίνη τη στιγμή που δρά η καταλυτική υπομονάδα. Η μικρή υπομονάδα καλείται και υπομονάδα πρόσδεσης σακχάρων (CBM ή CBD)

Οι δύο υπομονάδες συνδέονται μεταξύ τους με πεπτιδική αλυσίδα 50-60 αμινοξέων (Χριστακόπουλος και Τόπακας, 2013).

6.3.1. Αποδόμηση ημικυτταρινών

6.3.1.1. Ημικυτταρινάσες σε μύκητες

Οι ημικυτταρίνες βιοαποδομούνται σε μονομερή σάκχαρα και οξικό οξύ (Sánchez, 2009). Η ξυλάνη είναι το πιο άφθονο συστατικό των ημικυτταρινών ξεπερνώντας το 70% της δομής τους. Οι ξυλανάσες έχουν την ικανότητα να υδρολύουν β -1,4 δεσμούς στην ξυλάνη και να παράγουν ολιγομερή, τα οποία υδρολύονται περαιτέρω σε γλυκόζη από τη β -ξυλοζιδάση [Dashtban et al.,2009]. Η πλήρης αποσύνθεσή τους απαιτεί συνεργατικές δράσεις μιας ποικιλίας υδρολυτικών ενζύμων. Επίσης, η υποβάθμιση της ημικυτταρίνης χρειάζεται επιπλέον βοηθητικά ένζυμα. Για παράδειγμα, εστεράσες ξυλάνης (xylan esterases), φερουλικές και π-κουμαρικές εστεράσες (ferulic και p-coumaric esterases), α -1-αραβινοφουρανοσιδάσες και α -4-O-μεθυλ-γλυκορουνοσιδάσες (α -4-O-methyl glucuronosidases) δρουν συνεργατικά με σκοπό να υδρολύσουν

αποτελεσματικά τις ξυλάνες και τις μαννάνες ξυλώδους βιομάζας (Sánchez, 2009). Όμοια με τις κυτταρινάσες, οι ημικυτταρινάσες είναι συνήθως σύμπλεγμα πρωτεϊνών και έχουν λειτουργικές μονάδες, όπως οι μονάδες πρόσδεσης σακχάρων, πέρα από τις καταλυτικές περιοχές που διαθέτουν. Επίσης, όμοια με τις κυτταρινάσες, οι περισσότερες ημικυτταρινάσες είναι γλυκοζιτικές υδρολάσες (GHs-glucoside hydrolases). Παρόλα αυτά κάποιες από αυτές ανήκουν στην κατηγορία των υδρογονανθρακικών εστερασών (CEs- carbohydrate esterases), που υδρολύουν εστερικούς δεσμούς πλευρικών ομάδων οξικού ή φερουλικού οξέος. Οι ημικυτταρινάσες ανήκουν σε 20 διαφορετικές οικογένειες γλυκοζιτικών υδρολασών (1, 2, 3, 4, 5, 8, 10, 11, 26, 27, 36, 39, 43, 51, 52, 53, 54, 57, 62 και 67) και όλες εκτός από 4 (4,8,52,57) έχουν βρεθεί σε μύκητες [Dashtban et al.,2009].

6.4. Εμπόδια στην υδρόλυση της λιγνοκυτταρινούχου βιομάζας

Ανάλογα με τη μέθοδο προεπεξεργασίας, παρατηρείται διαφορετική επίδραση στο υπόστρωμα η οποία μπορεί να συμβάλει στην βελτίωση της υδρόλυσης. Κάποιες από αυτές τις επιδράσεις παρουσιάζονται παρακάτω (Van and Pletscke, 2012):

- Απομάκρυνση μερικώς ή ολικώς της λιγνίνης, που προκαλεί αύξηση των πόρων στο υπόστρωμα
- Διάσπαση της δομής της λιγνίνης και των διασυνδέσεων της λιγνίνης με την υπόλοιπη βιομάζα.
- Ανακατανομή της λιγνίνης
- Απομάκρυνση της ημικυτταρίνης που δυσχεραίνει την πρόσβαση των κυτταρινάσων στην κυτταρίνη
- Μείωση της κρυσταλλικότητας της κυτταρίνης
- Μείωση του βαθμού πολυμερισμού της κυτταρίνης
- Μείωση στο μέγεθος των σωματιδίων.

Η λιγνίνη αποτελεί τον πιο σημαντικό παράγοντα περιορισμού της υδρόλυσης της βιομάζας, καθορίζοντας τη συσχέτιση μεταξύ του ποσοστού αυτής και της απελευθέρωσης σακχάρων από λιγνινοκυτταρινούχο υπόστρωμα. Αρκετοί λόγοι έχουν προταθεί ως προς το γιατί η παρουσία της λιγνίνης μειώνει την υδρόλυση (Van and Pletscke, 2012):

- Η λιγνίνη αποτελεί ένα φυσικό φραγμό, που παρεμποδίζει της προσβασιμότητα των κυτταρινάσων και των ημικυτταρινάσων στο υπόστρωμα.
- Οι κυτταρινάσες γίνονται μη εκλεκτικά απορροφήσιμες από τη λιγνίνη, γεγονός το οποίο δυσχεραίνει την παραγωγική υδρόλυση του υποστρώματος.
- Η λιγνίνη πιθανώς παρεμποδίζει άμεσα τα υδρολυτικά ένζυμα.
- Επίσης, έχει προταθεί ότι «η υπολειπόμενη λιγνίνη εμποδίζει την εύκολη πρόσβαση της κυτταρινάσας προς την αλυσίδα της κυτταρίνης» (Zhang and Lynd, 2004).
- Μερικοί ερευνητές υποδεικνύουν ότι δεν είναι απλά η παρουσία της λιγνίνης, αλλά ο τύπος της λιγνίνης και η διάσπαση που επιδρούν στην ενζυμική υδρόλυση (Merino and Cherry,2007, Zhang and Lynd, 2004).

7. Μέθοδος προεπεξεργασίας στερεής κατάστασης

7.1. Εμβόλιο

Το εμβόλιο για την στερεής κατάστασης προεπεξεργασία με μύκητες μπορεί να προετοιμαστεί με διάφορες μεθόδους, όπως για παράδειγμα με μυκητιακή ανάπτυξη σε υγρό μέσο ή άγαρ ή με ανακαλλιέργεια σε υπόστρωμα. Ο *Phanerochaete chrysosporium* αποδίδει σπόρια τα οποία επιτρέπουν την εύκολη παρασκευή του εμβολίου και την ομογενοποίηση με το υπόστρωμα. Αντιθέτως, οι περισσότεροι λευκής σήψης βασιδιομύκητες δεν παράγουν σπόρια, ενώ η ανακαλλιέργεια της λιγνοκυτταρινούχου βιομάζας

χρησιμοποιείται συνήθως για εμβολιασμό. Ομοίως με τη ζύμωση σε υγρό μέσο, τα υλικά που έχουν υποστεί ζύμωση στους αντιδραστήρες στερεής κατάστασης μπορούν επίσης να χρησιμοποιηθούν για εμβολιασμό, ενώ φρέσκο υπόστρωμα μπορεί να τροφοδοτεί τα υλικά που έχουν ζυμωθεί μερικώς. Ένα ελάχιστο επίπεδο εμβολιασμού απαιτείται για αποτελεσματικό αποικισμό και στη συνέχεια για την αποδόμηση της βιομάζας. Ωστόσο, η αύξηση του εμβολίου έχει μόνο μικρή επίδραση στον αποικισμό και την αποδόμηση του υποστρώματος (Wan, 2012).

7.2. Περιεχόμενη υγρασία

Η αρχική περιεχόμενη υγρασία του υποστρώματος είναι σημαντική για τη δημιουργία κατάλληλου περιβάλλοντος καλλιέργειας και ανάπτυξης, ενώ επίσης επιδρά στο δευτερογενή μεταβολισμό του μύκητα. Κατάλληλο εύρος αρχικής υγρασίας θεωρείται ένα ποσοστό 70-80% στο υπόστρωμα για βέλτιστο επίπεδο λιγνινολυτικών δράσεων στους λευκής σήψης μύκητες. Γενικά, η υψηλή περιεκτικότητα σε υγρασία προτιμάται για το σχηματισμό μυκητιακού μυκηλίου, αλλά δεν είναι απαραίτητη για την αυξημένη απολιγνίνωση. Επιπλέον, μειώνει την καθυστέρηση της στερεής μυκητιακής προεπεξεργασίας. Τέλος, το χαμηλό επίπεδο υγρασίας θα μπορούσε να μειώσει την απολιγνίνωση, χωρίς ταυτόχρονα να παρέχει επαρκές νερό για την ανάπτυξη του μύκητα (Wan, 2012).

7.3. Μέγεθος σωματιδίων στερεού υποστρώματος

Το μέγεθος μονάδων του υποστρώματος αποτελεί επίσης έναν κύριο παράγοντα που επηρεάζει την απόδοση της μυκητιακής προεπεξεργασίας στερεής κατάστασης. Το μεγάλο μέγεθος σωματιδίων μπορεί να εμποδίσει τη διείσδυση του μύκητα στη λιγνοκυτταρινούχου βιομάζα και επίσης παρεμποδίζει τη διάχυση του αέρα, του νερού και ενδιάμεσων μεταβολιτών στα σωματίδια. Ωστόσο, το πολύ μικρό μέγεθος σωματιδίων, με μειωμένο χώρο διασωματιδιακού καναλιού, μπορεί να επηρεάσει αρνητικά την κυκλοφορία του αέρα και έτσι δεν συνεπάγεται τον αυξημένο ρυθμό απολιγνίνωσης. Τέλος, για τους περισσότερους μύκητες λευκής σήψης, η απουσία αζώτου αναστέλλει τον αποπολυμερισμό της λιγνίνης, ωστόσο διεγείρει την ανάπτυξη της βιομάζας τους (Wan, 2012).

7.4. Πρόσθετα

Η προσθήκη επαγωγέων, όπως Mn^{2+} , H_2O_2 , και αρωματικών περιεχομένων, μπορεί ενδεχομένως να εγείρει την έκκριση λιγνινολυτικών ενζύμων και την αποδόμηση της λιγνίνης. Έχουν μελετηθεί (Shrestha et al., 2008) τα αποτελέσματα της προσθήκης Mn^{2+} , H_2O_2 , και βερσατυλικής αλκοόλης κατά την απολιγνίνωση ινών καλαμποκιού στον μύκητα *P. Chrysosporium*, τα οποία έδειξαν ότι η προσθήκη Mn^{2+} απέδιδε μεγαλύτερο ποσοστό απολιγνίνωσης. Άλλες έρευνες (Shrestha et al., 2008), ωστόσο, έδειξαν ότι η προσθήκη Mn^{2+} δεν επηρέασε θετικά την απολιγνίνωση μίσχου βαμβακιού από τον ίδιο μύκητα. Η προσθήκη θρεπτικών συστατικών αυξάνει γενικώς το σχηματισμό μυκητιακής βιομάζας και διευκολύνει τον μυκητιακό αποικισμό σε κάθε σημείο του υποστρώματος (Wan, 2012).

7.5. Θερμοκρασία

Σε γενικές γραμμές, οι ασκοδιομύκητες λευκής σήψης αναπτύσσονται καλύτερα κοντά στους 39°C, όταν οι βασιδιομύκητες λευκής σήψης αναπτύσσουν καλύτερα τη βιομάζα τους σε θερμοκρασίες μεταξύ 15 και 35°C, ενώ ο βέλτιστος ρυθμός απολιγνίνωσης επιτυγχάνεται σε εύρος θερμοκρασιών 20-30°C. Ο μεταβολισμός των μυκήτων αυτών δημιουργεί θερμότητα και οδηγεί στην δημιουργία βαθμίδων θερμοκρασίας στην στερεής κατάστασης καλλιέργεια. Ωστόσο, η συσσωρευμένη θερμότητα μπορεί να

σκοτώσει ή να αναστείλει την ανάπτυξη των μυκήτων και τον μεταβολισμό. Ως εκ τούτου, κατά την κλιμάκωση της καλλιέργειας στερεής κατάστασης, η απαγωγή θερμότητας είναι ένας από τους βασικούς παράγοντες που πρέπει να ληφθούν υπόψη στο σχεδιασμό του βιοαντιδραστήρα (Wan, 2012).

7.6. Αερισμός

Ο αερισμός επηρεάζει σημαντικά την απόδοση της καλλιέργειας στερεής κατάστασης. Δεδομένου ότι η αποδόμηση της λιγνίνης είναι μία οξειδωτική διαδικασία, η διαθεσιμότητα του οξυγόνου είναι σημαντικός παράγοντας για την ενεργότητα των λιγνινολυτικών ενζύμων των λευκής σήψης μυκήτων. Σε επίπεδο αντιδραστήρα, ο οποίος είναι γεμάτος από πρώτη ύλη, είναι απαραίτητος ο συνεχής αερισμός ώστε να υπάρχει κυκλοφορία αέρα στο υπόστρωμα. Ωστόσο, η υψηλή παρουσία οξυγόνου μπορεί να αυξήσει το ρυθμό απολιγνίνωσης, αλλά δεν αυξάνει την εκλεκτικότητα στη διαδικασία την απολιγνίνωσης (Wan, 2012).

7.7. Αποστείρωση της πρώτης ύλης.

Η αποστείρωση της πρώτης ύλης μπορεί να εξοντώσει ή να αναστείλει αποτελεσματικά το μικροβιακό φορτίο που υπάρχει και είναι απαραίτητη για την προεπεξεργασία με μύκητες, ιδίως για την προεπεξεργασία του υποστρώματος από λευκής σήψης βασιδιομύκητες. Σε βιομηχανική κλίμακα, η αποστείρωση αποτελεί ένα βασικό κόστος. Η πλήρης αποστείρωση ωστόσο δεν είναι απαραίτητη, καθώς μια μικρή χρονικά διαδικασία (~15s) κυκλοφορίας ατμοσφαιρικού ατμού μπορεί να οδηγήσει τους μύκητες να θέσουν εκτός ανταγωνισμού, σε επίπεδο ανάπτυξης βιομάζας, άλλους μύκητες ή βακτήρια που βρίσκονται στο υπόστρωμα. Άλλες τεχνολογίες πέραν του αυτόκλειστου και του ατμοσφαιρικού ατμού, που έχουν αποδειχθεί αποτελεσματικές στην αποστείρωση ξυλώδους βιομάζας, είναι κάποια φθηνά χημικά όπως το θειώδες νάτριο, το μεταθειώδες νάτριο και το υδροθειώδες νάτριο σε συγκεντρώσεις εύρους 600–1200 ppm (Wan, 2012).

7.8. Χρόνος προεπεξεργασίας

Ο μεγάλος χρόνος προεπεξεργασίας, εξαιτίας του μικρού ρυθμού απολιγνίνωσης, συνιστά ένα από τα βασικά εμπόδια στην εφαρμογή της τεχνολογίας προεπεξεργασίας με μύκητες σε μεγάλη κλίμακα. Σε γενικές γραμμές, απαιτούνται κάποιες εβδομάδες έως και μήνες για να επιτευχθεί αποδόμηση της λιγνίνης σε μεγάλο βαθμό. Ο χρόνος που απαιτείται εξαρτάται από τον μύκητα που επιλέγεται για την προεπεξεργασία, το υπόστρωμα στο οποίο δρα και την αντίσταση που παρουσιάζει το υπόστρωμα στην ανάπτυξη της βιομάζας του μύκητα σε αυτό (Wan, 2012).

8. Σκοπός

Σκοπός της παρούσας διπλωματικής εργασίας ήταν η μελέτη της ενεργότητας ενζύμων αποδόμησης λιγνοκυτταρινούχου βιομάζας ενός λευκής σήψης μύκητα στα πλαίσια της προεπεξεργασίας λιγνοκυτταρινούχου βιομάζας από ιτιά. Ο μύκητας *Ganoderma resinaseum* καλλιεργήθηκε αρχικά σε τρυβλίο petri με στερεό θρεπτικό μέσο potato dextrose agar (PDA), στη συνέχεια σε 50ml υγρού μέσου εκχυλίσματος σίτου (malt extract) και τελικά ανακαλλιεργήθηκαν σε ιτιά κοκκομετρίας 710μm και υγρασίας 80%. Οι συνθήκες επώασης ήταν T=39°C και εύρος pH=4-5, ενώ δειγματοληψία πραγματοποιείτο, μετά την ανακαλλιέργεια στην ιτιά, ανά 4 μέρες με συνολικό χρόνο επώασης τις 28 ημέρες. Στη συνέχεια, μετά από κάθε δειγματοληψία δημιουργήθηκε ένα υγρό εκχύλισμα από κάθε δείγμα, στο οποίο μελετήθηκε η ενεργότητα των λιγνιολυτικών ενζύμων της λακκάση, των υπεροξειδασών εξαρτημένων και μη εξαρτημένων από το μαγγάνιο και των ενζύμων υδρόλυσης ημικυτταρίνης και κυταρίνης β-ξυλοζιδάση (ανήκει στις ημικυτταράσες), β-γλυκοζιδάση και FPU (δρουν στην κυτταρίνη) σε μονάδες Units/g ξηρής βάσης υποστρώματος ιτιάς. Στο εκχύλισμα αυτό, επίσης μετρήθηκαν και οι ολικές πρωτεΐνες που παρήχθησαν στις 4,8,12,16,20,24,28 ημέρες σε g πρωτεΐνης/g ξηρής βάσης ιτιάς. Τέλος, οι μετρήσεις των ενζύμων και των ολικών πρωτεϊνών συσχετίστηκαν με την ανάπτυξη βιομάζας στις αντίστοιχες ημέρες δειγματοληψίας. Η ανάπτυξη της βιομάζας του μύκητα δεν μετρήθηκε στο υγρό εκχύλισμα αλλά στα δείγματα στερεής καλλιέργειας ιτιάς.

Πειραματικό Μέρος

1. Υλικά

1.1. Χημικά αντιδραστήρια

Τα χημικά αντιδραστήρια που χρησιμοποιήθηκαν, η σύστασή τους, καθώς και το μοριακό τους βάρος παρατίθενται στον παρακάτω πίνακα (πίνακας 6):

Πίνακας 6: Πίνακας χημικών αντιδραστηρίων που χρησιμοποιήθηκαν στην πειραματική διαδικασία.

Όνομασία	Σύσταση
di-sodium phosphate (Na ₂ HPO ₄)	0.1M
sodium-di-hydrogen-phosphate (NaH ₂ PO ₄)	0.1M
sodium tartate	0.1M
tartaric acid	0.1M
potassium phosphate	0.1M
citric acid	0.1M
Hydrogen peroxide(H ₂ O ₂)	1.35mM
MnSO ₄	1mM
Sodium carbonate (Na ₂ CO ₃)	1M
Coomassie Blue G250	50mg
Methanol	100%
Phosphoric acid (H ₃ PO ₄)	85%
Sulfuric acid (H ₂ SO ₄)	72%
Sodium hydroxide (NaOH)	0.5M, 1M,
Sodium nitrite (NaNO ₂)	5% w/v
KHSO ₄	5%w/v
NH ₄ SO ₃ NH ₂	12.5% w/v
Iron (III) chloride (FeCl ₃)	0.5%w/v

1.2. Υποστρώματα

Στον παρακάτω πίνακα (πίνακας 7) παρουσιάζονται τα υποστρώματα που χρησιμοποιήθηκαν στην πειραματική διαδικασία:

Πίνακας 7: Πίνακας υποστρωμάτων που χρησιμοποιήθηκαν στην πειραματική διαδικασία.

Όνομα	Χρήση
Ιτιά 710μm	ανάπτυξη του μύκητα <i>G.resinaceum</i>
ABTS	οξειδωση από το ένζυμο λακκάση
MBTH	οξειδωση από υπεροξειδάσες, μέτρηση γλυκοζαμίνης

DMAB	οξείδωση από υπεροξειδάσες
Cellobiose	μέτρηση ενεργότητας του ενζύμου β-γλυκοζιδάση
pNP-xylopyranoside	μέτρηση ενεργότητας του ενζύμου β-ξυλοζιδάση
Filter paper	μέτρηση ενεργότητας κυτταρινασών

1.3. Πρότυπες ουσίες- πρότυπα διαλύματα

Στον παρακάτω πίνακα (**πίνακας 8**) παρουσιάζονται οι πρότυπες ουσίες και τα διαλύματα που χρησιμοποιήθηκαν στην πειραματική διαδικασία για την κατασκευή πρότυπων καμπυλών απορρόφησης-συγκέντρωσης:

Πίνακας 8: Πίνακας πρότυπων ουσιών που χρησιμοποιήθηκαν στην πειραματική διαδικασία.

Πρότυπες ουσίες	
1.	pNP
2.	glucose
3.	DNS reagent
4.	Bradford reagent
5.	Standard bovine serum albumin (BSA)
6.	γλυκοζαμίνη

Παρασκευή Bradford reagent (**HARHANGI et al.,2002**)

- Διάλυση 50mg χρωστικής ουσίας Coomassie blue G250 σε 50ml μεθανόλης 100% με ανάδευση για μία ώρα.
- Προσθήκη 100ml φωσφορικού οξέος H_3PO_4 85% στο παραπάνω διάλυμα.
- Προσθήκη του όξινου διαλύματος που προέκυψε σε 500ml απιονισμένου H_2O υπό ανάδευση.
- Φιλτράρισμα του διαλύματος με διηθητικό χαρτί
- Προσθήκη 350ml H_2O
- Αποθήκευση διαλύματος στους $4^\circ C$ σε φιάλη υλικού μη διαπερατού απο το φως.

Οι πρότυπες καμπύλες απορρόφησης- συγκέντρωσης pNP, glucose και BSA παρατίθενται στο

ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ 1.

1.4. Θρεπτικά μέσα

Τα θρεπτικά μέσα που χρησιμοποιήθηκαν ήταν τα εξής:

- Malt extract 20g/l για την υγρή καλλιέργεια του μύκητα *G.resinaceum*
- Potato Dextrose Agar (PDA) 39g/l για την καλλιέργεια του μύκητα *G.resinaceum* σε τρυβλία petri

1.5. Ρυθμιστικά Διαλύματα

Στον παρακάτω πίνακα (**πίνακας 9**) παρουσιάζονται τα ρυθμιστικά διαλύματα που χρησιμοποιήθηκαν στις μετρήσεις ενζυμικής ενεργότητας:

Πίνακας 9: Πίνακας ρυθμιστικών διαλυμάτων που χρησιμοποιήθηκαν στην πειραματική διαδικασία.

Όνομα	Συστατικά	pH
Sodium phosphate buffer	Na_2HPO_4 1M – citric acid 1M	7
Sodium phosphate buffer	Na_2HPO_4 1M - NaH_2PO_4 1M	6.5

Sodium tartate buffer		4
Potassium phosphate buffer	K ₂ HPO ₄ 1M - KH ₂ PO ₄ 1M	4.5
Ρυθμιστικό φωσφωρικών κιτρικών-	Na ₂ HPO ₄ 1M – citric acid 1M	5

2. Συσκευές- Όργανα

Στον παρακάτω πίνακα (πίνακας 10) παρουσιάζονται αναλυτικά οι συσκευές και τα όργανα που χρησιμοποιήθηκαν κατά την πειραματική διαδικασία, καθώς και ιδιότητες αυτών:

Πίνακας 10: Πίνακας συσκευών και οργάνων που χρησιμοποιήθηκαν στην πειραματική διαδικασία.

Συσκευές- Όργανα	Ιδιότητες	
Δοκιμαστικοί σωλήνες	25ml, 150ml	
Βαμβάκι	υδρόφοβο	
Διηθητικό χαρτί		
Φίλτρα διήθησης	0.55mm, 0.45μm	
Falcon conical tubes	15ml	
Τρυβλία Petri		
Eppendorf Safe-Lock microcentrifuge tubes	2ml	
Αναλυτικός ζυγός (KERN ABS 220-4 Analytical Balance)	Ακρίβεια μέχρι το τέταρτο δεκαδικό, με μέγιστη τιμή μέτρησης 220g	±0.0002
Ογκομετρικοί σωλήνες	50ml, 100ml, 250ml	±0.5ml, ±0.075ml, ±1ml
Προχοΐδα	5ml	±0.05
Πιπέτες	100μl, 1ml, 5ml	±,±,±
Tips		
Κυψελίδες	1.2ml	
Υγρασιόμετρο		±0.1
Φούρνος		
Ξηραντήρας για ξήρανση υπό κενό		
Συσκευή για μέτρηση pH		
Φωτόμετρο		±0.05
Θερμοκρατούμενο υδατόλουτρο		
Θερμοστατούμενος επωαστήρας με ανάδευση		

3. Πειραματικές Μέθοδοι

3.1. Προετοιμασία σωλήνων καλλιέργειας

Αρχικά, για την προετοιμασία των σωλήνων καλλιέργειας παρασκευάστηκε σε παρτίδες πολτός ιτιάς με 80% συνολική υγρασία. Προκειμένου να επιτευχθεί ο στόχος αυτός, ζυγίστηκε πρώτη ύλη ιτιάς, στην οποία μετρήθηκε η περιεχόμενη αρχική υγρασία της. Τέλος, προστέθηκε τόση υγρασία ώστε να προκύψει υπόστρωμα ιτιάς 80% υγρασίας. Περίπου 20g του πολτού αυτού εισήχθησαν σε δοκιμαστικούς σωλήνες (ml). Το πλήθος το σωλήνων καθορίστηκε από την ανάγκη δειγματοληψίας από την ημέρα 4 έως 28 της καλλιέργειας στο υπόστρωμα ιτιάς και ανά τέσσερις ημέρες, δηλαδή 7 δειγματοληψίες, καθώς και από τη συνολική μάζα καλλιέργειας που απαιτήθηκε για τις διάφορες μετρήσεις. Συνολικά λοιπόν παρασκευάστηκαν 14 δείγματα καλλιέργειας (δύο δείγματα καλλιέργειας για κάθε μέρα δειγματοληψίας) και 4 τυφλά δείγματα.

3.2. Βιολογική προεπεξεργασία

3.2.1. Ανάπτυξη του μύκητα *G.resinaceum*

Για την ανάπτυξη του μύκητα *G.resinaceum*, πραγματοποιήθηκε η καλλιέργειά του σε τρυβλίο Petri που περιείχε ως θρεπτικό μέσο άγαρ δεξτρόζης πατάτας (Potato Dextrose Agar-PDA) σε συγκέντρωση 39g/l. Τα τρυβλία καλλιέργειας αφέθηκαν στον επωαστήρα σε συνθήκες θερμοκρασίας 39°C για διάστημα 7 ημερών. Στη συνέχεια επιχειρήθηκε ανακαλλιέργεια από τα τρυβλία Petri σε κωνικές φιάλες που περιείχαν 50ml υγρού θρεπτικού μέσου εκχυλίσματος βύνης (malt extract) σε συγκέντρωση 20g/l. Οι συνθήκες επώασης παρέμειναν οι ίδιες (T=39°C), όπως και ο χρόνος επώασης (7 ημέρες). Τόσο το PDA πριν την εισαγωγή του στα τρυβλία καλλιέργειας, όσο και οι κωνικές φιάλες με το malt extract, αποστειρώθηκαν για 20λεπτά σε χύτρα ταχύτητας. Η καλλιέργεια πραγματοποιήθηκε κάτω από στείρες συνθήκες σε περιβάλλον laminar.

3.2.2. Καλλιέργεια του μύκητα *G.resinaceum* σε υπόστρωμα ιτιάς

Μετά την ανάπτυξη του μύκητα στο υγρό μέσο, απαραίτητη κρίθηκε η ομογενοποίηση της υγρής καλλιέργειας πριν τον εμβολιασμό της στο υπόστρωμα ιτιάς κατάλληλης υγρασίας. Για το σκοπό αυτό χρησιμοποιήθηκε αναδευτήρας υψηλών στροφών (mixer). Στη συνέχεια, 3ml του ομογενοποιημένου πλέον εμβολίου εισήχθησαν στους 14 σωλήνες με ιτιά 80% υγρασίας που προετοιμάστηκαν όπως αναφέρθηκε παραπάνω, με τη βοήθεια πιπέτας των 5ml. Μετά από κάθε εμβολιασμό σε σωλήνα καλλιέργειας 3ml δείγματος εμβολίου τοποθετήθηκαν σε προζυγισμένο ξηρό φίλτρο προκειμένου στη συνέχεια να ξηραθούν στους 550°C και να ζυγιστεί ώστε να προκύψει το ξηρό βάρος του δείγματος εμβολίου (TS εμβολίου). Η διαδικασία αυτή πραγματοποιήθηκε σε θάλαμο με διαστρωματική ροή αέρα (laminar) του εργαστηρίου κάτω από στείρες συνθήκες, με όλα τα σκεύη και όργανα που χρησιμοποιήθηκαν να έχουν υποστεί προηγουμένως διαδικασία αποστείρωσης. Τέλος, τα δείγματα καλλιέργειας τοποθετήθηκαν στον επωαστήρα στους 37°C, η δειγματοληψία πραγματοποιούνταν από την τέταρτη ημέρα και ανά 4 ημέρες για 28 ημέρες. Κάθε ημέρα δειγματοληψίας, λαμβάνονταν δύο σωλήνες καλλιέργειας, όπως επίσης και ένα τυφλό ανά δύο ημέρες δειγματοληψίας έως την έκτη ημέρα δειγματοληψίας (24ημέρες) και ένα τυφλό, την τελευταία ημέρα δειγματοληψίας (28 ημέρες).

3.3. Παρασκευή ενζυμικού διαλύματος

Για την παρασκευή ενζυμικού διαλύματος από την καλλιέργεια απαιτείται η εκχύλιση αυτής με ρυθμιστικό διάλυμα. Η μέθοδος εκχύλισης που περιγράφεται παρακάτω επιλέχθηκε μεταξύ μεθόδων που διαφέρουν ως προς τις συνθήκες εκχύλισης και συγκεκριμένα ως προς: την θερμοκρασία, το pH του ρυθμιστικού

διαλύματος που χρησιμοποιήθηκε και το χρόνο εκχύλισης. Κριτήριο επιλογής στάθηκε η ενεργότητα που παρουσίαζαν τα διαφορετικά εκχυλίσματα ως προς τα ένζυμα που μελετόνταν, αλλά και η μάζα των ολικών πρωτεϊνών που περιείχε το εκχύλισμα. Στο σημείο αυτό πρέπει να επισημάνουμε, ότι η διαφορά στο ποσοστό εκχύλισης των πρωτεϊνών ανάλογα με την μέθοδο που επιλέγεται είναι και η αιτία προσδιορισμού της ενεργότητας των ενζύμων ως προς τη μονάδα μάζας εκχυλισμένων ολικών πρωτεϊνών.

Πιο συγκεκριμένα, για τη μέθοδο που επιλέχθηκε, το κάθε δείγμα καλλιέργειας που λαμβανόταν την αντίστοιχη ημέρα δειγματοληψίας από τον αντίστοιχο σωλήνα, ομογενοποιούταν. Στη συνέχεια, μετρήθηκε η υγρασία του και τέλος ζυγίστηκαν 2g ξηρής μάζας καλλιέργειας, στα οποία προστέθηκαν 40ml ρυθμιστικού διαλύματος φωσφορικού νατρίου (sodium phosphate) pH=7. Ο πολτός που προέκυψε φυλάχθηκε σε κωνική φιάλη των 100ml, η οποία κλείστηκε αεροστεγώς (με parafilm) και τοποθετήθηκε για ανάδευση στα 800rpm στους 4°C overnight. Την επόμενη ημέρα, το μίγμα φυγοκεντρήθηκε στους 4°C για 40 λεπτά και στη συνέχεια το υπερκείμενο διάλυμα υπέστη διήθηση υπό κενό με φίλτρα διήθησης. Τέλος, το προκύπτον ενζυμικό παρασκεύασμα φυλάχθηκε στην κατάψυξη έως ότου να χρησιμοποιηθεί για τις ενζυμικές μετρήσεις ενεργότητας.

3.4. Μετρήσεις ανάπτυξης βιομάζας του μύκητα *G.resinaceum*

Οι μετρήσεις ανάπτυξης βιομάζας του μύκητα πραγματοποιήθηκαν στον αντίστοιχο σωλήνα στερεής καλλιέργειας που λαμβανόταν τις αντίστοιχες ημέρες δειγματοληψίας. Η μέθοδος που επιλέχθηκε για το σκοπό αυτό ήταν η έμμεση μέθοδος της υδρόλυσης της χιτίνης σε N-ακετυλ-γλυκοζαμίνη (συστατικό κυττάρου του μύκητα). Η έμμεση αυτή μέθοδος αποτελείται από το στάδιο της υδρόλυσης της βιομάζας και από το στάδιο του χρωματομετρικού προσδιορισμού της γλυκοζαμίνης. Πριν την έναρξη της διαδικασίας, το δείγμα καλλιέργειας αφαιρέθηκε από το σωλήνα, ομογενοποιήθηκε και μετρήθηκε η υγρασία του. Η διαδικασία που ακολουθήθηκε στα δύο στάδια περιγράφεται παρακάτω [26,31]:

Στάδιο 1: Υδρόλυση ανεπτυγμένης βιομάζας

Αρχικά ζυγίστηκαν 5g ομογενοποιημένης καλλιέργειας, τα οποία τοποθετήθηκαν σε duran των 100ml. Στη συνέχεια, προστέθηκαν 5ml H₂SO₄ 72% και το διάλυμα που προέκυψε αφέθηκε υπό ανάδευση για 30λεπτά στα 130rpm. Με την πάροδο των 30 λεπτών, το διάλυμα αραιώθηκε με 54ml απιονισμένο νερό, η φιάλη πωματίστηκε και τοποθετήθηκε σε αυτόκλειστο για αποστείρωση στους 121°C, διάρκειας 2ωρών (υδρόλυση). Όταν ολοκληρώθηκε η υδρόλυση, τα διαλύματα αφέθηκαν σε ηρεμία ώστε να επανέλθουν σε θερμοκρασία περιβάλλοντος, ενώ στη συνέχεια προστέθηκαν σε αυτά διαλύματα NaOH 10M και 0.5M διαδοχικά προκειμένου το υδρολυμένο διάλυμα να εξουδετερωθεί.

Στάδιο 2: Χρωματομετρικός προσδιορισμός γλυκοζαμίνης

Εφόσον το εξουδετερωμένο διάλυμα που προέκυψε από το προηγούμενο στάδιο έφτασε σε θερμοκρασία περιβάλλοντος, 3ml από αυτό τοποθετήθηκαν σε μια κωνική φιάλη των 50ml και στη συνέχεια προστέθηκαν 3ml διαλύματος NaNO₂ 5% w/v και 3ml KHSO₄ 5%w/v. Το προκύπτον διάλυμα αναδεύονταν για 15 λεπτά στα 130rpm, ενώ ακολούθησε φυγοκέντρηση αυτού για 2 λεπτά στους 2°C. Από το υπερκείμενο διάλυμα δύο επαναλήψεις των 3ml προστέθηκαν σε δύο δοκιμαστικούς σωλήνες αντίστοιχα, ακολούθησε προσθήκη 1ml NH₄SO₃NH₂ 12.5% w/v και περιδίνηση, ενώ τέλος το διάλυμα αφέθηκε σε ηρεμία για 5 λεπτά. Στη συνέχεια

προστέθηκε 1ml MBTH 05% w/v, το οποίο πρέπει να παρασκευάζεται την ίδια μέρα και να αφήνεται στο παγώλυτρο κατά τη διάρκεια της διαδικασίας. Οι σωλήνες τοποθετήθηκαν σε νερό που βράζει (100°C), όπου αφέθηκαν για 3 λεπτά. Με την πάροδο αυτού του χρόνου οι σωλήνες αφαιρέθηκαν από το βραστό νερό και αφέθηκαν σε ηρεμία ώστε να επανέλθουν σε θερμοκρασία περιβάλλοντος. Ακολούθησε προσθήκη 1ml FeCl₃ 0.5w/v, το οποίο διατηρείται για 3 ημέρες στη συντήρηση, διαδικασία περιδίνησης και, τέλος, το σύστημα αφέθηκε σε ηρεμία για χρόνο 30 λεπτών. Στη συνέχεια το διάλυμα που προέκυψε, φυγοκεντρήθηκε για 10 λεπτά στα 1500 g. Τέλος, το υπερκείμενο φωτομετρήθηκε στα 650nm με τυφλό. Το τυφλό δείγμα καλλιέργειας λήφθηκε την αντίστοιχη ημέρα δειγματοληψίας και είχε υποστεί την διαδικασία των δύο σταδίων που περιγράφηκε παραπάνω.

Για την πρότυπη καμπύλη βαθμονόμησης της γλυκοζαμίνης χρησιμοποιήθηκε πρότυπη γλυκοζαμίνη, παρασκευάστηκαν 6 διαλύματα συγκέντρωσης πρότυπης ουσίας από 625 ppm έως 10000 ppm, ενώ πραγματοποιήθηκε μόνο το χρωματομετρικό στάδιο της παραπάνω διαδικασίας. Η πρότυπη καμπύλη παρουσιάζεται στο **ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ 1**.

3.5. Μέτρηση ολικών πρωτεϊνών καλλιέργειας

Ο προσδιορισμός των ολικών πρωτεϊνών της καλλιέργειας επιτεύχθηκε μέσω μετρήσεων αζώτου με την μέθοδο Bradford (**HARHANGI et al.,2002**). Για αυτή την πειραματική διαδικασία χρησιμοποιήθηκαν ποσότητα από το ενζυμικό διάλυμα που παρασκευάστηκε όπως αναφέρθηκε παραπάνω, αντιδραστήριο Bradford που παρασκευάστηκε στο εργαστήριο με μια διαδικασία που αναφέρεται στην ενότητα 1.4. και πρότυπη ουσία αλβουμίνης (bovine serum albumin-BSA) για την κατασκευή της πρότυπης καμπύλης βαθμονόμησης (το πρότυπο διάλυμα πρωτεΐνης BSA φυλάσσεται στην κατάψυξη). Πιο συγκεκριμένα, σε δοκιμαστικό σωλήνα τοποθετήθηκαν 1ml ενζυμικού παρασκευάσματος κατάλληλα αραιωμένου και σε αυτό στη συνέχεια προστέθηκαν 4ml αντιδραστήριου Bradford. Ομοίως για το τυφλό της μέτρησης προστέθηκαν 1ml απιονισμένο νερό και 4ml αντιδραστήριου Bradford. Τα διαλύματα αναμείχθηκαν καλά και αφέθηκαν σε ηρεμία για 5 λεπτά. Τέλος, τα δείγματα φωτομετρήθηκαν στα 595 nm. Η διαδικασία αυτή πραγματοποιήθηκε και στο τυφλό δείγμα στερεής καλλιέργειας, από το οποίο με τη μέθοδο της εκχύλισης που περιγράφηκε παραπάνω, προέκυψε ένα πρωτεϊνικό παρασκεύασμα, προκειμένου να προσδιοριστούν οι ολικές πρωτεΐνες της ιτιάς. Η πρότυπη καμπύλη βαθμονόμησης παρουσιάζεται στο **ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ 1**.

3.6. Μετρήσεις ενζυμικής ενεργότητας

Για την εκτέλεση των μεθόδων μέτρησης ενζυμικής ενεργότητας που αναλύονται παρακάτω προηγήθηκε μια συγκριτική μελέτη πειραματικών διαδικασιών για το κάθε ένζυμο με διαφορετικά υποστρώματα, ρυθμιστικά διαλύματα και συνθήκες αντίδρασης. Πιο συγκεκριμένα, για την λακκάση εξετάστηκαν τα υποστρώματα ABTS [**Bourbonnais and Paice, 1990**]και συριγγαλδαζίνη (**Δρίτσα, 2006**)και υπερίσχυσε η πρώτη. Για την μέτρηση των υπεροξειδασών μελετήθηκαν δύο μέθοδοι (**Δρίτσα, 2006**)και (**Ngo and Lenhoff, 1980**) εκ των οποίων υπερίσχυσε η δεύτερη. Ακόμα, για την μέτρηση της β-γλυκοζιδάσης εξετάστηκαν δύο

υποστρώματα, η κελλοβιόζη (Zerva et al., 2014) και το rNPG σε παρόμοιες συνθήκες με παρόμοιο αποτέλεσμα. Τέλος, για την μέτρηση της β-ξυλοζιδάσης δοκιμάστηκαν τα υποστρώματα rNP-xyloglycanoside (Zerva et al., 2014) και το oNPX σε διαφορετικές θερμοκρασίες, δίνοντας παρόμοια αποτελέσματα. Κριτήριο διαλογής των μεθόδων στάθηκε η καλύτερη συγγένεια ενζύμου υποστρώματος στις συνθήκες κάθε μεθόδου.

3.6.1. Λακκάση

Σε τελικό όγκο αντίδρασης 1mL προστέθηκαν 200μL δείγμα ενζυμικού παρασκευάσματος κατάλληλα αραιωμένο, 700μL ρυθμιστικό διάλυμα τρυγικού νατρίου (sodium tartate, C=0.1M) με pH=4 και υπόστρωμα ABTS 100μL (σε τελική συγκέντρωση 2mM). Τέλος, το προκύπτον διάλυμα φωτομετρήθηκε στα 420nm και σε θερμοκρασία 25°C ανά ένα λεπτό και για διάστημα 10 λεπτών [Bourbonnais and Paice, 1990]. Οι πρωτογενείς μετρήσεις παρουσιάζονται στο ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ 2. Ως τυφλό χρησιμοποιήθηκε διάλυμα που περιείχε αντί για ποσότητα ενζυμικού παρασκευάσματος, ενζυμικό διάλυμα βρασμένο για 20 λεπτά, που είχε υποστεί την ίδια επεξεργασία.

Ως μονάδα ενζυμικής ενεργότητας (Unit, U), ορίζεται η ποσότητα του ενζύμου που απαιτείται για την πλήρη διάσπαση 1μmol υποστρώματος ανά 1 min σε κατάλληλο pH και θερμοκρασία.

Ο υπολογισμός της δραστηρότητας από τις τιμές της απορρόφησης γίνεται ως εξής: καταστρώνεται το διάγραμμα, όπου οι τιμές των απορροφήσεων είναι οι τεταγμένες και ο χρόνος (s) οι τετμημένες. Λαμβάνεται η κλίση της ευθείας που προσαρμόζεται βέλτιστα επί του γραμμικού τμήματος των μετρήσεων. Η μαθηματική σχέση με την οποία υπολογίζεται η δράση της λακκάσης δίδεται από την παρακάτω σχέση:

$$E = \frac{\alpha \cdot V_{\text{μίγματος}} \cdot 10^6}{\epsilon \cdot b \cdot V_{\text{ενζύμου}}}$$

E, η δραστηρότητα του ενζύμου, U/L

α , η κλίση της ευθείας του γραμμικού τμήματος των μετρήσεων, min^{-1}

ϵ , οριακή απορροφητικότητα ($\epsilon_{\text{ABTS}}=361000 \text{ L}/(\text{mol} \cdot \text{cm})$)

b, το μήκος της κυψελίδας στην οποία γίνεται η αντίδραση, cm

$V_{\text{μίγματος}}$, ο όγκος του μίγματος της αντίδρασης, μL

$V_{\text{ενζύμου}}$, ο όγκος του δείγματος του ενζύμου προς προσδιορισμό, μL

3.6.2. Υπεροξειδάσες εξαρτημένες και ανεξάρτητες του μαγγανίου

Αρχικά σε τελικό όγκο 1ml προστέθηκαν 630μL ρυθμιστικό διάλυμα φωσφορικού νατρίου pH=4,5 και σε συγκέντρωση 0,1M, 100μL DMAB με συγκέντρωση 25mM, 50μL MBTH με συγκέντρωση 50mM και 200μL δείγμα ενζυμικού παρασκευάσματος κατάλληλα αραιωμένο. Παρασκευάστηκαν τρεις δοκιμαστικοί σωλήνες αυτού του διαλύματος. Στον πρώτο, προστέθηκαν 20mL απιονισμένο νερό. Το παραπάνω μίγμα αποτελούσε το τυφλό διάλυμα. Στον δεύτερο, προστέθηκαν 10μL υπεροξειδίου του υδρογόνου με C=5mM και 10μL απιονισμένο νερό. Επειδή απουσίαζε το μαγγάνιο, με την παραπάνω αντίδραση προσδιορίζονταν οι υπεροξειδάσες που είναι ανεξάρτητες από αυτό. Στον τρίτο, προστέθηκαν 10μL MnSO_4 με C=10mM και 10μL υπεροξειδίου του υδρογόνου με C=5mM. Με την παραπάνω αντίδραση προσδιορίζονταν οι υπεροξειδάσες που εξαρτώνται από το μαγγάνιο. Τέλος, πραγματοποιήθηκε φωτομέτρηση ανά 1λεπτό και για 10λεπτά στους 25°C στα 590nm (Ngo and Lenhoff, 1980). Ως τυφλό χρησιμοποιήθηκε διάλυμα που περιείχε αντί για ποσότητα ενζυμικού παρασκευάσματος, ενζυμικό διάλυμα βρασμένο για 20 λεπτά, που είχε υποστεί την ίδια επεξεργασία.

Η μετατροπή της απορρόφησης σε συγκέντρωση προϊόντος πραγματοποιείται με τη χρήση του μαθηματικού νόμου Lambert-Beer, όπου $\epsilon=32900\text{M}^{-1}\text{cm}^{-1}$ και $b=1\text{cm}$.

Η μαθηματική σχέση με την οποία υπολογίστηκε η παρεμβολή του υποστρώματος δίδεται από την παρακάτω σχέση:

$$E = \frac{a \cdot V_{\text{μηνιας}} \cdot 10^6}{\epsilon \cdot b \cdot V_{\text{εξόμω}}}$$

3.6.3. Κυτταρινάσες

Η ολική ενεργότητα κυτταρινασών (Filter Paper Activity-FPA Units) μετρήθηκε σύμφωνα με τη μέθοδο κατά IUPAC (**Ghose T.K.,1987**). Σε δοκιμαστικό σωλήνα που βρίσκεται σε παγόλουτρο τοποθετήθηκαν τα 50 mg του Filter Paper Whatman No1 (καθαρή κυτταρίνη) σε διαστάσεις 1x6 cm και προστέθηκαν 1 mL ρυθμιστικού διαλύματος κιτρικών-φωσφορικών 100 mM, pH=5.0 και 1 mL ενζυμικού σκευάσματος κατάλληλα αραιωμένου. Το προκύπτον διάλυμα αναδεύτηκε και στη συνέχεια αφέθηκε για επώαση σε λουτρό σταθερής θερμοκρασίας (50°C) για 30 λεπτά. Μετά την πάροδο των 30 λεπτών οι δοκιμαστικοί σωλήνες τοποθετήθηκαν σε παγόλουτρο για περίπου 15 λεπτά, και στη συνέχεια φυγοκεντρήθηκαν. Από το υπερκείμενο λήφθηκαν 0.5mL και μεταφέρθηκαν σε νέο δοκιμαστικό σωλήνα όπου ακολούθησε προσθήκη 0.5mL διαλύματος δινιτροσαλικυλικού οξέος (DNS). Στη συνέχεια το διάλυμα υπέστη βρασμό για 5 λεπτά, ενώ μετά το βρασμό ακολούθησε προσθήκη 4ml απιονισμένου νερού. Η φωτομέτρηση πραγματοποιήθηκε σε μήκος κύματος 540 nm. Παρασκευάστηκαν δύο τυφλά διαλύματα. Το πρώτο που περιείχε μόνο υπόστρωμα και 2ml ρυθμιστικού διαλύματος και ακλούθησε τη διαδικασία που περιγράφηκε μέχρι το σημείο της επώασης για 30λεπτά στους 50°C χρησιμοποιήθηκε για το μηδενισμό στη φωτομέτρηση, ενώ το δεύτερο περιείχε 250μl ένζυμο, 250μl ρυθμιστικό διάλυμα και 0.5ml DNS, χρησιμοποιήθηκε συγκριτικά με το παραπάνω διάλυμα στη φωτομέτρηση.

Οι υπολογισμοί σε μονάδες Units έγιναν βάση του εξής ορισμού: 1 Unit ολικής ενεργότητας κυτταρινασών ορίζεται ως η ποσότητα του ενζύμου που απαιτείται για την παραγωγή 1 μmol γλυκόζης ανά min σε pH=5.0 και θερμοκρασία 50 °C. Θεωρήθηκε ότι τα αναγωγικά σάκχαρα που προκύπτουν από την υδρόλυση της κυτταρίνης είναι μόνο γλυκόζες και όχι και οι ξυλόζες. Η μέτρηση της γλυκόζης πραγματοποιήθηκε με τη μέθοδο DNS και για το σκοπό αυτό απαραίτητη υπήρξε η κατασκευή πρότυπης καμπύλης βαθμονόμησης γλυκόζης με τη μέθοδο αυτή, η οποία καμπύλη παρουσιάζεται στο **ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ 1**. Ο μαθηματικός τύπος που χρησιμοποιήθηκε ήταν ο παρακάτω:

$$\frac{\text{Units enz}}{\text{ml cult}} = \frac{\mu\text{mol (gluc)}}{\text{ml}} * \frac{\text{Venz}}{\text{Vol}}$$

3.6.4. β-γλυκοζιδάση

Για τον προσδιορισμό της ολικής ενεργότητας β-γλυκοζιδάσης, ποσότητα ενζυμικού παρασκευάσματος αναμίχθηκε σε τελικό όγκο 1ml με κατάλληλο διάλυμα υποστρώματος ποσότητας 100μl (50g/l cellobiose) και 700μl ρυθμιστικό διάλυμα 100mM φωσφορικού καλίου (potassium phosphate) pH=4,5. Το μίγμα επώαστηκε στους 40°C για 30λεπτά υπό ανάδευση (800rpm). Ο προσδιορισμός της συγκέντρωσης του προϊόντος πραγματοποιήθηκε με τη μέθοδο της οξειδάσης της γλυκόζης με τη βοήθεια εμπορικού kit. Πιο συγκεκριμένα, σε 1ml του εμπορικού kit (glucotest) προστέθηκαν 10μl από το μίγμα αντίδρασης που υπέστη την παραπάνω διαδικασία. Στη συνέχεια, το προκύπτον διάλυμα επώαστηκε για 15 λεπτά στους 37°C και τέλος το διάλυμα φωτομετρήθηκε στα 510nm (**Zerva et al., 2014**). Ως τυφλό χρησιμοποιήθηκε διάλυμα που περιείχε αντί για ποσότητα ενζυμικού παρασκευάσματος, ενζυμικό διάλυμα βρασμένο για 20 λεπτά, που είχε υποστεί την ίδια επεξεργασία. Ο μηδενισμός του φωτομέτρου πραγματοποιήθηκε από

τυφλό διάλυμα που περιελάμβανε ποσότητα υποστρώματος και του αντίστοιχου ρυθμιστικού διαλύματος. Απαραίτητη για τους υπολογισμούς είναι η κατασκευή πρότυπης καμπύλης βαθμονόμησης γλυκόζης, η οποία παρουσιάζεται στο **ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ 1**.

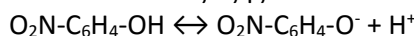
Οι υπολογισμοί σε μονάδες Units έγιναν βάση του εξής ορισμού: 1 Unit ολικής ενεργότητας β-γλυκοζιδάσης ορίζεται ως η ποσότητα του ενζύμου που απαιτείται για την παραγωγή 1 μmol γλυκόζης ανά min σε pH=4.5 και θερμοκρασία 40 °C. Τα αναγωγικά σάκχαρα που προκύπτουν από την υδρόλυση της κελλοβιόζης είναι μόνο γλυκόζες. Η μέτρηση της γλυκόζης πραγματοποιήθηκε με τη βοήθεια εμπορικού διαγνωστικού σκευάσματος glucotes, με μέθοδο που περιγράφεται αναλυτικά στο **ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ 1**. Για το σκοπό αυτό απαραίτητη υπήρξε η κατασκευή πρότυπης καμπύλης βαθμονόμησης γλυκόζης με την αντίστοιχη μέθοδο, η οποία καμπύλη παρουσιάζεται στο **ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ 1**. Ο μαθηματικός τύπος που χρησιμοποιήθηκε για την μετατροπή της συγκέντρωσης της γλυκόζης σε μονάδες ενεργότητας ήταν ο παρακάτω:

$$\frac{Units\ enz}{ml\ cult} = \frac{\mu mol\ (gluc)}{ml} * \frac{Venz}{Vol}$$

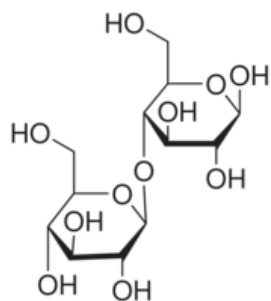
3.6.5. β-ξυλοζιδάση

Η ενεργότητα της β-γλυκοζιδάσης μετρήθηκε με τη χρήση του *p*-νιτροφαινυλ-β-D-γλυκοπυρανοζιδίου (*p*Nitrophenyl-β-D-glucopyranoside, *p*NPG) (Mamma et al., 1996). Θα πρέπει να σημειωθεί ότι το φυσικό υποστρώμα της β-γλυκοζιδάσης είναι ο διασακχαρίτης κελλοβιόζη (Σχήμα 6α). Το *p*NPG (Σχήμα 6β) αποτελείται από ένα μόριο γλυκόζης και ένα μόριο πάρα-νιτροφαινόλης ενωμένα με β-D-γλυκοζιτικό δεσμό. Η β-γλυκοζιδάση αναγνωρίζει και υδρολύει το δεσμό αυτό. Ουσιαστικά το μόριο του *p*NPG αποτελεί απομίμηση του μορίου της κελλοβιόζης. Η υδρόλυση του εν λόγω δεσμού οδηγεί στην απελευθέρωση παρα-νιτροφαινόλης.

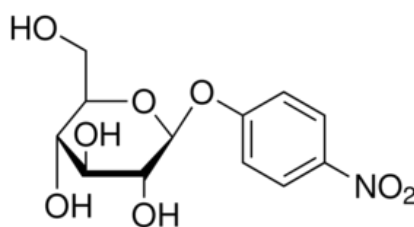
Η παρα-νιτροφαινόλη αποτελεί μία συχνά χρησιμοποιούμενη οργανική ένωση στις βιοχημικές αναλύσεις. Πρόκειται για ένα ασθενές οξύ το οποίο δίσταται ως εξής :



Σε μήκος κύματος 410 nm η ιονισμένη μορφή της απορροφά την προσπίπτουσα οπτική ακτινοβολία. Το γεγονός αυτό οδηγεί στο συμπέρασμα ότι η απορρόφηση των διαλυμάτων της παρα-νιτροφαινόλης εξαρτάται από το pH.



Σχήμα 6α. Κελλοβιόζη



Σχήμα 6β. *p*-νιτροφαινυλ-β-D-γλυκοπυρανοζίδιο

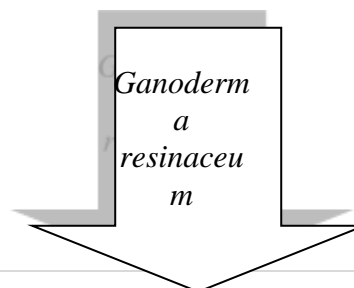
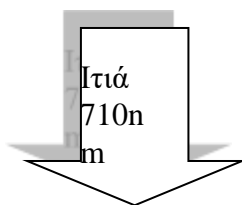
Για τον προσδιορισμό της ολικής ενεργότητας β-ξυλοζιδάσης, ποσότητα ενζυμικού παρασκευάσματος αναμίχθηκε με κατάλληλο διάλυμα υποστρώματος 100μl(0.5mM *p*NP-xylopyranoside) σε ρυθμιστικό διάλυμα 100mM potassium phosphate pH=4.5 700μl. Το μίγμα επώαστηκε στους 40°C για 30λεπτά υπό ανάδευση (800rpm). Ο προσδιορισμός της συγκέντρωσης του προϊόντος πραγματοποιήθηκε μετρώντας την απορρόφηση του διαλύματος στα 410nm αφού είχε προηγηθεί τερματισμός της αντίδρασης με 1M Na₂CO₃ (Zerva et al., 2014). Ως τυφλό χρησιμοποιήθηκε διάλυμα που περιείχε αντί για ποσότητα ενζυμικού παρασκευάσματος, ενζυμικό διάλυμα βρασμένο για 20 λεπτά, που είχε υποστεί την ίδια επεξεργασία. Για

το μηδενισμό του φωτομέτρου χρησιμοποιήθηκε τυφλό διάλυμα που περιείχε μόνο ποσότητα υποστρώματος και ρυθμιστικού διαλύματος.

Οι υπολογισμοί σε μονάδες Units έγιναν βάσει του εξής ορισμού: 1 Unit ολικής ενεργότητας β-ξυλοζιδάσης ορίζεται ως η ποσότητα του ενζύμου που απαιτείται για την παραγωγή 1 μmol pNP ανά min σε pH=4.5 και θερμοκρασία 40 °C. Απαραίτητη για τους υπολογισμούς είναι η κατασκευή πρότυπης καμπύλης βαθμονόμησης pNP, η οποία παρουσιάζεται στο **ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ 1**, καθώς σκοπός ήταν ο προσδιορισμός των μονάδων pNP που απελευθερώνονταν από τη δράση του ενζύμου. Η μετατροπή της συγκέντρωσης pNP σε μονάδες ενεργότητας του ενζύμου πραγματοποιήθηκε με βάση τον παρακάτω τύπο.

$$\frac{\text{Units enz}}{\text{ml cult}} = \frac{\mu\text{mol (pNP)}}{\text{ml}} * \frac{\text{Venz}}{\text{Vol}}$$

4. Διάγραμμα ροής πειραματικής διαδικασίας



Προετοιμασία σωλήνων με 20g
ιτιά 80% υγρασίας

Καλλιέργεια σε τρυβλίο petri με
θρεπτικό PDA

Υγρή καλλιέργεια σε malt
extract

Βιολογική προεπεξεργασία

Εμβολιασμός του μύκητα από την υγρή καλλιέργεια στους δοκιμαστικούς
με υπόστρωμα ιτιάς κοκκομετρίας 710μm και 80% υγρασίας

Μέτρηση ανάπτυξης
βιομάζας στην στερεή
καλλιέργεια

Παρασκευή ενζυμικού διαλύματος
από την καλλιέργεια και το τυφλό της
μέσω εκχύλισης της στερεής
καλλιέργειας

Μέτρηση ολικών
πρωτεϊνών

Μέτρηση ενζυμικής
ενεργότητας

Αποτελέσματα - Συμπεράσματα

1. Σωλήνες καλλιέργειας

Τα στοιχεία του κάθε δείγματος για την ποσότητα του υποστρώματος ιτιάς που περιέχει, για την υγρασία του υποστρώματος όπως αυτή μετρήθηκε πριν τον εμβολιασμό και την ημέρα της δειγματοληψίας, καθώς και για την ποσότητα του εμβολίου που εισήχθει, παρουσιάζονται συγκεντρωτικά στον πίνακα (πίνακας 11) που ακολουθεί:

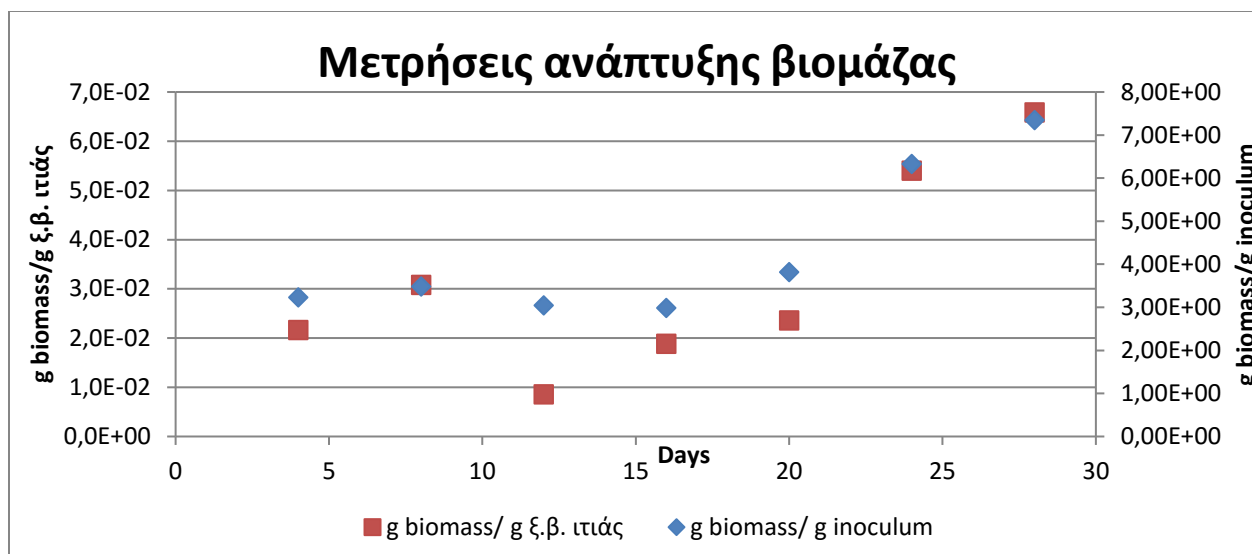
Πίνακας 11: Συγκεντρωτικά στοιχεία για τα χαρακτηριστικά κάθε δείγματος.

ΔΕΙΓΜΑ	Ημ/νια δειγματοληψίας	Αρχική Υγρασία %	Τελική Υγρασία %	ΚΑΘΑΡΟ ΒΑΡΟΣ ΙΤΙΑΣ (g)	ΚΑΘΑΡΟ ΒΑΡΟΣ ΕΜΒΟΛΙΟΥ (TS Fungi) (g)
1	13-Jun	80.79	84.82	15.024	0.033
2	17-Jun	80.79	85.18	19.417	0.029
3	21-Jun	80.79	80.59	20.625	0.019
4	25-Jun	80.79	83.48	18.940	0.023
5	29-Jun	80.79	79.91	20.177	0.024
6	3-Jul	80.79	82.99	20.195	0.036
7	7-Jul	80.79	79.21	19.616	0.032
<u>1</u>	13-Jun	80.96	82.49	24.847	0.032
<u>2</u>	17-Jun	80.96	81.06	20.406	0.034
<u>3</u>	21-Jun	80.96	80.40	20.680	0.011
<u>4</u>	25-Jun	80.96	81.02	19.841	0.027
<u>5</u>	29-Jun	80.96	82.83	20.140	0.032
<u>6</u>	3-Jul	80.96	81.55	20.647	0.033
<u>7</u>	7-Jul	80.96	81.07	20.476	0.034
blank1	7-Jul	80.74	78.07	21.133	0
blank2	17-Jun	80.74	81.04	20.114	0
blank3	29-Jun	80.74	77.67	19.555	0
blank4	29-Jun	80.39	78.82	20.181	0

Οι τιμές της αρχικής υγρασίας αναφέρονται στην υγρασία που είχε ο πολτός ιτιάς της κάθε παρτίδας που χρησιμοποιήθηκε για το γέμισμα των σωλήνων καλλιέργειας, πριν από την αποστείρωση και τον εμβολιασμό του υποστρώματος. Οι τιμές τελικής υγρασίας αναφέρονται στην υγρασία της καλλιέργειας που μετρήθηκε την ημέρα της δειγματοληψίας.

2. Τα αποτελέσματα των μετρήσεων ανάπτυξης βιομάζας και ολικών πρωτεϊνών

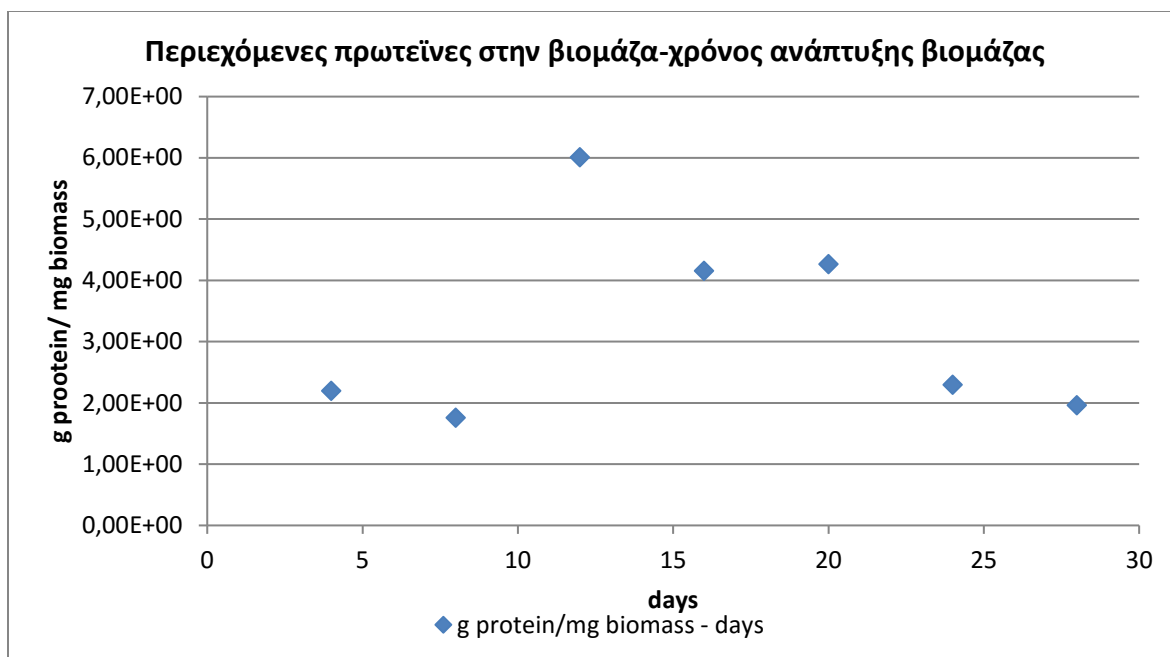
Η ανάπτυξη της βιομάζας του μύκητα *G.resinaceum* από την ημέρα 4 έως την ημέρα 28 της καλλιέργειας παρουσιάζεται στο παρακάτω διάγραμμα συναρτήσεως της μονάδας μάζας ξ.β. ιτιάς και εμβολίου που εισήχθησαν στους σωλήνες καλλιέργειας.



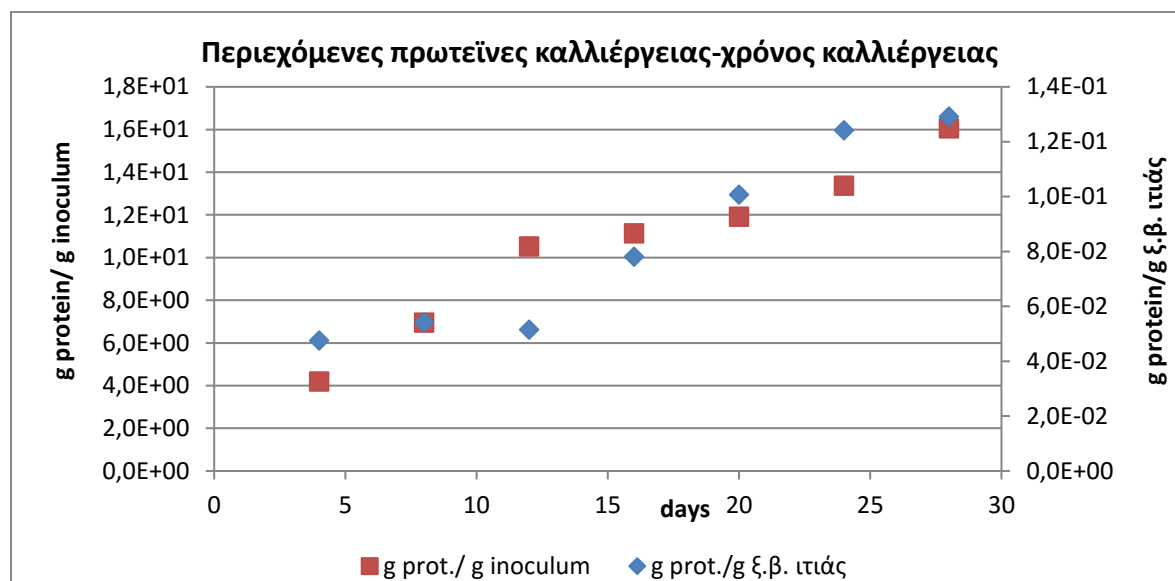
Διάγραμμα 1: Διάγραμμα απεικόνισης ανάπτυξης βιομάζας του μύκητα *G.resinaceum* ανά ξηρή βάση υποστρώματος και εμβολίου συναρτήσε του χρόνου.

Οι υπολογισμοί μάζας της ανεπτυγμένης βιομάζας έγιναν με τη βοήθεια της πρότυπης καμπύλης απορρόφησης- συγκέντρωσης γλυκοζαμίνης (**διάγραμμα 1, ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ 1**) και αναγωγή των αποτελεσμάτων αυτών στην συγκέντρωση βιομάζας στο εξουδετερωμένο δείγμα. Στη συνέχεια, υπολογίστηκε η βιομάζα στα 5g καλλιέργειας που χρησιμοποιήθηκαν αρχικά στη μέθοδο και τέλος έγινε αναγωγή στις μονάδες που παρουσιάζονται στο **διάγραμμα 1**. Τα αναλυτικά στοιχεία μάζας καλλιέργειας, ξηρής ιτιάς και εμβολίου, καθώς και οι υπολογισμοί παρουσιάζονται αναλυτικά στο **ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ 2**.

Επιλέχθηκε η παρουσίαση των αποτελεσμάτων mg βιομάζας ανά ξηρή βάση ιτιάς, διότι διαπιστώνεται η ανάπτυξη της βιομάζας του συγκεκριμένου μύκητα ανά ποσότητα διαθέσιμου υποστρώματος. Επίσης αναγκαία κρίθηκε και η παρουσίαση του αντίστοιχου αποτελέσματος ανά g εμβολίου, καθώς τα δείγματα καλλιέργειας που παρασκευάστηκαν εμφανίζουν ανομοιογένεια ως προς την ποσότητα εμβολίου που εισήχθει στο υπόστρωμα και άρα ο λόγος g ξηρής βάσης ιτιάς/ g εμβολίου διαφέρει ανά δείγμα. Επιπλέον, με τα μεγέθη αυτά υποδηλώνεται και η επίδραση που έχει η συγκέντρωση του υποστρώματος στην καλλιέργεια στερεής κατάστασης, αλλά και ξεχωριστά η επίδραση της συγκέντρωσης των κυττάρων του μύκητα που εισήχθησαν κατά τον εμβολιασμό της καλλιέργειας. Τέλος, αναγκαίο κρίνεται να διευκρινιστεί ότι στα αποτελέσματα μάζας των πρωτεϊνών που παρουσιάζονται στο **διάγραμμα 2,3** αναφέρονται μόνο στις πρωτεΐνες που προέρχονται από το μύκητα και όχι στις πρωτεΐνες που περιέχονται στο υπόστρωμα ιτιάς. Αυτό εξασφαλίστηκε με τη μέτρηση των πρωτεϊνών σε εκχύλισμα των δειγμάτων καλλιέργειας αλλά και σε εκχύλισμα των τυφλών δειγμάτων του χρησιμοποιήθηκαν. Κατά τον υπολογισμό αφαιρέθηκε από τις ολικές πρωτεΐνες που περιέχονται στα δείγματα καλλιέργειας ο μέσος όρος των ολικών πρωτεϊνών των τυφλών δειγμάτων. Τα αποτελέσματα παρουσιάζονται σε αναλυτικό πίνακα (**πίνακας 1,ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ2**) στο **ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ 2**.



Διάγραμμα 2: Διαγραμματική απεικόνιση του λόγου μάζας των g παραγόμενων πρωτεϊνών ανά mg βιομάζας συναρτήσει του χρόνου της καλλιέργειας.



Διάγραμμα 3: Διαγραμματική απεικόνιση περιεχομένων πρωτεϊνών στο εμβόλιο και στο υπόστρωμα που χρησιμοποιήθηκε συναρτήσει του χρόνου καλλιέργειας.

Το φαινόμενο της κυτταρικής ανάπτυξης μελετήθηκε στα πλαίσια διεργασίας διαλείποντος έργου με περιορισμένη ποσότητα υποστρώματος (περίπου 20g ιτιάς), μέγεθος υποστρώματος 710nm, θερμοκρασία 39°C και υγρασία περίπου 80%. Το φαινόμενο αυτό εξετάζεται με βάση την πρότυπη καμπύλη κυτταρικής ανάπτυξης σε διεργασία διαλείποντος έργου, η οποία ακολουθεί τις φάσεις:

- Λανθάνουσα φάση
- Λογαριθμική ή εκθετική φάση
- Φάση επιβράδυνσης
- Φάση στασιμότητας

- Φάση θανάτου

καθώς επίσης θα συνυπολογιστούν και οι διάφοροι παράγοντες (εμβόλιο, υγρασία, αερισμός, μέγεθος υποστρώματος, θερμοκρασία, αποστείρωση πρώτης ύλης και χρόνος προεπεξεργασίας) που μπορεί να επηρεάσουν κάθε μία από τις φάσεις ανάπτυξης του μύκητα.

Η λανθάνουσα φάση ξεκινά μετά τον εμβολιασμό και αντιπροσωπεύει το στάδιο όπου συμβαίνει η προσαρμογή των κυττάρων του μύκητα στο νέο περιβάλλον, καθώς και η προετοιμασία του κυττάρου για τη σύνθεση ενζύμων απαραίτητων για τις καταβολικές του διεργασίες (**Κέκος και Καλογεράς, 2010**). Στη φάση αυτή δεν πραγματοποιείται πολλαπλασιασμός των κυττάρων, ενώ παρατηρείται μικρή αύξηση της μάζας αυτών (**Shuler and Kargi, 2005**). Στο **διάγραμμα 1** μπορούμε να διακρίνουμε τη φάση αυτή να διαρκεί έως και την 12^η ημέρα. Η καθυστέρηση αυτού του σταδίου εξαρτάται από διάφορους παράγοντες, εκ των οποίων κυριότεροι θεωρούνται η σύσταση και η ποσότητα του υποστρώματος που χρησιμοποιείται ως θρεπτικό μέσο, καθώς και η ηλικία και το μέγεθος του εμβολίου. Η μείωση της διάρκειας του σταδίου αυτού ευνοείται γενικά από τη συγγένεια της σύστασης του εμβολίου με το νέο υπόστρωμα, καθώς και από τη χρήση ποσότητας εμβολίου 5-10% του όγκου του της κύριας καλλιέργειας (**Κέκος και Καλογεράς, 2010**). Στο συγκεκριμένο πείραμα η ποσότητα του εμβολίου που προστέθηκε ήταν περίπου το 9-11% της κύριας καλλιέργειας (2ml εμβολίου/ποσότητα υποστρώματος που έχει προστεθεί ανά δείγμα, βλέπε **πίνακα 11**), ωστόσο η ανομοιογένεια του εμβολίου καθώς και η διακύμανση στη μάζα του υποστρώματος που περιείχε κάθε δείγμα αποτυπώνονται στα αποτελέσματα ως διακυμάνσεις στην πρότυπη καμπύλη. Σε ότι αφορά στην επιρροή των χαρακτηριστικών του εμβολίου, τα κύτταρα του εμβολίου πρέπει να βρίσκονται στην εκθετική φάση ανάπτυξής τους (**Κέκος και Καλογεράς, 2010**), γεγονός που διασφαλίζεται στο πείραμα αυτό. Επιπλέον, η ποσότητα του εμβολίου επηρεάζει την διάρκεια της λανθάνουσας φάσης. Στη συγκεκριμένη πειραματική διαδικασία η ποσότητα ξηρής βάσης εμβολίου διαφέρει από δείγμα σε δείγμα, γεγονός που δημιουργεί προϋποθέσεις για διαφορετικό χρόνο ανάπτυξης των κυττάρων σε κάθε δείγμα. Καθώς η διακύμανση της ξηρής μάζας κυττάρων στο εμβόλιο είναι <1% και η διακύμανση στη μάζα του υποστρώματος φτάνει περίπου το 2%, οδηγούμαστε στο συμπέρασμα ότι η καθυστέρηση της λανθάνουσας φάσης δεν επηρεάζεται σε μεγάλο βαθμό από το εμβόλιο και το θρεπτικό μέσο που χρησιμοποιήθηκαν, ωστόσο μπορεί να οφείλεται είτε στη κακή κατάσταση του εμβολίου, λόγω του τρόπου ομοιογενοποίησης της υγρής καλλιέργειας είτε στη σχέση συγγένειας του εμβολίου με το υπόστρωμα. Οι παράγοντες που πρέπει να συνυπολογίσουμε σε αυτή τη διερεύνηση είναι οι συνθήκες καλλιέργειας, όπως η θερμοκρασία και ο αερισμός αυτής, καθώς και η κοκκομετρία του υποστρώματος που μπορεί να επηρεάσει τους δύο παραπάνω παράγοντες. Το μικρό μέγεθος κόκκων του υποστρώματος ιτιάς που χρησιμοποιήθηκε στο συγκεκριμένο πείραμα αποτελεί την αιτία ύπαρξης βαθμίδων θερμοκρασίας και συγκέντρωσης οξυγόνου, τα οποία ίσως να δρουν παρεμποδιστικά στην κυτταρική αναδιοργάνωση στο στάδιο αυτό.

Μεταξύ της λανθάνουσας και της εκθετικής φάσης ανάπτυξης παρατηρείται μια μεταβατική φάση κατά την οποία τα κύτταρα που έχουν καταφέρει να δημιουργήσουν τους απαραίτητους ενζυμικούς κύκλους περνάνε στην εκθετική φάση ανάπτυξης (**Κέκος και Καλογεράς, 2010**). Παρατηρώντας συνδυαστικά τα **διαγράμματα 1,2 και 3** διακρίνουμε από το **διάγραμμα 1** ότι δεν υπάρχει σημαντική αύξηση κυττάρων ανάμεσα στις ημέρες 12 με 16, ενώ στο **διάγραμμα 2** φαίνεται η μέγιστη περιεκτικότητα της βιομάζας σε πρωτεΐνες να είναι την ημέρα 12. Επιπλέον, το **διάγραμμα 3** μας πληροφορεί ότι το περιεχόμενο των πρωτεϊνών ανά μονάδα μάζας υποστρώματος μέχρι τη 12^η ημέρα είναι σχεδόν στάσιμη ενώ στην συνέχεια αυξάνεται, καθώς ο λόγος της μάζας των πρωτεϊνών ανά μονάδα μάζας εμβολίου παρουσιάζει αυξητική τάση έως την 12^η ημέρα, στη συνέχεια σχεδόν σταθεροποιείται έως ότου να παρουσιάσει μια μικρή αύξηση στις 24 και 28 ημέρες καλλιέργειας. Στη 16^η ημέρα ήδη βλέπουμε μια πτώση στην τιμή του λόγου μάζας πρωτεϊνών ως προς την ανεπτυγμένη βιομάζα που οφείλεται στο ότι η τιμή ανεπτυγμένης βιομάζας ποσοσιαία εμφανίζει μεγαλύτερη αύξηση σε σχέση με την αντίστοιχη αύξηση των πρωτεϊνών ανά ποσότητα εμβολίου. Συμπερασματικά, η μεταβατική φάση ανάπτυξης ολοκληρώνεται ανάμεσα στο

διάστημα των 12 με 16 ημερών, ενώ στην 16^η ημέρα η ανάπτυξη του κυττάρου μπαίνει στην εκθετική της φάση.

Ακολουθεί η εκθετική φάση ανάπτυξης του κυττάρου, όπου τα κύτταρα έχουν προσαρμοστεί στο νέο περιβάλλον και μπορούν πλέον να αυξάνονται σε αριθμό αλλά και σε μάζα με εκθετικό τρόπο, με τον ίδιο ρυθμό (Shuler and Kargi, 2005). Η εκθετική φάση, με βάση το **διάγραμμα 1** διαρκεί μέχρι την 24^η ημέρα της καλλιέργειας, καθώς την 28^η ημέρα η ανεπτυγμένη βιομάζα παρουσιάζει πολύ μικρή αύξηση, αλλάζοντας την κλίση της καμπύλης στην εκθετική φάση. Η κλίση της καμπύλης στο στάδιο αυτό μας πληροφορεί για την ταχύτητα ανάπτυξης του κυττάρου και εξαρτάται από παράγοντες που αφορούν στις βαθμιδώσεις τιμών θερμοκρασίας και συγκέντρωσης οξυγόνου, οι οποίες διαμορφώνουν συνθήκες που μπορούν να παρεμποδίσουν ή να διευκολύνουν την ανάπτυξη και τον πολλαπλασιασμό. Στο συγκεκριμένο πείραμα οι δύο αυτές βαθμιδώσεις είναι έντονες, καθώς το υπόστρωμα που έχει εισαχθεί στους σωλήνες καλλιέργειας είναι μικρής κοκκομετρίας, άρα δεν υπάρχει χώρος για καλύτερο αερισμό μεταξύ των κόκκων του υποστρώματος. Ωστόσο, ο τρόπος που πραγματοποιήθηκε η εισαγωγή του υποστρώματος δεν εξασφάλιζε τη συνεχή και ομοιόμορφη κατανομή αυτού μέσα στο σωλήνα, με αποτέλεσμα να δημιουργούνται κενοί χώροι όχι όμως με ομοιόμορφο τρόπο μεταξύ των δειγμάτων. Το γεγονός αυτό προκαλεί βαθμίδωση θερμοκρασίας, δεδομένου μάλιστα ότι θερμότητα παράγεται από τον μεταβολισμό του ίδιου μύκητα. Επιπλέον, ο τρόπος κατανομής του υποστρώματος σε συνδυασμό με τον τρόπο εισαγωγής του εμβολίου στο σωλήνα οδηγεί και σε βαθμίδωση συγκέντρωσης εμβολίου στο υπόστρωμα με αποτέλεσμα ο μύκητας να αναπτύσσει τη βιομάζα του ανομοιογενώς μέσα στην καλλιέργεια. Ως προς την συμπεριφορά των πρωτεϊνών, από το **διάγραμμα 2** φαίνεται ότι οι περιεχόμενες πρωτεΐνες στην ποσότητα βιομάζας κυττάρων που αναπτύσσονται μειώνονται, γεγονός που δικαιολογείται από την μεγαλύτερη ποσοστιαία αύξηση της ποσότητας βιομάζας σε σχέση με την μάζα των πρωτεϊνών ανά μονάδα μάζας εμβολίου που προστέθηκε. Συμπερασματικά, κατά την λανθάνουσα έως και τη μεταβατική φάση ανάπτυξης του κυττάρου ο μύκητας παράγει σχεδόν όλες τις πρωτεΐνες που χρειάζεται για τις μεταβολικές του διεργασίες και τις διαδικασίες ανάπτυξης και παραγωγής, οι οποίες προϋποθέτουν την ενζυμική αποδόμηση του υποστρώματος, χωρίς ταυτόχρονα να αυξάνει σημαντικά τη βιομάζα του. Στην εκθετική φάση ανάπτυξης, ο μύκητας παράγει μικρότερες ποσότητες πρωτεϊνών, ενώ επιδίδεται στην παραγωγή κυττάρων και ανάπτυξης αυτών.

Η φάση επιβράδυνσης ακολουθεί μετά την εκθετική φάση και ξεκινάει την 28^η ημέρα της καλλιέργειας. Ωστόσο, επιπλέον μετρήσεις βιομάζας πέραν της 28^{ης} ημέρας καλλιέργειας θα μπορούσαν να στηρίξουν καλύτερα το συμπέρασμα αυτό. Στο στάδιο αυτό, η ανάπτυξη επιβραδύνεται είτε λόγω παρεμπόδισης από το υπόστρωμα (εξάντληση θρεπτικών υλικών), είτε λόγω παρεμπόδισης από τοξικά παραπροϊόντα. Στη φάση αυτή, το κύτταρο προκειμένου να επιβιώσει στο εχθρικό περιβάλλον που έχει διαμορφωθεί προσπαθεί να αναδιοργανωθεί. Στο **διάγραμμα 3**, παρατηρούμε ότι οι πρωτεΐνες που περιέχονται ανά g εμβολίου αυξάνονται μετά από μία περίοδο που παρέμεναν σχετικά σταθερές. Η διάρκεια αυτής της περιόδου ήταν όσο και η εκθετική φάση, γεγονός που επιβεβαιώνει ότι ο μύκητας έχει περάσει σε μια μεταβατική φάση προσαρμογής στο νέο περιβάλλον. Καθώς στο πείραμα μελετήθηκε η ανάπτυξη του μύκητα μόνο για 28 ημέρες, δεν μπορούμε να εξαγάγουμε συμπέρασμα για το αν η μεταβατική αυτή φάση θα εξελιχθεί σε φάση στασιμότητας και τελικά θάνατο του μύκητα ή αν ο μύκητας θα βρει μια νέα πηγή άνθρακα και θα μπει σε έναν νέο κύκλο ανάπτυξης.

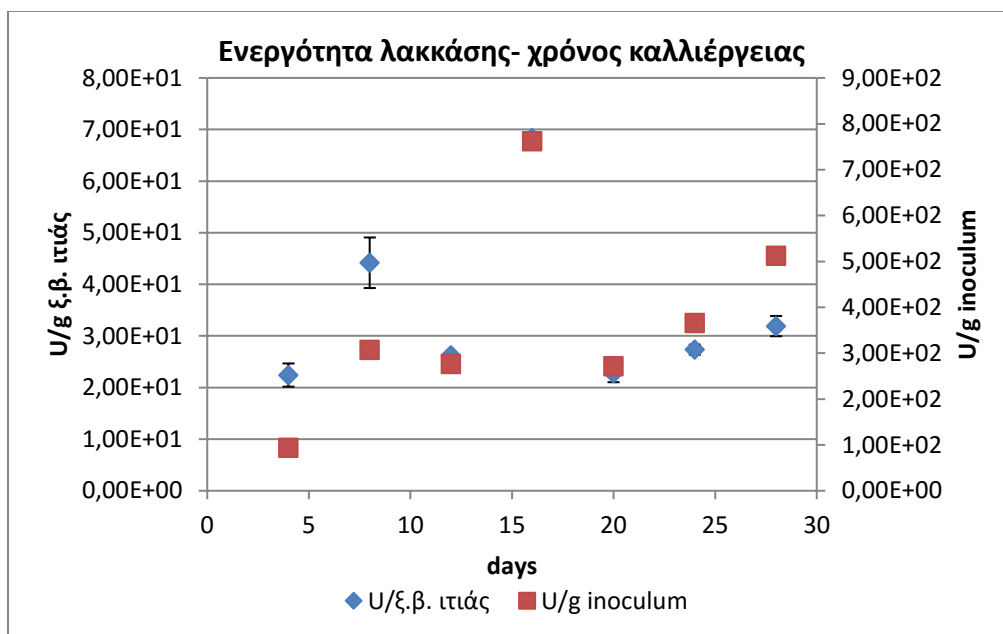
3. Αποτελέσματα ενεργότητας ενζύμων αποδόμησης λιγνοκυτταρινούχου βιομάζας

1.1. Ένζυμα υπεύθυνα για την αποδόμηση λιγνίνης

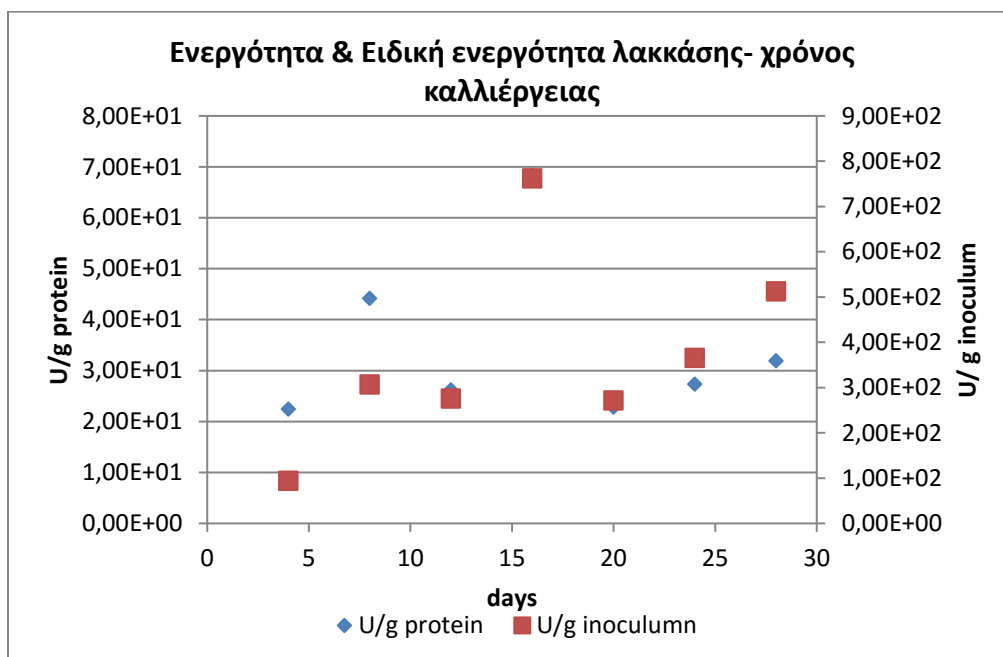
Από τα ένζυμα που μελετήθηκαν στην συγκεκριμένη πειραματική διαδικασία η λακκάση και οι υπεροξειδάσες, εξαρτημένες και ανεξάρτητες του μαγγανίου, είναι αυτά που επιτίθενται στη λιγνίνη. Στα διαγράμματα που ακολουθούν παρουσιάζεται η ενεργότητα των ενζύμων αυτών στο διάστημα των 28 ημερών, ενώ τα συγκεντρωτικά αποτελέσματα για το κάθε ένζυμο βρίσκονται στους **πίνακες 12 έως 14**. Στο **ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ 2** εμφανίζονται αναλυτικά οι πρωτογενείς μετρήσεις (**πίνακες 7-27 και διαγράμματα 1-21, ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ 2**) καθώς και η επεξεργασία αυτών.

Πίνακα 12: Συνοπτικός πίνακας αποτελεσμάτων ενεργότητας για το ένζυμο λακκάση.

ΣΥΝΟΠΤΙΚΟΣ ΠΙΝΑΚΑΣ						
Laccase						
αρ. Δειγμ.	Ημ/νια	Υστα 40mlE	g protein/g ξ.β. Ιτιάς	g protein/g inoculum	g ξ.β ιτιάς/g inoculum	g inoculum
1/1	13-Jun	2.13E+00	4.75E-02	4.19E+00	8.83E+01	3.27E-02
1/2	17-Jun	4.79E+00	5.42E-02	6.95E+00	1.28E+02	2.91E-02
1/3	23-Jun	2.70E+00	5.15E-02	1.05E+01	2.04E+02	1.94E-02
1/4	28-Jun	1.07E+01	7.82E-02	1.11E+01	1.43E+02	2.65E-02
1/5	1-Jul	4.59E+00	1.01E-01	1.19E+01	1.18E+02	3.24E-02
1/6	5-Jul	6.79E+00	1.24E-01	1.34E+01	1.08E+02	3.60E-02
1/7	8-Jul	8.75E+00	1.29E-01	1.61E+01	1.17E+02	3.22E-02
αρ. Δειγμ.	Ημ/νια	U/g ξ.β. Ιτιάς	U/g inoculum	U/g protein	days	stdev
1/1	13-Jun	1.07E+00	9.40E+01	2.24E+01	4	2.253
1/2	17-Jun	2.40E+00	3.07E+02	4.42E+01	8	4.897
1/3	23-Jun	1.35E+00	2.76E+02	2.62E+01	12	0.381
1/4	28-Jun	5.34E+00	7.62E+02	6.84E+01	16	0.588
1/5	1-Jul	2.30E+00	2.72E+02	2.28E+01	20	1.763
1/6	5-Jul	3.39E+00	3.66E+02	2.73E+01	24	0.979
1/7	8-Jul	4.38E+00	5.12E+02	3.19E+01	28	1.959



Διάγραμμα 4: Διαγραμματική απεικόνιση της ενεργότητας του ενζύμου λακκάση ανά μονάδα μάζας ξηρού υποστρώματος και εμβολίου στη διάρκεια των 28 ημερών.



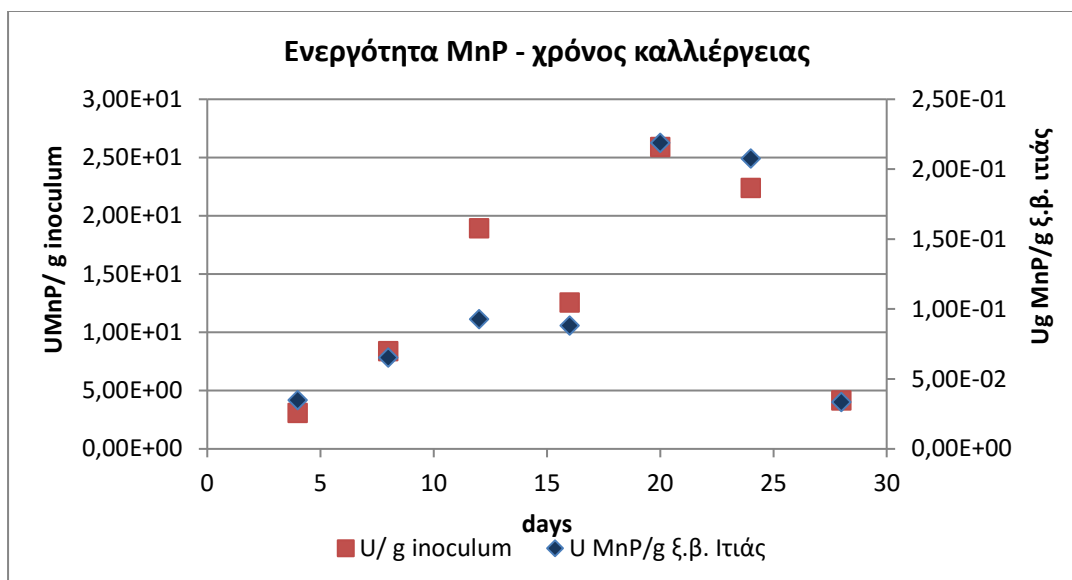
Διάγραμμα 5: Διαγραμματική απεικόνιση της ενεργότητας του ενζύμου λακκάση ανά μονάδα μάζας εμβολίου και ειδικής ενεργότητας του ενζύμου αυτού στη διάρκεια των 28 ημερών.

Βάσει του παραπάνω διαγράμματος (**διάγραμμα 4**), διαπιστώνουμε ότι η μέγιστη ενεργότητα της λακκάσης είναι στις 16 ημέρες, δηλαδή στην αρχή της εκθετικής φάσης του μύκητα έχουμε το μεγαλύτερο ποσοστό λιγνολυτικής δράσης του ενζύμου. Στη συνέχεια, ενώ πέφτει η ενεργότητα του ενζύμου την 20^η ημέρα, δεν μειώνεται περισσότερο από την τιμή ενεργότητας που παρουσίαζε μέχρι την ημέρα 12. Επιπλέον, μέχρι και την 28^η ημέρα η τιμή της ενεργότητας της λακκάσης συνεχώς αυξάνεται χωρίς όμως να ξεπεράσει τη μέγιστη

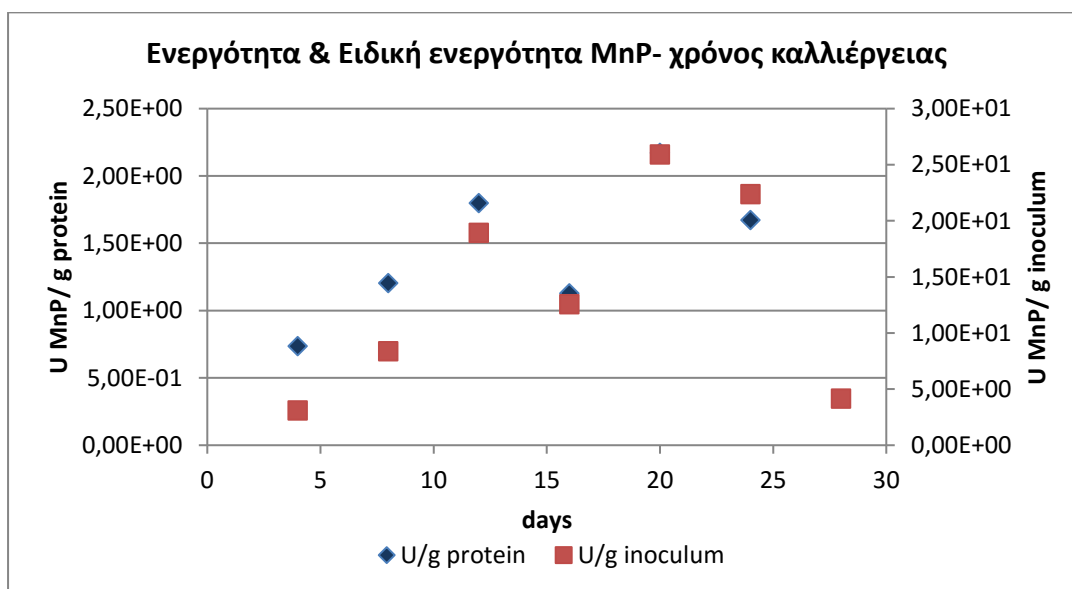
τιμή που παρουσίασε στις 16 ημέρες. Τέλος, παρατηρούμε ότι ενώ φαίνεται τα σημεία στις δύο καμπύλες ενεργότητας να ακολουθούν την ίδια εξίσωση, η ενεργότητα της λακκάσης ανά μονάδα μάζας εμβολίου κυμαίνεται σε υψηλότερο εύρος τιμών (100-800 U/g. inoculum) σε σχέση με την ενεργότητα ανά μονάδα μάζας ξηρού υποστρώματος (10-80U/g. ξ.β. ιτιάς), λόγω της υποδεκαπλάσιας μάζας των κυττάρων του εμβολίου σε σχέση με τη μάζα του υποστρώματος. Το **διάγραμμα 5** μας δίνει πληροφορίες και για την ενεργότητα του ενζύμου αυτού ως προς τις ολικές πρωτεΐνες του μύκητα, η οποία επίσης παρουσιάζει μέγιστη τιμή την 16^η ημέρα.

Πίνακα 13: Συνοπτική παρουσίαση αποτελεσμάτων ενεργότητας του ενζύμου υπεροξειδάση εξαρτημένη του μαγγανίου.

ΣΥΝΟΠΤΙΚΟΣ ΠΙΝΑΚΑΣ						
MnP						
ΗΜ/ΝΙΑ	ΔΕΙΓΜΑ	U στα 40mlE	g protein/g ξ.β. Ιτιάς	g protein/g inoculum	g ξ.β ιτιάς/g inoculum	g inoculum
6-Jul	1/1	6.99E-02	4.75E-02	4.19E+00	8.83E+01	3.27E-02
6-Jul	1/2	1.31E-01	5.42E-02	6.95E+00	1.28E+02	2.91E-02
6-Jul	1/3	1.85E-01	5.15E-02	1.05E+01	2.04E+02	1.94E-02
6-Jul	1/4	1.76E-01	7.82E-02	1.11E+01	1.43E+02	2.65E-02
6-Jul	1/5	4.38E-01	1.01E-01	1.19E+01	1.18E+02	3.24E-02
6-Jul	1/6	4.15E-01	1.24E-01	1.34E+01	1.08E+02	3.60E-02
8-Jul	1/7	6.69E-02	1.29E-01	1.61E+01	1.24E+02	3.22E-02
ΗΜ/ΝΙΑ	ΔΕΙΓΜΑ	U/g ξ.β. Ιτιάς	U/g inoculum	U/g protein	Days	stdev U/l
6-Jul	1/1	3.50E-02	3.09E+00	7.36E-01	4	1.07E-01
6-Jul	1/2	6.53E-02	8.38E+00	1.21E+00	8	1.07E-01
6-Jul	1/3	9.27E-02	1.89E+01	1.80E+00	12	1.07E-01
6-Jul	1/4	8.81E-02	1.26E+01	1.13E+00	16	2.15E-01
6-Jul	1/5	2.19E-01	2.59E+01	2.17E+00	20	0.00E+00
6-Jul	1/6	2.08E-01	2.24E+01	1.67E+00	24	3.16E-01
8-Jul	1/7	3.34E-02	4.15E+00	2.59E-01	28	0.00E+00



Διάγραμμα 6: Διαγραμματική απεικόνιση ενεργότητας του ενζύμου υπεροξειδάση εξαρτημένη του μαγγανίου ανά μονάδα μάζας εμβολίου και ξηρού υποστρώματος στη διάρκεια των 28 ημερών.

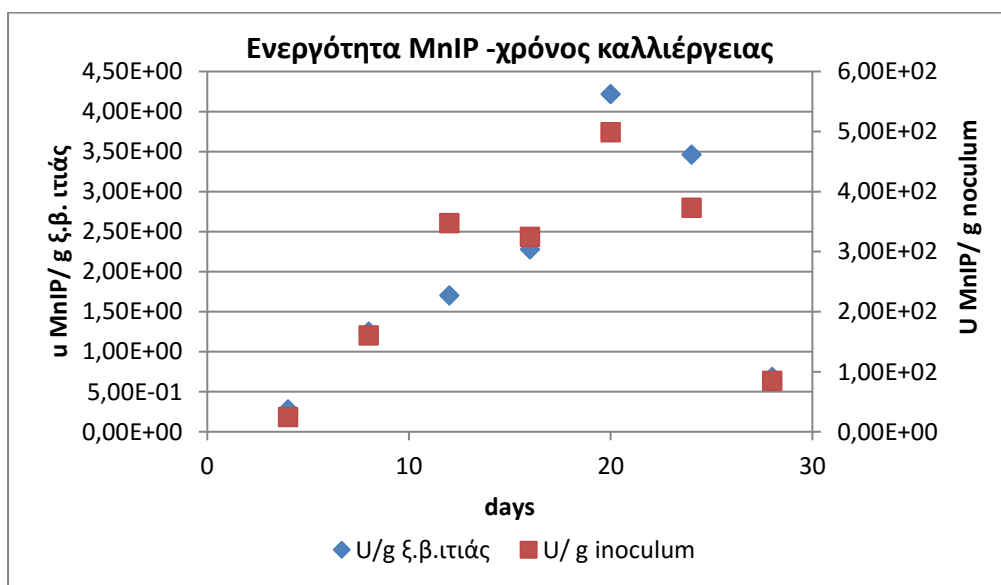


Διάγραμμα 7: Διαγραμματική απεικόνιση ενεργότητας του ενζύμου υπεροξειδάση εξαρτημένη του μαγγανίου ανά μονάδα μάζας εμβολίου και ειδικής ενεργότητας του ενζύμου αυτού στη διάρκεια των 28 ημερών.

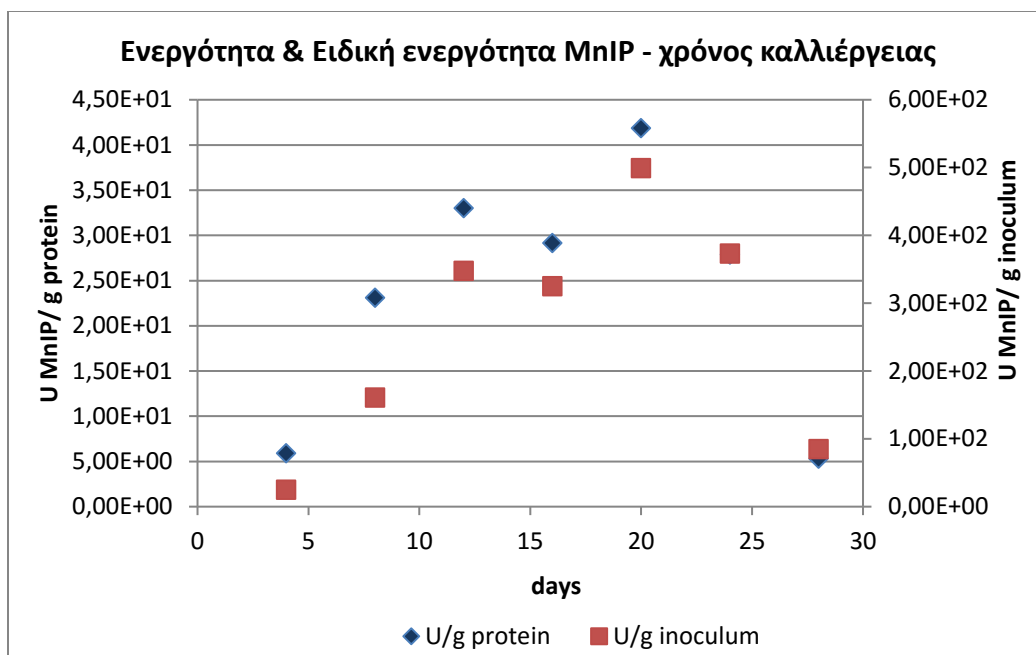
Από το **διάγραμμα 6**, διαπιστώνουμε μια αυξητική τάση στις τιμές ενεργότητας της υπεροξειδάσης η οποία κορυφώνεται την 20^η ημέρα ανάπτυξης της καλλιέργειας, δηλαδή τέσσερις μέρες μετά την εμφάνιση μέγιστης ενεργότητας της λακκάσης και όταν ο μύκητας βρίσκεται στην εκθετική φάση ανάπτυξής του. Ωστόσο, η μέγιστη τιμή ενεργότητας της υπεροξειδάσης είναι μικρότερη από την αντίστοιχη μέγιστη τιμή ενεργότητας της λακκάσης, όπως και οι υπόλοιπες τιμές ενεργότητας του ενζύμου αυτής καθώς η διαφορά του εύρους τιμών είναι μιας τάξης μεγέθους. Παρατηρώντας το **διάγραμμα 7** σε συνδυασμό με το **διάγραμμα 5**, καταλήγουμε ότι η ενεργότητα της λακκάσης είναι μεγαλύτερη ως προς τις ολικές πρωτεΐνες σε σχέση με την ενεργότητα της υπεροξειδάσης αυτής.

Πίνακα 14: Συνοπτική παρουσίαση αποτελεσμάτων ενεργότητας του ενζύμου υπεροξειδάση ανεξάρτητη του μαγγανίου.

ΣΥΝΟΠΤΙΚΟΣ ΠΙΝΑΚΑΣ						
MnIP						
ΗΜ/ΝΙΑ	ΔΕΙΓΜΑ	U στα 40mlE	g protein/g ξ.β. Ιτιάς	g protein/g inoculum	g ξ.β ιτιάς/g inoculum	g inoculum
6-Jul	1/1	5.62E-01	0.048	4.193	8.83E+01	3.27E-02
6-Jul	1/2	2.51E+00	0.054	6.951	1.28E+02	2.91E-02
6-Jul	1/3	3.40E+00	0.052	10.526	2.04E+02	1.94E-02
6-Jul	1/4	4.56E+00	0.078	11.141	1.43E+02	2.65E-02
6-Jul	1/5	8.43E+00	0.101	11.922	1.18E+02	3.24E-02
6-Jul	1/6	6.92E+00	0.124	13.375	1.08E+02	3.60E-02
8-Jul	1/7	1.37E+00	0.129	16.053	1.24E+02	3.22E-02
MnIP						
ΗΜ/ΝΙΑ	ΔΕΙΓΜΑ	U/g ξ.β. Ιτιάς	U/g inoculum	U/g protein	days	stdev U/l
6-Jul	1/1	2.81E-01	2.48E+01	5.92E+00	4	2.149E-02
6-Jul	1/2	1.25E+00	1.61E+02	2.31E+01	8	1.075E-01
6-Jul	1/3	1.70E+00	3.48E+02	3.30E+01	12	6.448E-02
6-Jul	1/4	2.28E+00	3.25E+02	2.92E+01	16	2.149E-01
6-Jul	1/5	4.22E+00	4.99E+02	4.19E+01	20	2.794E-01
6-Jul	1/6	3.46E+00	3.73E+02	2.79E+01	24	5.481E-01
8-Jul	1/7	6.84E-01	8.50E+01	5.29E+00	28	2.149E-02



Διάγραμμα 8: Διαγραμματική απεικόνιση ενεργότητας του ενζύμου υπεροξειδάση ανεξάρτητη του μαγγανίου ανά μονάδα μάζας εμβολίου και ξηρού υποστρώματος στη διάρκεια των 28 ημερών.



Διάγραμμα 9: Διαγραμματική απεικόνιση ενεργότητας του ενζύμου υπεροξειδάση ανεξάρτητη του μαγγανίου ανά μονάδα μάζας εμβολίου και ειδικής ενεργότητας του ενζύμου αυτού στη διάρκεια των 28 ημερών.

Από το παραπάνω διάγραμμα (**διάγραμμα 8**), παρατηρούμε ότι η δράση και αυτής της υπεροξειδάσης μεγιστοποιείται την 20^η ημέρα ανάπτυξης της καλλιέργειας, ωστόσο οι τιμές ενεργότητας που παρουσιάζει είναι μεγαλύτερης τάξης μεγέθους από τις αντίστοιχες του ενζύμου υπεροξειδάση που είναι εξαρτημένη του μαγγανίου. Ακόμα, ερμηνεύοντας συνδυαστικά τα **διαγράμματα 5,7,9** καταλήγουμε ότι ως προς τις ολικές πρωτεΐνες πρώτη σε ενεργότητα έρχεται η λακκάση, ακολουθούν οι υπεροξειδάσες που είναι ανεξάρτητες του μαγγανίου με μικρή διαφορά και τέλος οι υπεροξειδάσες που είναι εξαρτημένες του μαγγανίου. Συγκρίνοντας τα **διαγράμματα 7,9**, παρατηρούμε ότι και οι δύο κατηγορίες υπεροξειδάσης έχουν αυξητική τάση μέχρι να φτάσουν την ημέρα 12, στη συνέχεια στη μεταβατική φάση ανάπτυξης παρουσιάζουν μια πτώση και στην εκθετική πλέον φάση εμφανίζουν τη μέγιστη τιμή ενεργότητάς τους. Τέλος, και στα δύο διαγράμματα την 28^η ημέρα οι ενεργότητες μειώνονται σημαντικά, ενώ η ενεργότητα της λακκάσης, όπως μπορούμε να επιβεβαιώσουμε στο **διάγραμμα 5**, εξακολουθεί να έχει υψηλή τιμή.

1.2. Ένζυμα αποδόμησης κυτταρίνης και στην ημικυτταρίνης.

Από τα ένζυμα που μελετήθηκαν στην συγκεκριμένη πειραματική διαδικασία η β-γλυκοζιδάση και οι κυτταρινάσες είναι αυτά που επιτίθενται στη κυτταρίνη ενώ η β-ξυλοζιδάση στην ημικυτταρίνη. Στα διαγράμματα που ακολουθούν παρουσιάζεται η ενεργότητα των ενζύμων αυτών στο διάστημα των 28 ημερών, ενώ τα συγκεντρωτικά αποτελέσματα για το κάθε ένζυμο βρίσκονται στους **πίνακες 15** έως **17**. Στο **ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ 2 (πίνακες 28α-29, ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ 2)** εμφανίζονται αναλυτικά οι πρωτογενείς μετρήσεις καθώς και η επεξεργασία αυτών.

Πίνακα 15: Συνοπτική παρουσίαση αποτελεσμάτων ενεργότητας του ενζύμου β-γλυκοζιδάση.

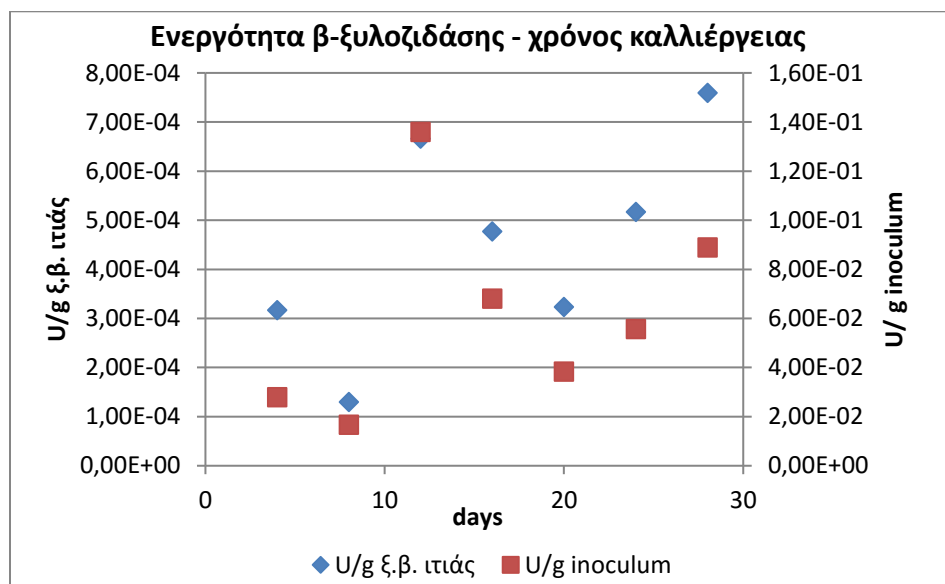
ΣΥΝΟΠΤΙΚΟΣ ΠΙΝΑΚΑΣ						
b-glucosidase						
HM/NIA	αρ. Δείγμ.	U στα 40ml E	U/g ξ.β. ιτιάς	g ξ.β ιτιάς/g inoculum	g inoculum	U/g inoculum
16-Jun	1/1	7.98E-07	3.99E-07	8.83E+01	3.27E-02	3.52E-05
22-Jun	1/2	1.76E-07	8.81E-08	1.28E+02	2.91E-02	1.13E-05
22-Jun	1/3	3.71E-08	1.86E-08	2.04E+02	1.94E-02	3.79E-06
28-Jun	<u>1/4</u>	1.39E-06	6.96E-07	1.43E+02	2.65E-02	9.92E-05
1-Jul	<u>1/5</u>	3.80E-06	1.90E-06	1.18E+02	3.24E-02	2.25E-04
5-Jul	1/6	1.11E-06	5.57E-07	1.08E+02	3.60E-02	6.00E-05
8-Jul	1/7	1.76E-06	8.81E-07	1.17E+02	3.22E-02	1.03E-04
HM/NIA	αρ. Δείγμ.	g protein/g inoculum	U/g protein	days	stdev	
16-Jun	1/1	4.19E+00	8.39E-06	4	2.62E-07	
22-Jun	1/2	6.95E+00	1.62E-06	8	1.31E-08	
22-Jun	1/3	1.05E+01	3.60E-07	12	2.62E-08	
28-Jun	<u>1/4</u>	1.11E+01	8.90E-06	16	3.94E-07	
1-Jul	<u>1/5</u>	1.19E+01	1.89E-05	20	1.18E-06	
5-Jul	1/6	1.34E+01	4.48E-06	24	7.87E-07	
8-Jul	1/7	1.61E+01	6.42E-06	28	3.94E-07	

Η β-γλυκοζιδάση είναι ένζυμο που συμμετέχει στην δευτερογενή υδρόλυση της κυτταρίνης, εφόσον η κυτταρίνη έχει πρώτα υδρολυθεί από εξωκυτταρινάσες πρωτογενώς προς κελλοβιόζη. Από τα αποτελέσματα ενεργότητας που καταγράφονται τον παραπάνω πίνακα (**πίνακας 15**) διαπιστώνουμε ότι η ενεργότητα της β-γλυκοζιδάσης είναι μηδενική. Το αποτέλεσμα αυτό φαίνεται λογικό καθώς οι λευκές σήψης μύκητες επιδίδονται περισσότερο στην απολιγνίνωση ενώ δεν περιέχουν υψηλές ενεργότητες σε ένζυμα που υδρολύουν την κυτταρίνη.

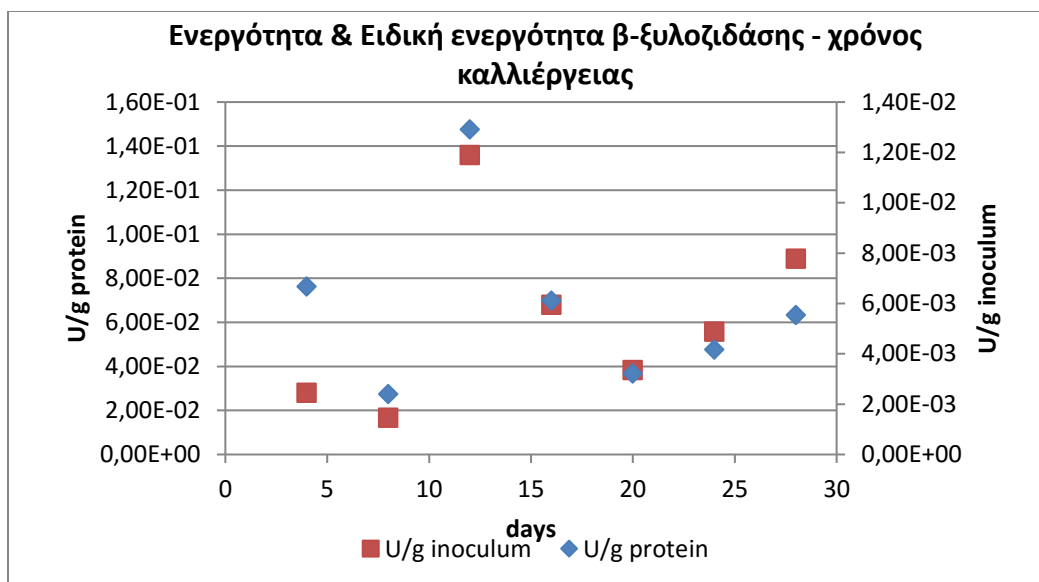
Πίνακα 16: Συνοπτική παρουσίαση αποτελεσμάτων ενεργότητας του ενζύμου β-xylosidase.

ΣΥΝΟΠΤΙΚΟΣ ΠΙΝΑΚΑΣ					
b-xylosidase					
HM/NIA	αρ. Δείγματος	U στα 40ml E	U/g ξ.β. ιτιάς	g ξ.β ιτιάς/g inoculum	g inoculum
16-Jun	1/1	6.35E-04	3.17E-04	8.83E+01	3.27E-02
22-Jun	1/2	2.60E-04	1.30E-04	1.28E+02	2.91E-02
22-Jun	1/3	1.33E-03	6.66E-04	2.04E+02	
28-Jun	<u>1/4</u>	9.55E-04	4.77E-04	1.43E+02	1.94E-02
1-Jul	<u>1/5</u>	6.47E-04	3.24E-04	1.18E+02	2.65E-02

5-Jul	1/6	1.03E-03	5.17E-04	1.08E+02	3.24E-02	
8-Jul	1/7	1.52E-03	7.60E-04	1.17E+02	3.22E-02	
HM/NIA	αρ. Δείγματος	g protein/g inoculum	U/g protein	U/g inoculum	days	stdev
16-Jun	1/1	4.19E+00	6.68E-03	2.80E-02	4	4.85E-05
22-Jun	½	6.95E+00	2.40E-03	1.67E-02	8	5.05E-05
22-Jun	1/3	1.05E+01	1.29E-02	1.36E-01	12	9.30E-05
28-Jun	¼	1.11E+01	6.11E-03	6.80E-02	16	2.02E-05
1-Jul	1/5	1.19E+01	3.21E-03	3.83E-02	20	7.88E-05
5-Jul	1/6	1.34E+01	4.17E-03	5.57E-02	24	2.43E-05
8-Jul	1/7	1.61E+01	5.54E-03	8.89E-02	28	3.03E-05



Διάγραμμα 10: Διαγραμματική απεικόνιση ενεργότητας του ενζύμου β-ξυλοζιδάση ανά μονάδα μάζας εμβολίου και ξηρού υποστρώματος στη διάρκεια των 28 ημερών.



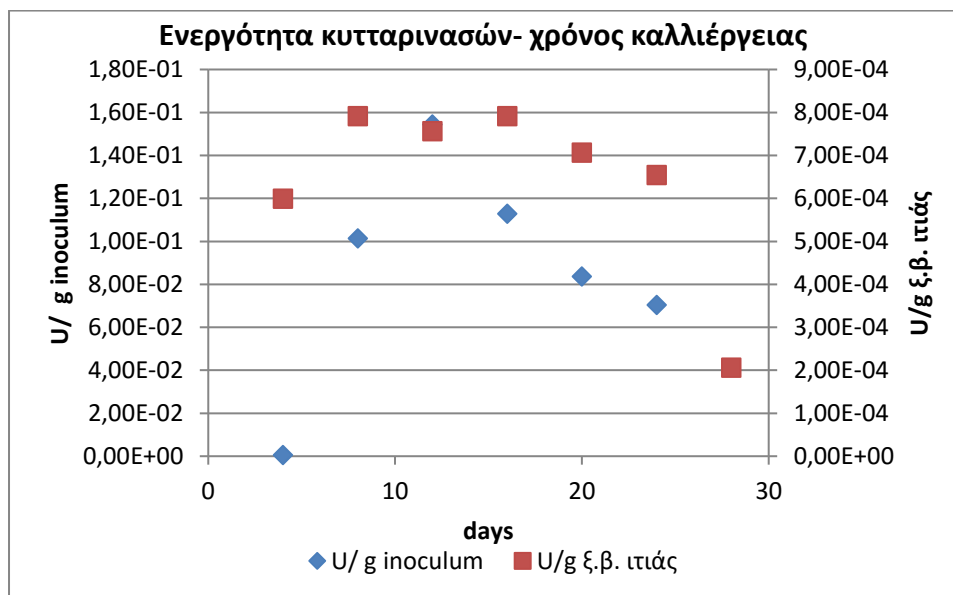
Διάγραμμα 11: Διαγραμματική απεικόνιση ενεργότητας του ενζύμου β-ξυλοζιδάση ανά μονάδα μάζας εμβολίου και ειδικής ενεργότητας του ενζύμου αυτού στη διάρκεια των 28 ημερών.

Η β-ξυλοζιδάση είναι ένα ένζυμο που καταλύει την υδρόλυση της ημικυτταρίνης. Από τα αποτελέσματα που παρουσιάζονται στο παραπάνω διάγραμμα (**διάγραμμα 10**) φαίνεται η ενεργότητα αυτή να είναι πολύ μικρή ως προς τη μονάδα μάζα εμβολίου ενώ μπορεί να θεωρηθεί και μηδενική ανά μονάδα μάζας ξηρού υποστρώματος. Επιπλέον, μέγιστη ενεργότητα ανά μονάδα μάζας εμβολίου παρουσιάζει στις 12 ημέρες, πριν από το χρόνο μέγιστης ενεργότητας όλων των λιγνινολυτικών ενζύμων. Το γεγονός αυτό δηλώνει ότι ο μύκητας αποδομεί την ημικυτταρίνη πριν την στιγμή που πραγματοποιείται η μεγαλύτερη απολιγνίνωση. Στο σημείο αυτό επιβεβαιώνεται ότι η πλήρης απολιγνίνωση δεν φαίνεται να είναι απαραίτητη για να επιτευχθεί η υδρόλυση ημικυτταρίνης και στη συνέχεια της κυτταρίνης. Τέλος, από το **διάγραμμα 11** παρατηρούμε ότι η ενεργότητα της β-ξυλοζιδάσης ανά μονάδα μάζας ολικών πρωτεϊνών έρχεται τελευταία μετά τα λιγνολυτικά ένζυμα.

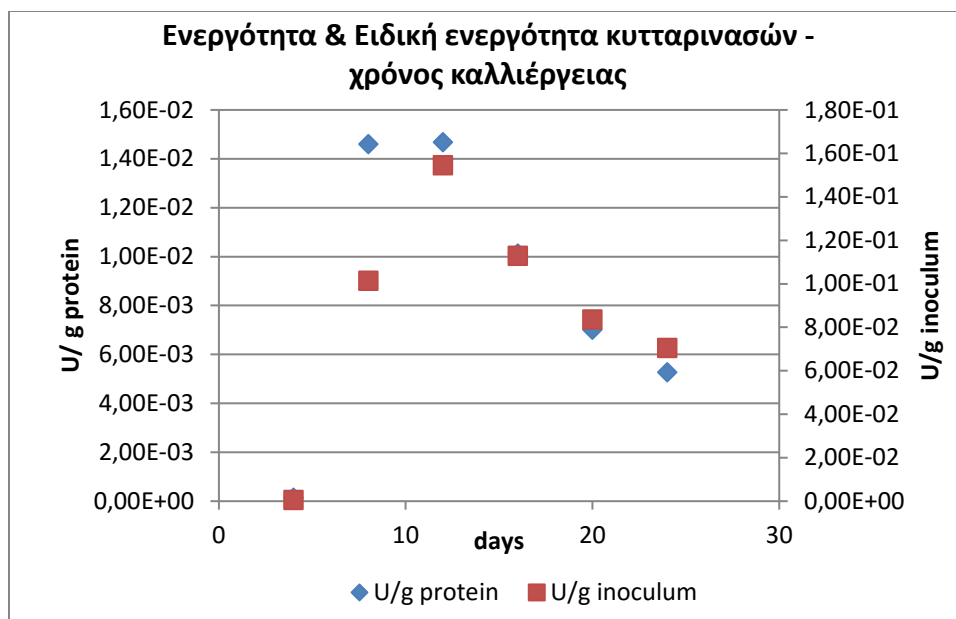
Πίνακα 17: Συνοπτική παρουσίαση αποτελεσμάτων ενεργότητας των κυτταρινασών.

ΣΥΝΟΠΤΙΚΟΣ ΠΙΝΑΚΑΣ						
FPU						
ΗΜ/ΝΙΑ	αρ. Δείγματος	U στα 40ml E	U/g ξ.β. ιτιάς	g ξ.β ιτιάς/g inoculum	g inoculum	U/g inoculum
16-Ιουν	1/1	1.20E-03	5.99E-04	8.83E+01	3.27E-02	0.00E+00
22-Jun	1/2	1.58E-03	7.92E-04	1.28E+02	2.91E-02	1.01E-01
22-Jun	1/3	1.51E-03	7.57E-04	2.04E+02	1.94E-02	1.55E-01
28-Jun	1/4	1.58E-03	7.92E-04	1.43E+02	2.65E-02	1.13E-01
1-Jul	1/5	1.41E-03	7.07E-04	1.18E+02	3.24E-02	8.36E-02
6-Jul	1/6	1.31E-03	6.54E-04	1.08E+02	3.60E-02	7.05E-02
8-Jul	1/7	4.12E-04	2.06E-04	1.17E+02	3.22E-02	0.00E+00

HM/NIA	αρ. Δείγματος	g protein/g inoculum	U/g protein	days	stdev
16-IouV	1/1	4.19E+00	0.00E+00	4	1.801E-01
22-Jun	1/2	6.95E+00	1.46E-02	8	3.178E-02
22-Jun	1/3	1.05E+01	1.47E-02	12	2.013E-01
28-Jun	1/4	1.11E+01	1.01E-02	16	5.297E-02
1-Jul	1/5	1.19E+01	7.01E-03	20	9.534E-02
6-Jul	1/6	1.34E+01	5.27E-03	24	5.297E-02
8-Jul	1/7	1.61E+01	1.28E-05	28	3.708E-02



Διάγραμμα 12: Διαγραμματική απεικόνιση ενεργότητας των κυτταρινασών ανά μονάδα μάζας εμβολίου και ξηρού υποστρώματος στη διάρκεια των 28 ημερών.



Διάγραμμα 13: Διαγραμματική απεικόνιση ενεργότητας των κυτταρινασών ανά μονάδα μάζας εμβολίου και ειδικής ενεργότητας αυτών στη διάρκεια των 28 ημερών.

Σε ότι αφορά στο **διάγραμμα 12**, φαίνεται οι κυτταρινάσες να έχουν πολύ μικρή ενεργότητα, γεγονός αναμενόμενο εφόσον οι λευκής σήψης μύκητες θεωρούνται απολιγνινωτές, ενώ επιπλέον επιβεβαιώνεται και το αποτέλεσμα που προέκυψε από τις μετρήσεις ενεργότητας της β-γλυκοζιδάσης, το οποίο επικύρωσε τη μηδενική της δράση. Τέλος, από το **διάγραμμα 13** διαπιστώνουμε ότι η ενεργότητα των κυτταρινασών ανά μονάδα μάζας ολικών πρωτεϊνών είναι μικρότερη ακόμα και από την αντίστοιχη ενεργότητα της ημικυτταρινάσης β-ξυλοζιδάση.

Συζήτηση αποτελεσμάτων- μελλοντικές προοπτικές

Η παρούσα μελέτη κατάφερε να προσδιορίσει επιτυχώς την ποιοτικά και ποσοτικά τη δράση των ενζύμων του μύκητα *Ganoderma resinaceum* κατά τη διαδικασία βιολογικής προεπεξεργασίας ξυλώδους βιομάζας ιτιάς, καθώς και να παρακολουθήσει τη δράση των ενζύμων αυτών σε συνάρτηση με την κυτταρική ανάπτυξη του μύκητα. Συνοπτικά, από τα αποτελέσματα που προέκυψαν και παρουσιάστηκαν παραπάνω καταλήγουμε στα εξής:

- Η ανάπτυξη του *G.resinaseum* στην καλλιέργεια ακολουθεί την πρότυπη καμπύλη ανάπτυξης μυκήτων και στη διάρκεια των 28 ημερών καλλιέργειας. Αρχικά, ο μύκητας βρίσκεται στην λανθάνουσα φάση τις πρώτες 12 ημέρες, ενώ περνάει μια μεταβατική φάση μεταξύ των 12 με 16 ημερών ανάπτυξης όπου και ολοκληρώνει την ανάπτυξη των απαραίτητων ενζυμικών κύκλων του. Στη συνέχεια, μπαίνει στην εκθετική φάση όπου αναπτύσσει τη βιομάζα του με εκθετικούς ρυθμούς έως την 24 ημέρα της καλλιέργειας. Τέλος, την 28^η ημέρα σταματάει η εκθετική ανάπτυξη του μύκητα, καθώς αυτός περνάει σε μια φάση στασιμότητας, την οποία είτε θα ακολουθήσει η φάση επιβράδυνσης και μετά θανάτου, είτε ο μύκητας θα βρει μια νέα πηγή άνθρακα και θα μπει σε νέο κύκλο ανάπτυξης
- Από τα λιγνολυτικά ένζυμα που μελετήθηκαν η λακκάση ήταν αυτή που παρουσίασε τη μεγαλύτερη δράση, ακολούθησαν με μικρή διαφορά (ίδιας τάξη μεγέθους) οι υπεροξειδάσες που είναι ανεξάρτητες του μαγγανίου και τη μικρότερη δράση έχουν οι υπεροξειδάσες που είναι εξαρτημένες του μαγγανίου.
- Η λακκάση εμφανίζει τη μεγαλύτερη μέγιστη τιμή ενεργότητας ανά μονάδα μάζας ξηρού υποστρώματος και ανά μονάδα μάζας εμβολίου σε σχέση με τις υπεροξειδάσες όταν ο μύκητας εισέρχεται στην εκθετική φάση ανάπτυξής του, ενώ μετά από μια πτώση στην τιμή ενεργότητας στην 20^η ημέρα οι τιμές ενεργότητας που ακολουθούν έχουν αυξητική τάση. Αντιθέτως οι υπεροξειδάσες εμφανίζουν τη μέγιστη ενεργότητά τους στην εκθετική φάση, ενώ μετά από αυτή την τιμή η ενεργότητά τους έχουν πτωτική τάση. Το αποτέλεσμα αυτό σημειώνει τη δράση της λακκάσης ως κύριο ένζυμο απολιγνίνωσης στην εκθετική φάση αλλά και στη φάση στασιμότητας του μύκητα.
- Η λακκάση επίσης παρουσίασε απ' όλα τα ένζυμα που εξετάστηκαν την μέγιστη ειδική ενεργότητα (ενεργότητα ανά μονάδα μάζας ολικών πρωτεϊνών που εκχυλίστηκαν). Ωστόσο, οι υπεροξειδάσες που είναι ανεξάρτητες του μαγγανίου έχουν πολύ μικρή διαφορά στην αντίστοιχη ενεργότητα με τις λακκάσες, ενώ οι υπεροξειδάσες που είναι εξαρτημένες του μαγγανίου έχουν μικρότερη ειδική ενεργότητα σχεδόν κατά μία τάξη μεγέθους.
- Ο *Ganoderma resinaseum* δεν έχει υψηλή ενεργότητα σε ημικυτταρινάσες και κυτταρινάσες, γεγονός που υποδεικνύει ότι κατά τη διάρκεια της βιολογικής προεπεξεργασίας συμβαίνει απολιγνίνωση, αλλά όχι αποπολυμερισμός ημικυτταρίνης και κυτταρίνης. Το αποτέλεσμα αυτό είναι συμβατό με τη συμπεριφορά των περισσότερων λευκής σήψης μυκήτων. Μάλιστα, θα μπορούσαμε να θεωρήσουμε ότι η ενεργότητα της ημικυτταρινάσης β-ξυλοζιδάση δεν είναι μηδενική ανά μονάδα μάζας εμβολίου και ότι την 12^η ημέρα, λίγο πριν την εκθετική φάση ανάπτυξης του μύκητα παίρνει τη μέγιστη τιμή της, ενώ τη συγκεκριμένη χρονική στιγμή οι αντίστοιχες ενεργότητες των λιγνολυτικών ενζύμων δεν έχουν φτάσει τη μέγιστη τιμή τους. Το αποτέλεσμα αυτό επισημαίνει ότι το ένζυμο β-ξυλοζιδάση έχει καταφέρει να περάσει το φράγμα της λιγνίνης και να διασπάσει έστω σε μικρό βαθμό αλυσίδες ημικυτταρίνης, πριν από τη στιγμή που πραγματοποιείται η μέγιστη απολιγνίνωση.

Η λιγνολυτική δράση του μύκητα *Ganoderma resinaceum*, θα μπορούσε να δοκιμαστεί και σε μη ξυλώδη υποστρώματα βιομάζας, όπως σε οικιακά ζυμώσιμα απόβλητα. Η έρευνα για την επιλογή κατάλληλου υποστρώματος θα μπορούσε να επικεντρωθεί και σε οικιακά ζυμώσιμα απόβλητα, λόγω των ισχυρών πλεονεκτημάτων τους για τους οργανισμούς οι οποίοι μπορούν εύκολα να τα αποικοδομήσουν. Τα απόβλητα αυτά συγκαταλέγονται στις πιο πλούσιες πηγές ενέργειας στον πλανήτη, ωστόσο δεν χρησιμοποιούνται εκτενώς βιομηχανικά σε διεργασίες στερεής κατάστασης ζύμωσης προς παραγωγή προϊόντων υψηλής προστιθέμενης αξίας. Τα απόβλητα υπό τη μορφή φλούδας φρούτων και λαχανικών αποτελούν περισσότερο από το 50% των στερεών αποβλήτων που προέρχονται από οικιακά ζυμώσιμα υπολείμματα. Ακόμα, τα οικιακά ζυμώσιμα απόβλητα διαθέτουν υψηλό ποσοστό οργανικού φορτίου και υψηλά επίπεδα υγρασίας, χαρακτηριστικά που προσδίδουν δυσκολία στην διαχείριση τους. Ωστόσο, συνιστούν άφθονη πηγή θρεπτικών συστατικών, χαρακτηριστικό που τα καθιστά ιδανική πρώτη ύλη για την παραγωγή προϊόντων υψηλής προστιθέμενης αξίας, όπως γαλακτικό οξύ, βιομεθάνιο, υδρογόνο κ.α. (Janveja et al, 2013).

Η καλλιέργεια μυκήτων σε υπόστρωμα οικιακών ζυμώσιμων αποβλήτων με σκοπό την παραγωγή ενζύμων και βιοκαυσίμων αποτελεί μια τεχνολογία πολλά υποσχόμενη ως προς τη μείωση των ρύπων και το κόστος χρήσης υδρολυτικών ενζύμων για την αποικοδόμηση της βιομάζας (Janveja et al, 2013). Αποτελέσματα έρευνας που χρησιμοποίησε αγρωστώδη και οικιακά ζυμώσιμα απόβλητα ως υπόστρωμα για την παραγωγή ενζύμων αποδόμησης βιομάζας (κυτταρινασών) από τον μύκητα *A.niger CJ-5* σε διεργασία στερεής κατάστασης ζύμωσης, ήταν ενθαρρυντικά ως προς την ενεργότητα των παραγόμενων ενζύμων και την παραγωγή ζυμώσιμων σακχάρων (πίνακας 4). Επιπλέον, ενθαρρυντικά για τη χρήση αυτής της κατηγορίας υποστρωμάτων υπήρξαν τα αποτελέσματα από συγκριτική μελέτη υποστρωμάτων για την καλλιέργεια σε αυτά του μύκητα *A. Niger NS-2*, σε στερεής κατάστασης ζύμωση, είτε σε συνδυασμό είτε όχι με χημική προεπεξεργασία (πίνακας 5). Τέλος, η περαιτέρω έρευνα για τη βελτιστοποίηση και τη δυνατότητα βιομηχανικής εφαρμογής αυτής της τεχνολογίας κρίνεται αναγκαία προκειμένου να καταλήξουμε σε μια οικονομικά ωφέλιμη διαδικασία παραγωγής κυτταρινασών με απώτερο σκοπό την παραγωγή δεύτερης γενιάς βιοκαυσίμων [Bansal et al., 2012].

Πίνακας 4: Η απόδοση σε περιεχόμενο και μετατροπή υδατανθράκων μετά από την ενζυμική υδρόλυση διαφόρων οικιακών ζυμώσιμων αποβλήτων από ένζυμα που προέρχονται από τον *A.niger CJ-5* (Van and Pletscke, 2012).

Substrates	Carbohydrate content (%)	Carbohydrate conversion efficiency (%)	Alcohol yield (μL/g)
Banana stalks	39.2±1.17	98.2	80±1.609
Mausami peels	48.6±0.478	97.7	94±2.35
Onion peels	45.1±1.10	98.6	100±2.89
Orange peels	57.3±1.14	99.4	136±2.72
Pea pods	37.9±1.59	97.6	80±2.46
Pineapple peels	44.1±2.25	98.6	122±4.88
Potato peels	62.8±1.24	97.0	262±7.86
Composite mixture	50.3±2.51	97.4	153±5.45

Πίνακας 5: Ενεργότητα κυτταρινασών του *A. Niger* NS-2 σε διάφορα αγρωστώδη και οικιακά ζυμώσιμα υποστρώματα [Bansal et al., 2012].

Substrates (untreated)	CMCase (U/gds)	FPase (U/gds)	β -glucosidase (U/gds)
Corn cobs	10.0 \pm 0.4	3.1 \pm 0.06	1.8 \pm 0.072
Carrot peelings	4.9 \pm 0.003	0.3 \pm 0.001	5.0 \pm 0.048
Composite kitchen waste	48.6 \pm 1.4	10.3 \pm 0.1	19.5 \pm 0.39
Grass	17.6 \pm 0.01	5.1 \pm 0.5	10 \pm 0.14
Leaves	12.1 \pm 0.36	8.0 \pm 0.1	6.8 \pm 0.064
Orange peelings	1.0 \pm 0.003	1.9 \pm 0.001	3.0 \pm 0.018
Pineapple peelings	2.6 \pm 0.02	1.0 \pm 0.01	2.8 \pm 0.013
Potato peelings	31.3 \pm 0.3	5.9 \pm 0.17	18.3 \pm 0.43
Rice husk	14.1 \pm 0.4	3.1 \pm 0.006	10.6 \pm 0.31
Sugarcane baggase	5.0 \pm 0.1	1.5 \pm 0.005	3.0 \pm 0.03
Saw dust	1.8 \pm 0.2	2.0 \pm 0.021	1.0 \pm 0.005
Wheat bran	310.6 \pm 3.0	16.8 \pm 0.15	33.0 \pm 1.2
Wheat straw	11.2 \pm 0.01	2.8 \pm 0.01	5.5 \pm 0.06

Substrates (H ₂ SO ₄ treated)	CMCase (U/gds)	FPase (U/gds)	β -glucosidase (U/gds)
Corn cobs	89.3 \pm 1.4	20.2 \pm 0.31	6.3 \pm 0.11
Carrot peelings	100.0 \pm 3.2	13.0 \pm 0.1	11.0 \pm 0.19
Composite kitchen waste	111 \pm 4.3	11.0 \pm 0.5	15.0 \pm 0.43
Grass	60.1 \pm 1.2	11.0 \pm 0.43	6.9 \pm 0.24
Leaves	80.0 \pm 1	12.9 \pm 0.03	4.2 \pm 0.51
Orange peelings	68.6 \pm 1.9	15.0 \pm 0.38	1.8 \pm 0.001
Pineapple peelings	70.0 \pm 2.1	12.0 \pm 0.13	1.5 \pm 0.1
Potato peelings	110.6 \pm 3.4	18.0 \pm 0.42	3.5 \pm 0.06
Rice husk	60.0 \pm 0.9	16.0 \pm 0.6	1.0 \pm 0.031
Sugarcane baggase	72.8 \pm 2.6	20 \pm 0.12	5.8 \pm 0.11
Saw dust	55.4 \pm 1.5	18.1 \pm 0.65	3.0 \pm 0.21
Wheat bran	240.0 \pm 4.5	10.2 \pm 0.31	24.1 \pm 0.14
Wheat straw	100.9 \pm 3.2	19.4 \pm 0.11	4.3 \pm 0.04

Substrate (NaOH pretreated)	CMCase (U/gds)	FPase (U/gds)	β -glucosidase (U/gds)
Corn cobs	108.8 \pm 3.5	40.5 \pm 0.98	18.1 \pm 0.21
Carrot peelings	121.76 \pm 2.1	21.0 \pm 0.67	13.6 \pm 0.44
Composite kitchen waste	145.7 \pm 3.8	16.0 \pm 0.13	19.0 \pm 0.11
Grass	81.6 \pm 0.11	20.0 \pm 0.005	13.1 \pm 0.1
Leaves	100.8 \pm 1.2	17.8 \pm 0.12	6.3 \pm 0.12
Orange peelings	90.1 \pm 0.99	21.0 \pm 0.01	4.0 \pm 0.09
Pineapple waste	100.0 \pm 1.6	18.1 \pm 0.04	3.4 \pm 0.01
Potato peelings	144.0 \pm 3.7	24.0 \pm 0.1	17.8 \pm 0.02
Rice husk	75.6 \pm 3.1	14.0 \pm 0.004	14.1 \pm 0.16
Sugarcane baggase	90.7 \pm 2.1	15.3 \pm 0.12	16.3 \pm 0.1
Saw dust	73.8 \pm 1.1	6.9 \pm 0.18	15.7 \pm 0.32
Wheat bran	261.2 \pm 5.3	18.0 \pm 0.1	11.0 \pm 0.12
Wheat straw	127.5 \pm 2.7	30.6 \pm 0.12	5.1 \pm 0.09

Η προεπεξεργασία των αποβλήτων αυτών με το μύκητα *G.resinaseum*, θα διευκόλυνε τη διαδικασία σακχαροποίησης προς παραγωγή ζυμώσιμων σακχάρων για την τελική παραγωγή προϊόντων υψηλής προστιθέμενης αξίας. Από τα πειράματα προεπεξεργασία με τον *A.niger* που πραγματοποιήθηκαν σε οικιακά ζυμώσιμα απόβλητα, παρατηρούμε ότι η δράση των ενζύμων διαφοροποιείται μεταξύ των μη προεπεξεργασμένων υποστρωμάτων και των υποστρωμάτων που έχουν υποστεί προεπεξεργασία με NaOH ή με H₂SO₄. Ο συνδυασμός χημικής και βιολογικής προεπεξεργασίας, θα μπορούσε επίσης να αποτελέσει έναν μελλοντικό στόχο, προκειμένου να μελετηθεί η ενεργότητα των ενζύμων αποδόμησης βιομάζας και να συγκριθεί με τις αντίστοιχες ενεργότητες των ενζύμων του μύκητα *G.resinaseum* στην απλή βιολογική προεπεξεργασία.

ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ 1

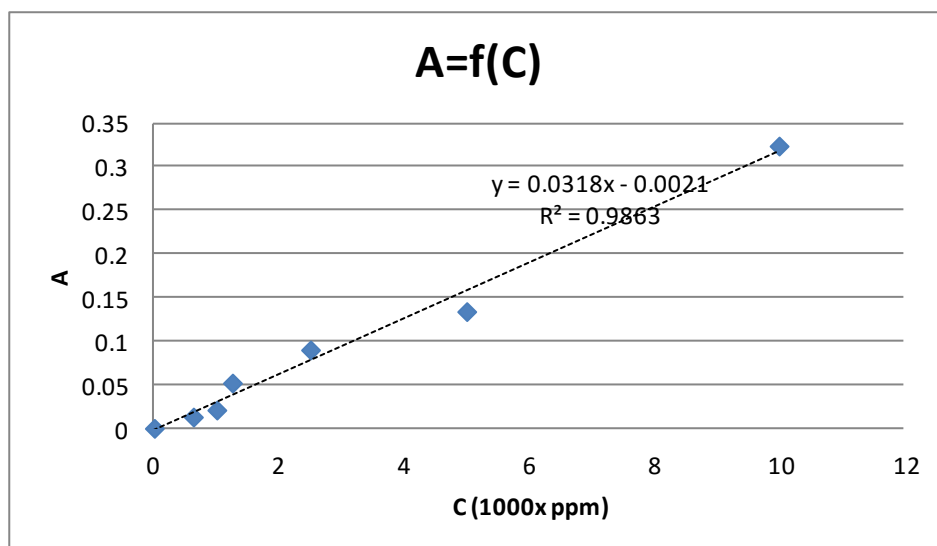
Στο **ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ 1** παρουσιάζονται τα αναλυτικά στοιχεία των πρότυπων καμπυλών που κατασκευάστηκαν και οι πρότυπες καμπύλες αναφοράς.

1. Πρότυπη καμπύλη βαθμονόμησης γλυκοζαμίνης

Για τον προσδιορισμό της ανάπτυξης βιομάζας του μύκητα κατασκευάστηκε πρότυπη καμπύλη βαθμονόμησης της συγκέντρωσης πρότυπης γλυκοζαμίνης. Για την κατασκευή της καμπύλης παρασκευάστηκαν διαλύματα συγκεντρώσεων από 625 ppm έως 10000 ppm και πραγματοποιήθηκε μόνο το χρωματομετρικό μέρος του προσδιορισμού, όπως αυτό περιγράφεται στις πειραματικές μεθόδους (παράγραφος 3.4. του πειραματικού μέρους). Τα αποτελέσματα της διαδικασίας παρουσιάζονται παρακάτω:

Πίνακας 1: Αποτελέσματα χρωματομετρικού προσδιορισμού διαλυμάτων πρότυπης ουσίας γλυκοζαμίνης για την κατασκευή πρότυπης καμπύλης βαθμονόμησης.

C (x1000 ppm)	A
10	0,324
5	0,134
2,5	0,09
1,25	0,052
1	0,021
0,625	0,013
0	0



Διάγραμμα 1: Καμπύλη βαθμονόμησης πρότυπης γλυκοζαμίνης.

2. Πρότυπη καμπύλη βαθμονόμησης γλυκόζης με τη μέθοδο DNS

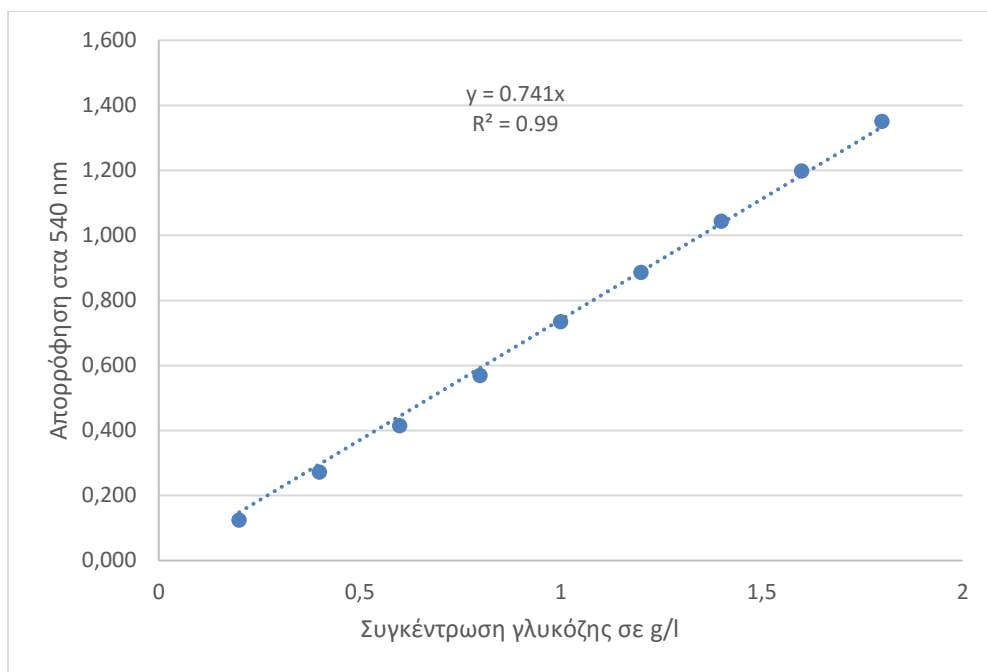
Για τον προσδιορισμό της γλυκόζης που απελευθερώνεται από την υδρόλυση της κυτταρίνης εφαρμόστηκε η μέτρηση αναγωγικών σακχάρων με τη μέθοδο DNS. Για το σκοπό αυτό απαραίτητη ήταν η κατασκευή καμπύλης βαθμονόμησης της γλυκόζης με τη μέθοδο DNS, κατά την οποία παρασκευάστηκαν διαλύματα πρότυπης γλυκόζης συγκεντρώσεων από 0.2 έως 1.8 g/l. Η διαδικασία που ακολουθήθηκε ήταν η εξής [44]:

1. Παρασκευάστηκαν 9 διαλύματα πρότυπης γλυκόζης συγκεντρώσεων 0.2, 0.4, 0.6, 0.8, 1, 1.2, 1.4, 1.6 και 1.8 g/l.
2. Σε δεκαοκτώ δοκιμαστικούς (δύο επαναλήψεις για κάθε συγκέντρωση) τοποθετήθηκαν 0.5ml διαλύματος DNS και 0.5ml από κάθε διάλυμα γλυκόζης και ακολούθησε έντονη ανάδευση.
3. Για το τυφλό διάλυμα σε δύο δοκιμαστικούς σωλήνες τοποθετήθηκαν 0.5ml διαλύματος DNS και 0.5ml απιονισμένου νερού.
4. Όλοι οι δοκιμαστικοί σωλήνες τοποθετήθηκαν σε νερό που βάζει για 5min. Μετά την πάροδο αυτού του χρόνου οι σωλήνες απομακρύνθηκαν από το βραστό νερό και προστέθηκαν σε αυτούς 4ml απιονισμένο νερό.
5. Ακολούθησε φωτομέτρηση στα 54nm. Το φωτόμετρο μηδενίστηκε με το τυφλό διάλυμα.

Τα αποτελέσματα της φωτομετρικής διαδικασίας που περιγράφηκε είναι τα εξής:

Πίνακας 2: Αποτελέσματα φωτομετρικού προσδιορισμού διαλυμάτων πρότυπης ουσίας γλυκόζης για την κατασκευή πρότυπης καμπύλης βαθμονόμησης με τη μέθοδο DNS.

C (g/l)	av.A
0.2	0.124
0.4	0.272
0.6	0.415
0.8	0.569
1	0.735
1.2	0.886
1.4	1.044
1.6	1.198
1.8	1.351



Διάγραμμα 2: Καμπύλη βαθμονόμησης πρότυπης γλυκόζης με τη μέθοδο DNS.

3. Πρότυπη καμπύλη βαθμονόμησης γλυκόζης με εμπορικό διαγνωστικό σκεύασμα (glucotest)

Για τον προσδιορισμό της γλυκόζης που απελευθερώνεται από τη δράση του ενζύμου β-γλυκοζιδάση σε μόρια κελλοβιόξης με διαγνωστικό σκεύασμα glucotest, απαραίτητη κρίθηκε η κατασκευή πρότυπης καμπύλης βαθμονόμησης γλυκόζης με την αντίστοιχη μέθοδο. Για το σκοπό αυτό παρασκευάστηκαν διαλύματα γλυκόζης συγκεντρώσεων από 0.1 έως 1g/l. Η διαδικασία που ακολουθήθηκε ήταν η εξής [44]:

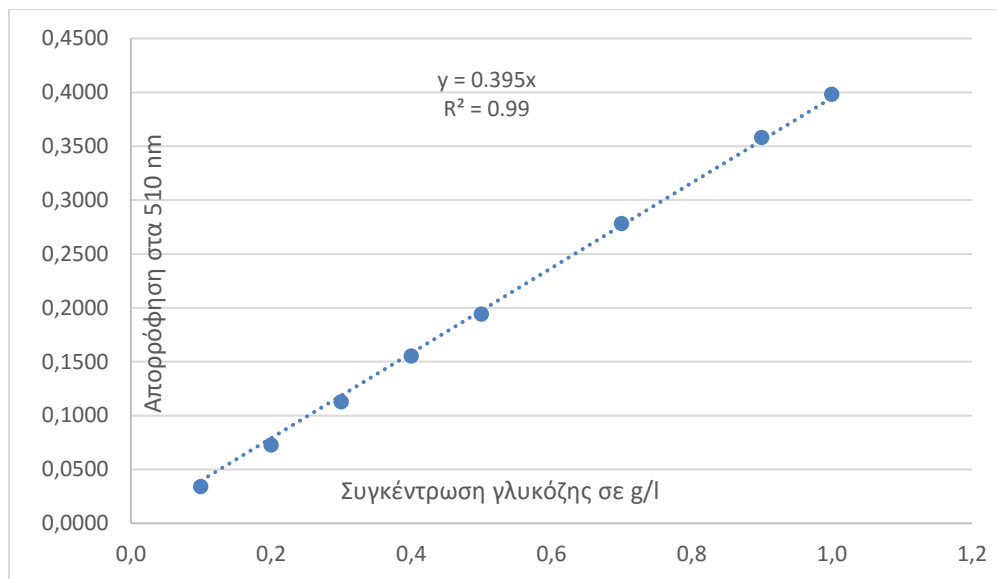
1. Παρασκευάστηκαν διαλύματα συγκέντρωσης 0.1, 0.2, 0.3, 0.4, 0.5, 0.7, 0.9 και 1g/l.
2. Σε δεκαέξι δοκιμαστικούς (δύο σωλήνες για κάθε συγκέντρωση γλυκόζης) προστέθηκαν 10μl από κάθε διάλυμα γλυκόζης και 1ml glucotest (η αναλογία glucotest: διάλυμα γλυκόζης ήταν 1:100)
3. Για το τυφλό σε δύο δοκιμαστικούς σωλήνες τοποθετήθηκαν 1ml διαλύματος glucotest και 10μl απιονισμένου νερού.
4. Στη συνέχεια, όλοι οι δοκιμαστικοί σωλήνες τοποθετήθηκαν σε υδατόλουτρο προς επώαση στους 37°C για 15min.
5. Τέλος, τα διαλύματα φωτομετρήθηκαν στα 510nm, ενώ το φωτόμετρο μηδενίστηκε με το τυφλό διάλυμα.

Τα αποτελέσματα που προέκυψαν από την φωτομετρική διαδικασία που περιγράφηκε είναι τα εξής:

Πίνακας 3: Αποτελέσματα φωτομετρικού προσδιορισμού διαλυμάτων πρότυπης ουσίας γλυκόζης για την κατασκευή πρότυπης καμπύλης βαθμονόμησης με εμπορικό διαγνωστικό σκεύασμα.

C g/l	av.A
0.1	0.034
0.2	0.073
0.3	0.113
0.4	0.155

0.5	0.194
0.7	0.278
0.9	0.3580
1.0	0.3980



Διάγραμμα 3: Καμπύλη βαθμονόμησης πρότυπης γλυκόζης με εμπορικό διαγνωστικό σκεύασμα.

4. Πρότυπη καμπύλη βαθμονόμησης παρανιτροφαινόλης (pNP)

Για τον προσδιορισμό της ξυλόζης που απελευθερώνεται από τη δράση του ενζύμου β-ξυλοζιδάση, χρησιμοποιείται η έμμεση μέθοδος προσδιορισμού του pNP από τη δράση της β-ξυλοζιδάσης σε υπόστρωμα pNP-xyloglycanoside. Για το σκοπό αυτό κρίθηκε απαραίτητη η κατασκευή πρότυπης καμπύλης pNP με την αντίστοιχη φωτομετρική μέθοδο που ακολουθήθηκε και για τον προσδιορισμό ενζυμικής ενεργότητας της β-ξυλοζιδάσης. Πιο συγκεκριμένα η διαδικασία κατασκευής πρότυπης καμπύλης pNP που πραγματοποιήθηκε ήταν η εξής:

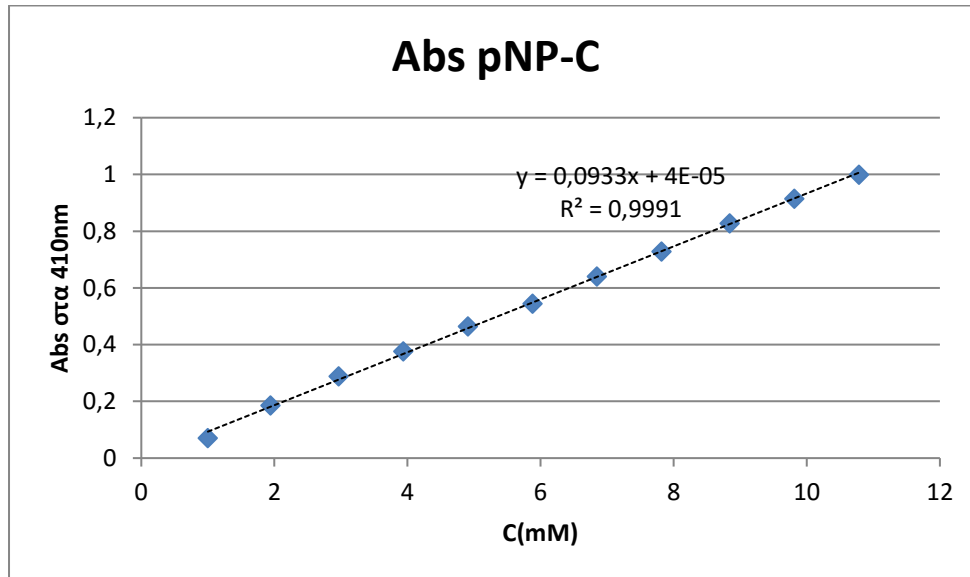
1. Παρασκευάστηκαν διαλύματα πρότυπης ουσίας pNP συγκεντρώσεων από 1 έως 10.78mM τελικού όγκου 2ml. Τα διαλύματα αυτά παρασκευάστηκαν με αραιώσεις του διαλύματος μεγαλύτερης συγκέντρωσης με ρυθμιστικό διάλυμα K_2HPO_4 -citric acid με pH=5. Χρησιμοποιήθηκαν δύο σωλήνες δοκιμαστικοί για κάθε συγκέντρωση pNP.
2. Για το τυφλό χρησιμοποιήθηκε το ρυθμιστικό διάλυμα με pH=5.
3. Ακολούθησε φωτομέτρηση των διαλυμάτων στα 410nm, ενώ το φωτόμετρο μηδενίστηκε με το τυφλό διάλυμα.

Τα αποτελέσματα που προέκυψαν από την φωτομετρική διαδικασία που περιγράφηκε είναι τα εξής:

Πίνακας 4: Αποτελέσματα φωτομετρικού προσδιορισμού διαλυμάτων πρότυπης ουσίας pNP για την κατασκευή πρότυπης καμπύλης βαθμονόμησης.

C pNP(mM)	av.A
1.00	0.071
1.94	0.186
2.97	0.288

3.94	0.376
4.91	0.465
5.88	0.544
6.85	0.64
7.82	0.728
8.84	0.828
9.81	0.914
10.78	0.999



Διάγραμμα 4: Καμπύλη βαθμονόμησης πρότυπης ουσίας pNP.

5. Πρότυπη καμπύλη βαθμονόμησης για το πρότυπο πρωτεϊνικό διάλυμα BSA

Για τον προσδιορισμό ολικών πρωτεϊνών του ενζυμικού παρασκευάσματος χρησιμοποιήθηκε η μέθοδος Bradford με χρήση πρότυπου πρωτεϊνικού διαλύματος BSA, για την οποία απαραίτητη στάθηκε η κατασκευή καμπύλης βαθμονόμησης της πρότυπης ουσίας BSA. Για το σκοπό αυτό χρησιμοποιήθηκε η ακόλουθη διαδικασία:

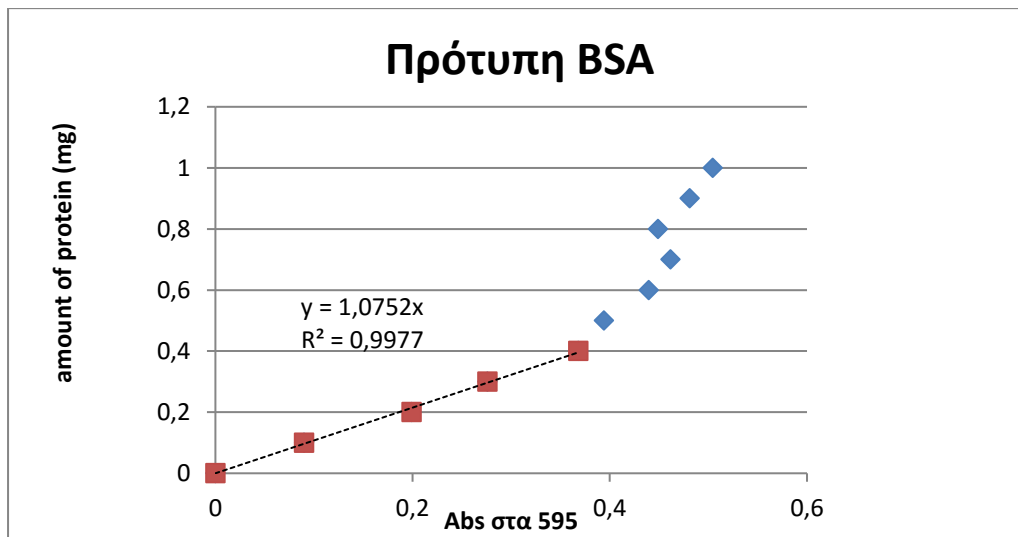
1. Προστέθηκε σε δοκιμαστικούς σωλήνες πρότυπη ουσία BSA όγκου 100, 200, 300, 400, 500, 600, 700, 800, 900 και 1000μl (δύο επαναλήψεις για κάθε όγκο).
2. Σε καθέναν από τους παραπάνω σωλήνες προστέθηκε απιονισμένο νερό έως τελικό όγκο 1ml.
3. Τα παραπάνω διαλύματα αναμίχθηκαν με 4ml Bradford reagent, το οποίο έχει παρασκευαστεί με τον τρόπο που αναφέρθηκε στο πειραματικό μέρος.
4. Μετά από 5min τα διαλύματα φωτομετρήθηκαν στα 595nm. Το φωτόμετρο μηδενίστηκε με τυφλό διάλυμα το οποίο περιείχε 1ml απιονισμένο νερό και 4ml Bradford reagent.

Τα αποτελέσματα που προέκυψαν από την φωτομετρική διαδικασία που περιγράφηκε είναι τα εξής:

Πίνακας 5: Αποτελέσματα φωτομετρικού προσδιορισμού διαλυμάτων πρότυπης ουσίας BSA για την κατασκευή πρότυπης καμπύλης βαθμονόμησης.

av. Abs	protein(mg)
---------	-------------

0.09	0.1
0.199	0.2
0.276	0.3
0.368	0.4
0.394	0.5
0.4395	0.6
0.4615	0.7
0.449	0.8
0.481	0.9
0.5045	1



Διάγραμμα 5: Καμπύλη βαθμονόμησης πρότυπης ουσίας BSA.

ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ 2

Στο παράρτημα αυτό παρατίθενται αναλυτικά οι πειραματικές μετρήσεις, καθώς και ο τρόπος υπολογισμού των αποτελεσμάτων.

1. Μετρήσεις Βιομάζας

Οι πρωτογενείς φωτομετρικές μετρήσεις βιομάζας παρουσιάζονται στον παρακάτω πίνακα (πίνακας 1):

Πίνακας 1: Πρωτογενείς φωτομετρικές μετρήσεις γλυκοζαμίνης.

HM/NIA	αρ. Δείγματος	αραίωση	abs1	abs2	Δabs1	Δabs2
13-Jun	<u>1</u>	1:1	0.890	0.866	0.175	0.151
17-Jun	<u>2</u>	1:1	0.973	0.913	0.258	0.198
21-Jun	<u>3</u>	1:1	0.776	0.810	0.061	0.095
30-Jun	4	1:2	0.859	0.759	0.144	0.044
1-Jul	5	1:2	0.860	0.800	0.145	0.085
7-Jul	<u>6</u>	1:2	0.900	0.928	0.185	0.213
12-Jul	<u>7</u>	1:2	0.958	0.917	0.243	0.202
HM/NIA	αρ. Δείγματος	αραίωση	C1(ppm)	c2(ppm)	stdev C	av. C(ppm)
13-Jun	<u>1</u>	1:1	0.028	0.027	0.001	0.005
17-Jun	<u>2</u>	1:1	0.031	0.029	0.001	0.007
21-Jun	<u>3</u>	1:1	0.024	0.025	0.001	0.002
30-Jun	4	1:2	0.027	0.024	0.002	0.003
1-Jul	5	1:2	0.027	0.025	0.001	0.004
7-Jul	<u>6</u>	1:2	0.028	0.029	0.001	0.006
12-Jul	<u>7</u>	1:2	0.030	0.029	0.001	0.007

Η τιμές ΔAbs προέκυψαν από τη διαφορά των απορροφήσεων με το μέσο όρο απορρόφησης των τυφλών δειγμάτων, το οποίο φαίνεται στον παρακάτω πίνακα (πίνακας 2).

Πίνακας 2: Αποτελέσματα απορροφήσεων στις μετρήσεις βιομάζας για τα τυφλά δείγματα που χρησιμοποιήθηκαν.

HM/NIA	αρ. Δείγματος	Abs1 τυφλό	Abs2 τυφλό	stdev_abs-blank
13-Jun	<u>1</u>	0.765	0.789	1.70E-02
17-Jun	<u>2</u>	0.763	0.75	9.19E-03
21-Jun	<u>3</u>	0.674	0.701	1.91E-02
30-Jun	4	0.674	0.701	1.91E-02

1-Jul	5	0.692	0.624	4.81E-02
7-Jul	6	0.753	0.7	3.75E-02
12-Jul	7	0.695	0.613	5.80E-02
av. Blank		0.7155		3.68E-01

Πίνακας 3: Αντιστοίχιση τυφλών δειγμάτων που μετρήθηκαν σε κάθε δείγμα δείγμα.

HM/NIA	αρ. Δείγματος	τυφλό δείγμα
13-Jun	1	blank 2
17-Jun	2	blank 2
21-Jun	3	blank 4
30-Jun	4	blank 4
1-Jul	5	blank 3
7-Jul	6	blank 3
12-Jul	7	blank 1

Η μετατροπή της απορρόφησης σε συγκέντρωση έγινε με τη βοήθεια της καμπύλης βαθμονόμησης της γλυκοζαμίνης (**διάγραμμα 1, ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ1**). Η συγκέντρωση γλυκοζαμίνης στον παραπάνω πίνακα αναφέρεται στο εξουδετερωμένο και αραιωμένο διάλυμα που φωτομετρήθηκε. Η αναγωγή στη συγκέντρωση γλυκοζαμίνης στα 5g καλλιέργειας πραγματοποιήθηκε μέσω του τύπου των αραιώσεων $C_1V_1 = C_2V_2$

και ακολούθησε αναγωγή στα g βιομάζας ανά μονάδα μάζας καλλιέργειας. Τα αποτελέσματα των υπολογισμών παρουσιάζονται παρακάτω (**πίνακας 4**).

Πίνακας 4: Αποτελέσματα βιομάζας.

HM/NIA	αρ. Δείγματος	αραίωση	C εξ.(g/ml)	g biomass στα 5g καλλιέργειας	Βεξουδ. (ml)	g biomass/g culture
13-Jun	1	1:1	1.03E-05	3.10E-05	8.27E-04	4.11E-03
17-Jun	2	1:1	1.45E-05	4.34E-05	1.43E-03	5.86E-03
21-Jun	3	1:1	4.93E-06	1.48E-05	3.94E-04	1.63E-03
30-Jun	4	1:2	5.95E-06	1.78E-05	9.51E-04	3.61E-03
1-Jul	5	1:2	7.28E-06	2.18E-05	1.12E-03	4.53E-03
7-Jul	6	1:2	1.26E-05	3.79E-05	2.45E-03	1.01E-02
12-Jul	7	1:2	1.41E-05	4.24E-05	2.68E-03	1.15E-02

2. Μετρήσεις ολικών πρωτεϊνών

Για τον προσδιορισμό των ολικών πρωτεϊνών που παρήχθησαν από το μύκητα μετρήθηκαν οι ολικές πρωτεΐνες στο εκχύλισμα των δειγμάτων καλλιέργειας, καθώς και οι πρωτεΐνες του εκχυλίσματος τεσσάρων τυφλών δειγμάτων. Ο μέσος όρος των τελευταίων αφαιρέθηκε από την τιμή ολικών πρωτεϊνών που προκύπτει από κάθε δείγμα καλλιέργειας. Παρακάτω παρουσιάζονται αναλυτικά οι τιμές των απορροφήσεων καθώς και τα αποτελέσματα που προέκυψαν για το κάθε δείγμα. Η μετατροπή της απορρόφησης σε μάζα πρωτεϊνών προέκυψε από το **διάγραμμα 5** στο **ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ 1**. Οι τιμές “**protein**

1”, „protein2” αναφέρονται στη μάζα πρωτεΐνης που περιείχε το 1ml ενζυμικού παρασκευάσματος που προστέθηκε στο διάλυμα αντίδρασης το οποίο φωτομετρήθηκε. Η τιμή “stdev” αναφέρεται στην σχετική απόκλιση των δυο παραπάνω τιμών, ενώ στην τελευταία στήλη γίνεται αναγωγή, μέσω του τύπου των αραιώσεων, στη μάζα των πρωτεϊνών στο ενζυμικό παρασκεύασμα που εκχυλίστηκε από την αρχική καλλιέργεια. Στο **πίνακα 5** περιλαμβάνονται οι τιμές μάζας ολικών πρωτεϊνών της καλλιέργειας μετά από αφαίρεση του μέσου όρου ολικών πρωτεϊνών του υποστρώματος ιτιάς. Στον **πίνακα 6** παρουσιάζονται αναλυτικά τα αντίστοιχα στοιχεία για τα τυφλά διαλύματα, ενώ υπολογίζεται και ο μέσος όρος των ολικών πρωτεϊνών του εκχυλίσματος ιτιάς.

Πίνακας 5: Μετρήσεις και αποτελέσματα από τον προσδιορισμό των ολικών πρωτεϊνών με τη μέθοδο Bradford.

HM/NI A	αρ. Δείγμ.	αραίωση	abs1	abs2	average abs	protein 1(mg)	protein 2(mg)	stdev prot.	g protein στα 40ml E
17-Jun	1	1:1	0.453	0.444	4.485E-01	4.87E-01	4.77E-01	6.84E-03	9.5E-02
22-Jun	2	1:1	0.462	0.46	4.610E-01	4.97E-01	4.95E-01	1.52E-03	1.1E-01
23-Jun	3	1:1	0.455	0.457	4.560E-01	4.89E-01	4.91E-01	1.52E-03	1.0E-01
28-Jun	4	1:1	0.502	0.509	5.055E-01	5.40E-01	5.47E-01	5.32E-03	1.6E-01
1-Jul	5	1:1	0.547	0.548	5.475E-01	5.88E-01	5.89E-01	7.60E-04	2.0E-01
7-Jul	6	1:1	0.587	0.595	5.910E-01	6.31E-01	6.40E-01	6.08E-03	2.5E-01
12-Jul	7	1:1	0.598	0.603	6.005E-01	6.43E-01	6.48E-01	3.80E-03	2.6E-01

*Το “E” συμβολίζει το ενζυμικό παρασκεύασμα.

Πίνακας 6: Μετρήσεις απορρόφησης με τη μέθοδο Bradford για τα τυφλά δείγματα.

HM/NIA	αρ. Δείγμ.	αραίωση	abs1	abs2	average abs	protein 1(mg)	protein 2(mg)	stdev prot.	g protein στα 40ml E
12-Jul	blank 1	1:1	0.361	0.38	3.705E-01	3.88E-01	4.09E-01	1.44E-02	3.9E-01
17-Jun	blank 2	1:1	0.424	0.426	4.250E-01	4.56E-01	4.58E-01	1.52E-03	
6-Jul	blank 3	1:1	0.398	0.409	4.035E-01	4.28E-01	4.40E-01	8.36E-03	
28-Jun	blank 4	1:1	0.239	0.244	2.415E-01	2.57E-01	2.62E-01	3.80E-03	

*Το “E” συμβολίζει το ενζυμικό παρασκεύασμα.

3. Μετρήσεις ενζυμικής ενεργότητας λακκάσης

Για τον προσδιορισμό ενεργότητας της λακκάσης πραγματοποιήθηκαν μετρήσεις απορρόφησης για χρόνο από 1-10min και από τα σημεία που προέκυψαν υπολογίστηκε η κλίση της καμπύλης απορρόφησης που σχηματίστηκε. Οι αρνητικές τιμές των απορροφήσεων οφείλονται στον πιο σκούρο χρωματισμό που λαμβάνει το βρασμένο ενζυμικό παρασκεύασμα, το οποίο χρησιμοποιείται στο τυφλό δείγμα μηδενισμού. Ωστόσο για τα αποτελέσματα ενεργότητας μας ενδιαφέρουν οι κλίσεις των καμπυλών απορρόφησης ως προς το χρόνο και όχι οι τιμές των απορροφήσεων.

Η μετατροπή της κλίσης της καμπύλης σε ενεργότητα έγινε μέσω του τύπου:

$$E = \frac{a \cdot V_{\text{μίγματος}} \cdot 10^6}{\epsilon \cdot b \cdot V_{\text{ενζύμου}}}$$

E, η δραστικότητα του ενζύμου, U/L

a, η κλίση της ευθείας του γραμμικού τμήματος των μετρήσεων, min⁻¹

ε, οριακή απορροφητικότητα (ε_{ABTS}=361000 L/(mol*cm))

b, το μήκος της κυψελίδας στην οποία γίνεται η αντίδραση, cm

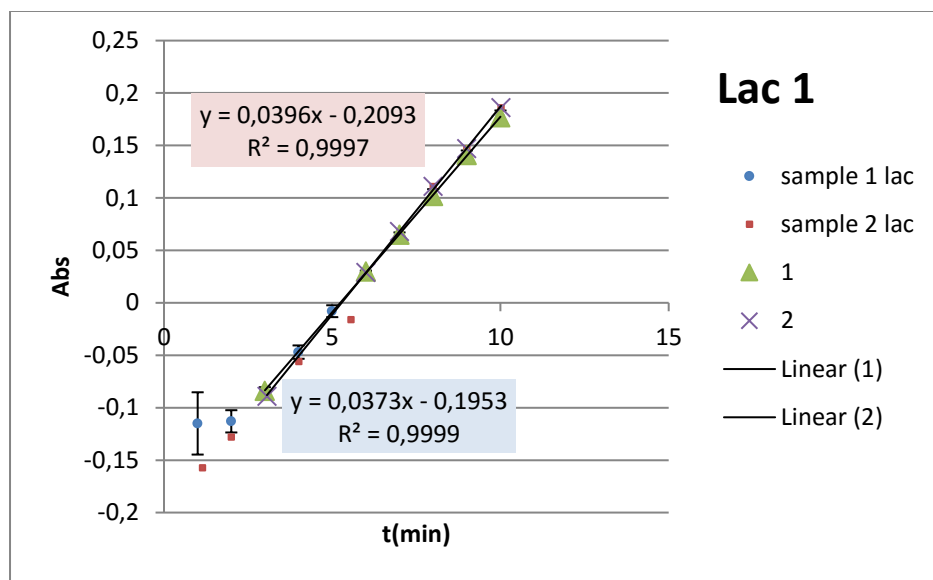
V_{μίγματος}, ο όγκος του μίγματος της αντίδρασης, μL

V_{ενζύμου}, ο όγκος του δείγματος του ενζύμου προς προσδιορισμό, μL

Πραγματοποιήθηκαν δύο σειρές μετρήσεων από τις οποίες προέκυψαν αντίστοιχα δύο τιμές κλίσεων και ενεργότητας. Στα σημεία των καμπυλών εμφανίζεται η σχετική απόκλιση των απορροφήσεων σε κάθε μέτρηση, ενώ έχει υπολογιστεί και η σχετική απόκλιση των τιμών ενεργότητας που προκύπτουν. Το σχετικό σφάλμα των ενεργοτήτων χρησιμοποιήθηκε στη συνέχεια στα διαγράμματα ενεργότητας και ειδικής ενεργότητας της λακκάσης συναρτήσεως του χρόνου καλλιέργειας, τα οποία παρουσιάζονται στην ενότητα «Αποτελέσματα-Συμπεράσματα» (διαγράμματα 4,5). Τα σημεία των διαγραμμάτων που συμμετείχαν στον υπολογισμό της κλίσης για την εύρεση ενεργότητας του ενζύμου επιλέχθηκαν με κριτήριο το σχετικό τους σφάλμα στις δύο σειρές μετρήσεων.

Πίνακας 7: Πρωτογενείς μετρήσεις απορρόφησης για την εύρεση ενεργότητας της λακκάσης στο δείγμα 1.

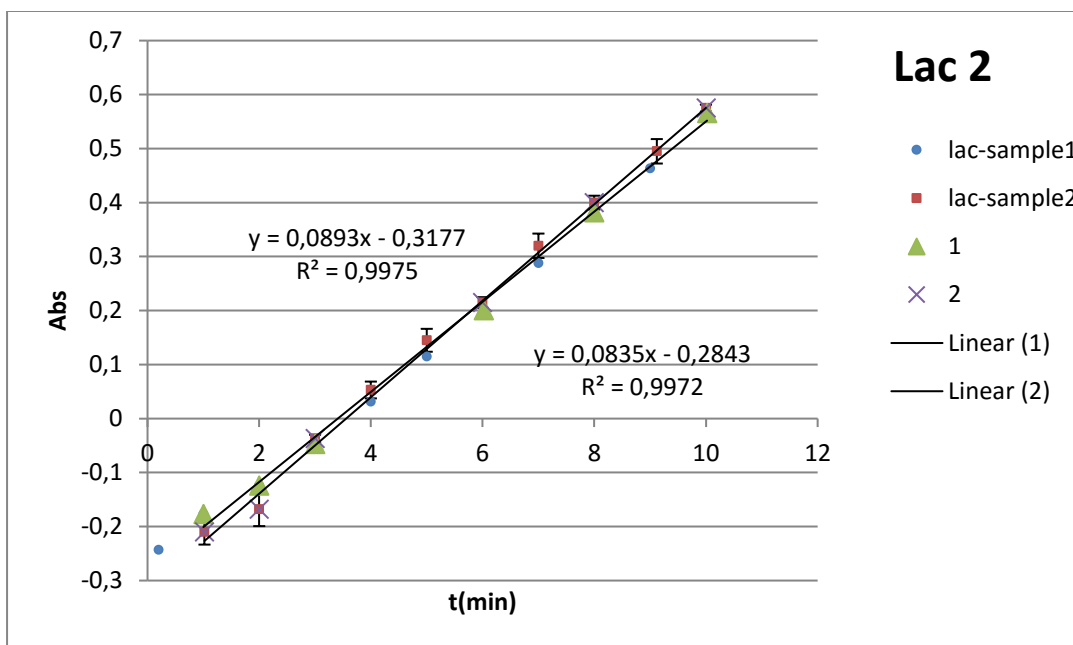
Δείγμα	HM/NIA	t1 (min)	abs 1	t2(min)	abs 2	Units/l	stdev abs	STDEV U/L
1	12/6	1	-0.115	1.14	-0.157	54.848	0.030	2.253
		2	-0.113	2	-0.128	51.662	0.011	
		3	-0.084	3.06	-0.089	AVERAGE U/L	0.004	
		4	-0.047	4.01	-0.056	53.255	0.006	
		5	-0.008	5.56	-0.016	dA/dt	0.006	
		6	0.03	6	0.029	0.040	0.001	
		7	0.065	7	0.068	0.037	0.002	
		8	0.102	8	0.111	αραίωση	0.006	
		9	0.141	9	0.147	1:10	0.004	
		10	0.177	10.02	0.186		0.006	
				E(L*MOL-1*CM-1)	Vreaction (ml)	Vsample (ml)	AVERAGE STDEV ABS	
				36100	1	0.020	0.008	



Διάγραμμα 1: Διαγραμματική απεικόνιση αποτελεσμάτων απορρόφησης ως προς το χρόνο για τη μέτρηση ενεργότητας της λακκάσης στο δείγμα 1.

Πίνακας 8: Πρωτογενείς μετρήσεις απορρόφησης για την εύρεση ενεργότητας της λακκάσης στο δείγμα 2.

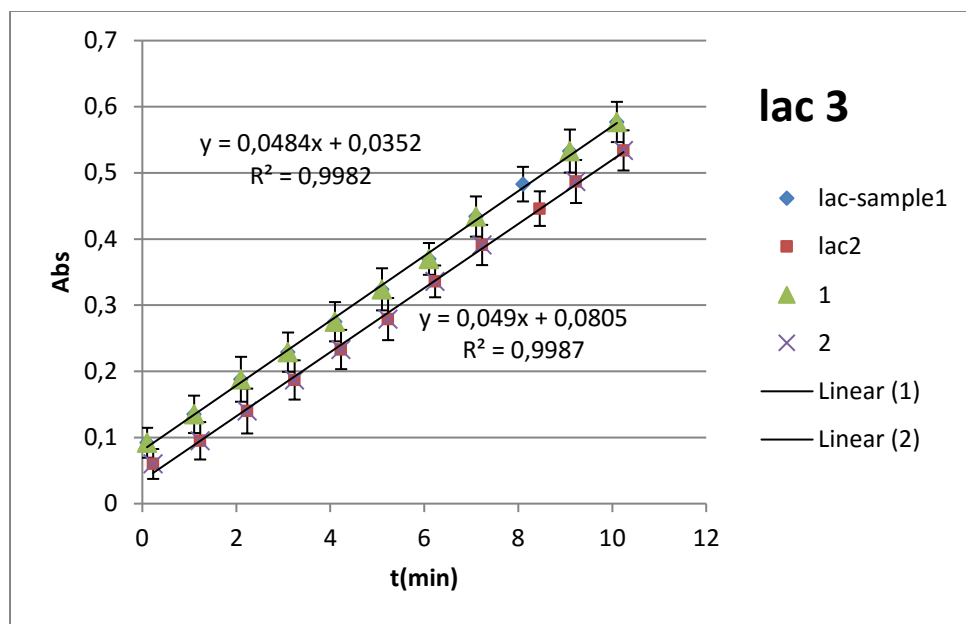
Δείγμα	HM/NI A	t1(min)	abs1	abs2	t2(min)	Unit/l	stdev abs	STDEV U/L
2	17/6	0.2	-0.243			123.269		4.897
		1	-0.177	-0.21	1.02	116.343	0.023	
		2	-0.124	-0.168	2	AVERAGE U/L	0.031	
		3	-0.047	-0.037	3	119.806	0.007	
		4	0.031	0.053	4	dA/dt	0.016	
		5	0.115	0.145	5	0.089	0.021	
		6.02	0.201	0.215	6	0.084	0.010	
		7	0.288	0.32	7	αραίωση	0.023	
		8	0.382	0.4	8	1:10	0.013	
		9	0.463	0.495	9.12	V_{sample} (ml)	0.023	
		10.02	0.566	0.575	10	0.020	0.006	
					E(L*MOL -1*CM-1)	V_{reaction} (ml)	AVERAGE STDEV- ABS	
					36100	1	0.017	



Διάγραμμα 2: Διαγραμματική απεικόνιση αποτελεσμάτων απορρόφησης ως προς το χρόνο για τη μέτρηση ενεργότητας της λακκάσης στο δείγμα 2.

Πίνακας 9: Πρωτογενείς μετρήσεις απορρόφησης για την εύρεση ενεργότητας της λακκάσης στο δείγμα 3.

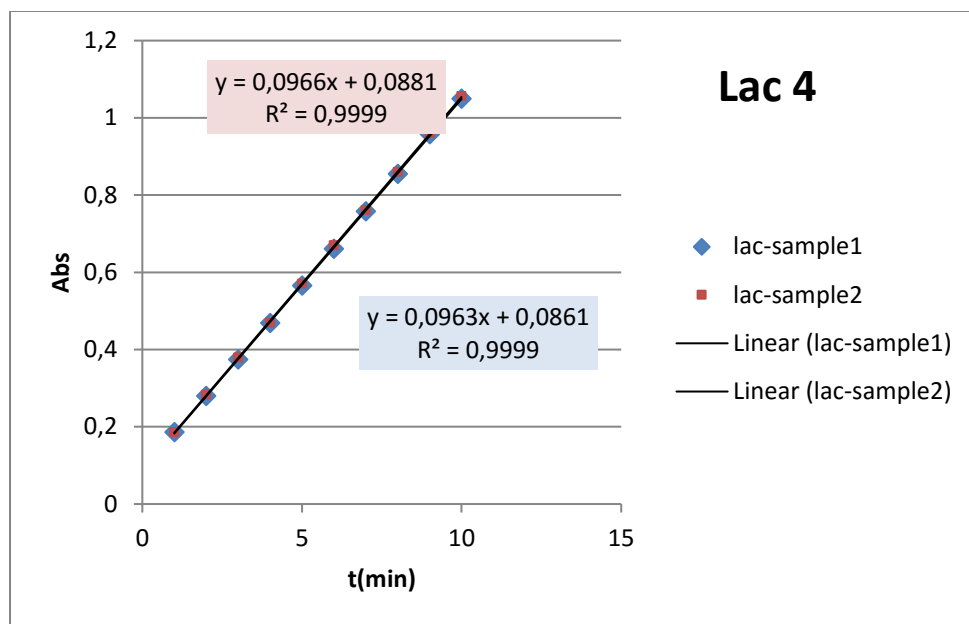
Δείγμα	HM/NI A	t1(min)	abs1	abs2	t(min)	stdev ABS	U/l	STDEV U/L
3	23/06	0.1	0.092	0.06	0.23	0.023	67.867	0.381
		1.1	0.135	0.095	1.23	0.028	67.328	
		2.1	0.188	0.14	2.23	0.034	AVERAGE U/L	
		3.1	0.229	0.187	3.24	0.030	67.598	
		4.1	0.275	0.233	4.23	0.030	αραίωση	
		5.1	0.324	0.279	5.23	0.032	1:10	
		6.1	0.37	0.336	6.23	0.024		
		7.1	0.434	0.391	7.23	0.030	Vsample (ml)	
		8.1	0.483	0.446	8.46	0.026	0.020	
		9.1	0.533	0.487	9.23	0.033		
		10.1	0.577	0.534	10.24	0.030	dA/dt	
				E(L*MOL- 1*CM-1)	Vreac tion (ml)	AVERAGE STDEV ABS	0.049	
				36100	1	0.029	0.048	



Διάγραμμα 3: Διαγραμματική απεικόνιση αποτελεσμάτων απορρόφησης ως προς το χρόνο για τη μέτρηση ενεργότητας της λακκάσης στο δείγμα 3.

Πίνακας 10: Πρωτογενείς μετρήσεις απορρόφησης για την εύρεση ενεργότητας της λακκάσης στο δείγμα 4.

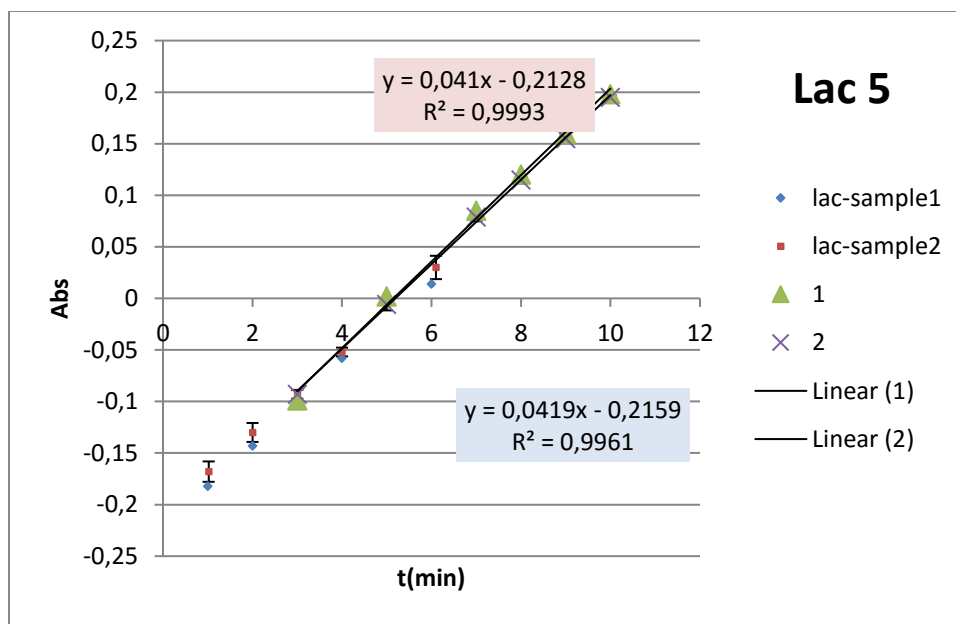
Δείγμα	HM/NIA	t1(min)	abs1	abs2	t2(min)	stdev	U/l	STDEV U/L
4	28/06	1	0.186	0.186	1	0.000	267.590	0.588
		2	0.28	0.283	2	0.002	266.759	
		3	0.374	0.379	3	0.004	AVERAGE U/L	
		4	0.469	0.47	4	0.001	267.175	
		5	0.566	0.571	5	0.004	αραίωση	
		6	0.661	0.67	6	0.006	1:20	
		7	0.758	0.761	7	0.002	V_{sample} (ml)	
		8	0.855	0.86	8	0.004	0.010	
		9	0.958	0.96	9	0.001		
		10	1.05	1.056	10	0.004	dA/dt	
				E(L*MOL-1*CM-1)	V_{reaction} (ml)	AVERAGE STDEV ABS	0.097	
				36100	1	0.003	0.096	



Διάγραμμα 4: Διαγραμματική απεικόνιση αποτελεσμάτων απορρόφησης ως προς το χρόνο για τη μέτρηση ενεργότητας της λακκάσης στο δείγμα 4.

Πίνακας 11: Πρωτογενείς μετρήσεις απορρόφησης για την εύρεση ενεργότητας της λακκάσης στο δείγμα 5.

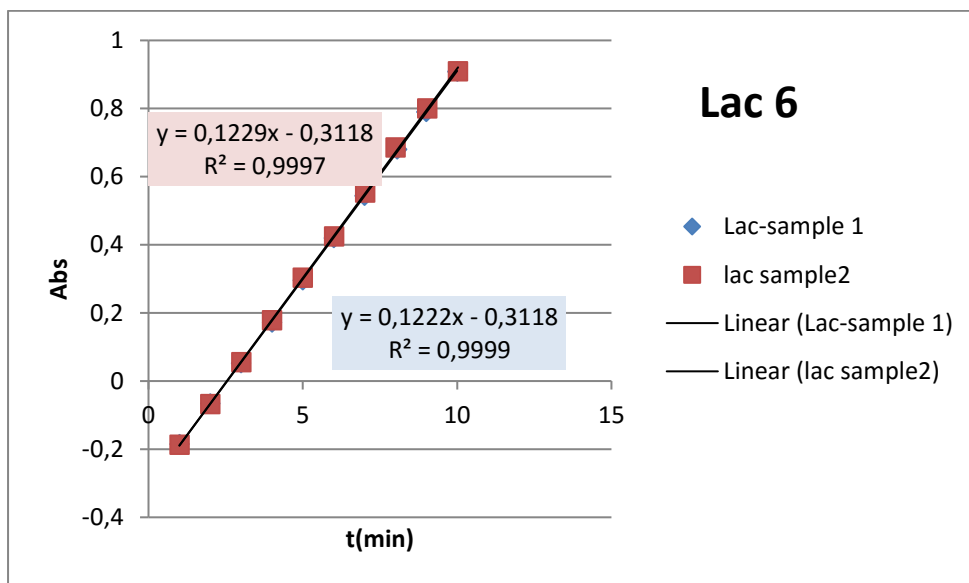
Δείγμα	HM/NI A	t1(min)	abs1	abs2	t2(min)	stdev	U/I	STDEV U/L
5	1/7	1	-0.182	-0.168	1.02	0.010	113.573	1.763
		2	-0.143	-0.13	2	0.009	116.066	
		3	-0.099	-0.093	3	0.004	AVERAGE U/L	
		4	-0.058	-0.052	4	0.004	114.820	
		5	0.002	-0.006	5	0.006	αραίωση	
		6	0.014	0.03	6.1	0.011	1:100	
		7	0.085	0.079	7	0.004	Vsample (ml)	
		8	0.12	0.115	8	0.004	0.002	
		9	0.16	0.155	9	0.004		
		10	0.198	0.195	10	0.002	dA/dt	
			E(L*MO L-1*CM- 1)		AVER AGE STDE V ABS			
			36100	Vreacti on (ml)		0.041		
				1	0.006	0.042		



Διάγραμμα 5: Διαγραμματική απεικόνιση αποτελεσμάτων απορρόφησης ως προς το χρόνο για τη μέτρηση ενεργότητας της λακκάσης στο δείγμα 5.

Πίνακας 12: Πρωτογενείς μετρήσεις απορρόφησης για την εύρεση ενεργότητας της λακκάσης στο δείγμα 6.

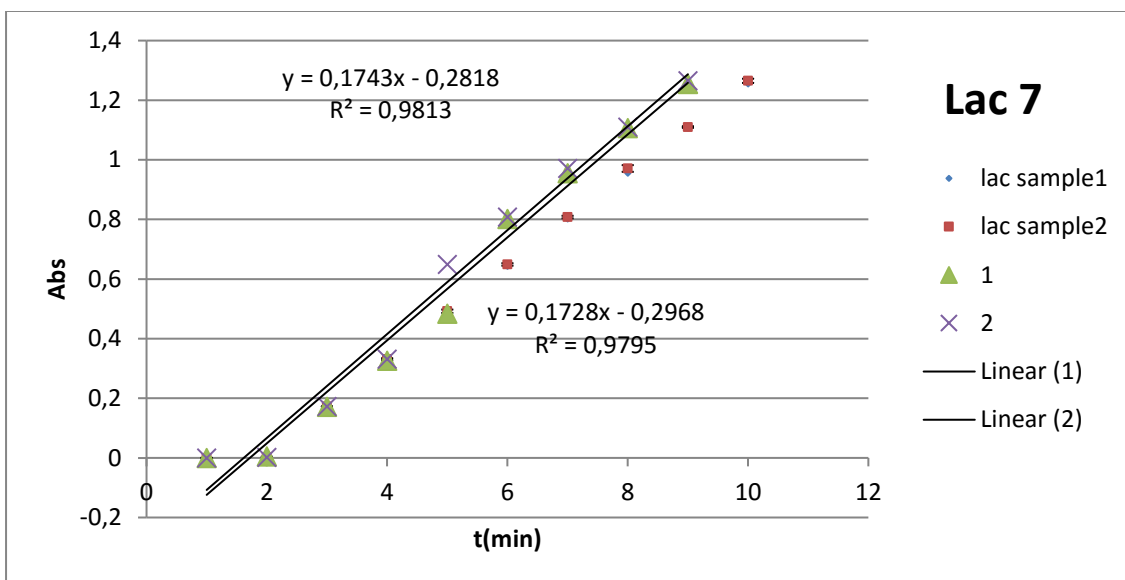
Δείγμα	HM/NI A	t1(min)	abs1	t2(min)	abs2	stdev	U/l	STDEV U/L
6	5/7		- 0.18					0.98
		1	5	1	-0.187	0.00	170.36	
		2	0.06 6	2	-0.068	0.00	168.98	
		3	0.05 3	3.01	0.055	0.00	AVERAGE U/L	
		4	0.17 2	4	0.178	0.00	169.67	
		5	0.29 6	5	0.303	0.00	αραίωση	
		6	0.42 6.01	6.01	0.425	0.00	1:10	
		7	0.54 4	7.02	0.553	0.01	V_{sample} (ml)	
		8.06	0.68 8	8	0.686	0.00	0.02	
		9	0.79 9.03	9.03	0.8	0.01		
10	0.90 8	10.03	0.909	0.00	dA/dt			
			E(L*MOL- 1*CM-1)	Vreac tion (ml)	AVER AGE STDE V ABS		0.12	
			36100	1	0.00		0.12	



Διάγραμμα 6: Διαγραμματική απεικόνιση αποτελεσμάτων απορρόφησης ως προς το χρόνο για τη μέτρηση ενεργότητας της λακκάσης στο δείγμα 6.

Πίνακας 13: Πρωτογενείς μετρήσεις απορρόφησης για την εύρεση ενεργότητας της λακκάσης στο δείγμα 7.

Δείγμα	HM/NI A	t1(min)	abs1	t2(min)	abs2	stdev	U/l	STDEV U/L
7	8/7	2	0.005	2	0.002	0.00	220.22	1.96
		3.02	0.171	3	0.172	0.00	217.45	
		4	0.326	4	0.331	0.00	AVERAG E U/L	
		5	0.484	5	0.492	0.01	218.84	
		5.59	0.643	6	0.649	0.00	αραίωσ η	
		7	0.802	7	0.808	0.00	60 : 660	
		8	0.955	8	0.971	0.01	Vsample (ml)	
		9	1.106	9	1.11	0.00	0.02	
		10	1.255	10	1.265	0.01	dA/dt	
					E(L*MOL- 1*CM-1)		Vreacti on (ml)	AVERA GE STDEV ABS
			36100		1	0.00	0.16	0.16



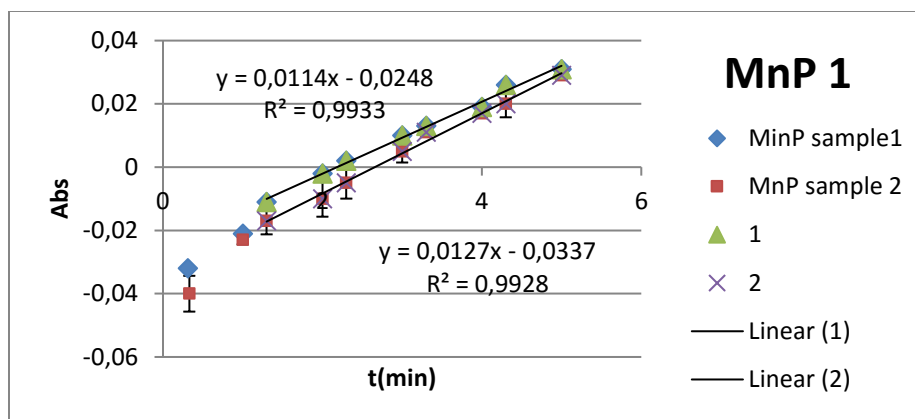
Διάγραμμα 7: Διαγραμματική απεικόνιση αποτελεσμάτων απορρόφησης ως προς το χρόνο για τη μέτρηση ενεργότητας της λακκάσης στο δείγμα 7.

4. Μετρήσεις ενζυμικής ενεργότητας υπεροξειδάσης εξαρτημένης του μαγγανίου

Ο υπολογισμός ενεργότητας της υπεροξειδάσης που είναι εξαρτημένη του μαγγανίου έγινε με όμοιο τρόπο με τον υπολογισμό ενεργότητας της λακκάσης.

Πίνακας 14: Πρωτογενείς μετρήσεις απορρόφησης για την εύρεση ενεργότητας της υπεροξειδάσης που είναι εξαρτημένη του μαγγανίου στο δείγμα 1.

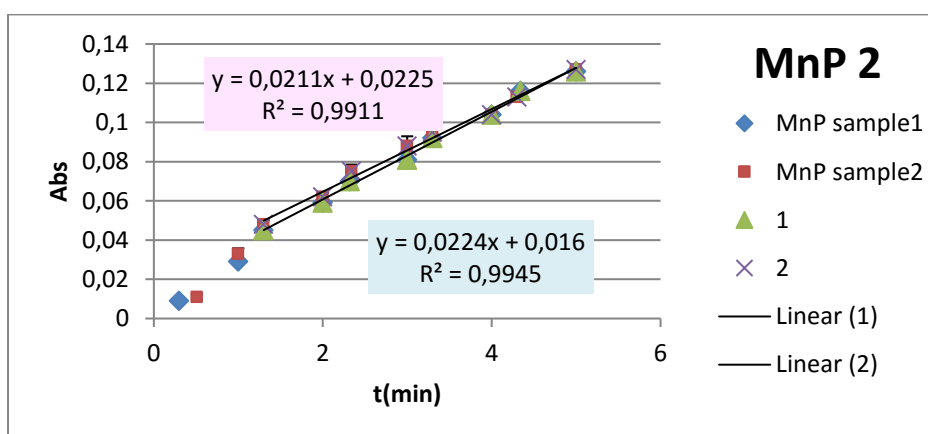
ΔΕΙΓΜΑ	HM/NIA	t1	Abs1	t2	Abs 2	dA/dt	stdev abs	stdev U/l
1	6/7	0.31	-0.032	0.33	-0.04	0.011	0.006	0.107463
		1	-0.021	1	-0.023	0.012	0.001	
		1.3	-0.011	1.3	-0.017	U/L	0.004	
		2	-0.002	2	-0.01	1.671733	0.006	
		2.3	0.002	2.3	-0.005	1.823708	0.005	
		3	0.01	3	0.005	Average U	0.004	
		3.3	0.013	3.3	0.011	1.74772	0.001	
		4	0.019	4	0.017		0.001	
		4.3	0.026	4.3	0.02		0.004	
		5	0.031	5	0.029		0.001	



Διάγραμμα 8: Διαγραμματική απεικόνιση αποτελεσμάτων απορρόφησης ως προς το χρόνο για τη μέτρηση ενεργότητας της υπεροξειδάσης που είναι εξαρτημένη του μαγγανίου στο δείγμα 1.

Πίνακας 15: Πρωτογενείς μετρήσεις απορρόφησης για την εύρεση ενεργότητας της υπεροξειδάσης που είναι εξαρτημένη του μαγγανίου στο δείγμα 2.

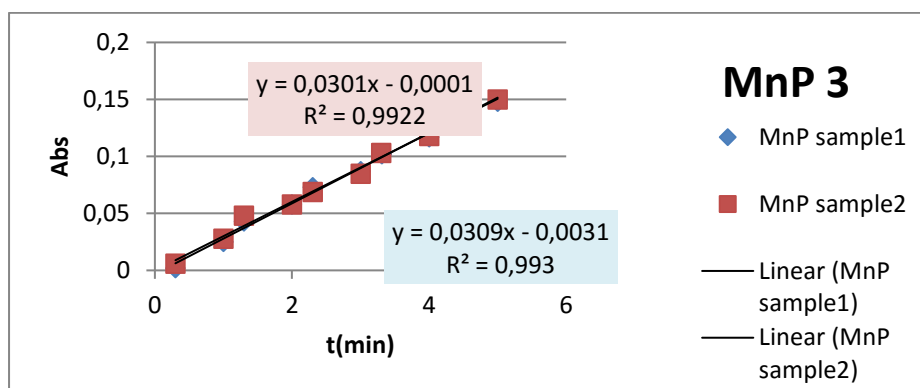
ΔΕΙΓΜΑ	HM/ΝΙΑ	t1	Abs1	t2	Abs 2	dA/dt	stdev abs	stdev U/I
2	6/7	0.3	0.009	0.51	0.011	0.021	0.001	0.107463
		1	0.029	1	0.033	0.022	0.003	
		1.3	0.045	1.3	0.048	U/L	0.002	
		2	0.059	2	0.062	3.191489	0.002	
		2.32	0.07	2.34	0.075	3.343465	0.004	
		3	0.081	3	0.088	Average U/I	0.005	
		3.3	0.092	3.3	0.095	3.267477	0.002	
		4	0.104	4	0.104		0.000	
		4.34	0.116	4.3	0.113		0.002	
		5	0.126	5	0.127		0.001	



Διάγραμμα 9: Διαγραμματική απεικόνιση αποτελεσμάτων απορρόφησης ως προς το χρόνο για τη μέτρηση ενεργότητας της υπεροξειδάσης που είναι εξαρτημένη του μαγγανίου στο δείγμα 2.

Πίνακας 16: Πρωτογενείς μετρήσεις απορρόφησης για την εύρεση ενεργότητας της υπεροξειδάσης που είναι εξαρτημένη του μαγγανίου στο δείγμα 3.

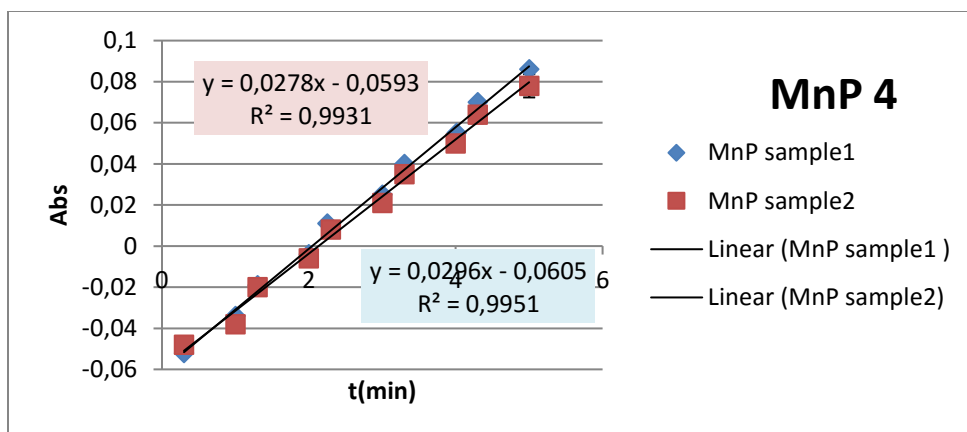
ΔΕΙΓΜΑ	HM/NIA	t1	Abs1	t2	Abs 2	dA/dt	stdev abs	stdev U/l
3	6/7	0.3	0.002	0.3	0.006	0.03	0.003	0.107463
		1	0.025	1	0.028	0.031	0.002	
		1.3	0.043	1.3	0.048	U/L	0.004	
		2	0.058	2	0.058	4.559271	0.000	
		2.3	0.073	2.3	0.069	4.711246	0.003	
		3	0.087	3	0.085	AverageU/l	0.001	
		3.31	0.102	3.3	0.103	4.635258	0.001	
		4	0.117	4	0.118		0.001	
		4.3	0.134	4.3	0.132		0.001	
		5	0.148	5	0.15		0.001	



Διάγραμμα 10: Διαγραμματική απεικόνιση αποτελεσμάτων απορρόφησης ως προς το χρόνο για τη μέτρηση ενεργότητας της υπεροξειδάσης που είναι εξαρτημένη του μαγγανίου στο δείγμα 3.

Πίνακας 17: Πρωτογενείς μετρήσεις απορρόφησης για την εύρεση ενεργότητας της υπεροξειδάσης που είναι εξαρτημένη του μαγγανίου στο δείγμα 4.

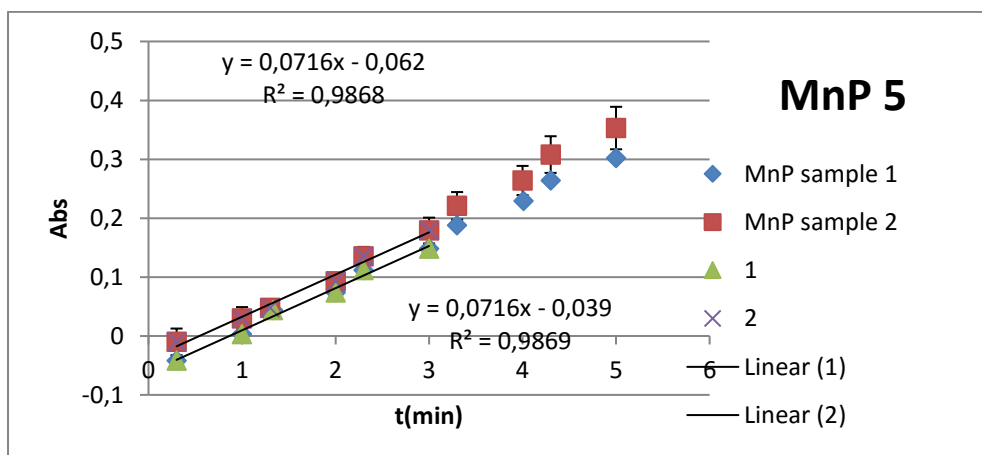
ΔΕΙΓΜΑ	HM/NIA	t1	Abs1	t2	Abs 2	dA/dt	stdev abs	stdev U/l
4	6/7	0.3	-0.052	0.3	-0.048	0.028	0.003	0.215
		1	-0.034	1	-0.038	0.03	0.003	
		1.3	-0.019	1.3	-0.02	U/L	0.001	
		2	-0.004	2	-0.006	4.255319	0.001	
		2.25	0.011	2.3	0.008	4.559271	0.002	
		3	0.025	3	0.021	Average U/l	0.003	
		3.3	0.04	3.3	0.035	4.407295	0.004	
		4.01	0.055	4	0.05		0.004	
		4.3	0.07	4.3	0.064		0.004	
		5	0.086	5	0.078		0.006	



Διάγραμμα 11: Διαγραμματική απεικόνιση αποτελεσμάτων απορρόφησης ως προς το χρόνο για τη μέτρηση ενεργότητας της υπεροξειδάσης που είναι εξαρτημένη του μαγγανίου στο δείγμα 4.

Πίνακας 18: Πρωτογενείς μετρήσεις απορρόφησης για την εύρεση ενεργότητας της υπεροξειδάσης που είναι εξαρτημένη του μαγγανίου στο δείγμα 5.

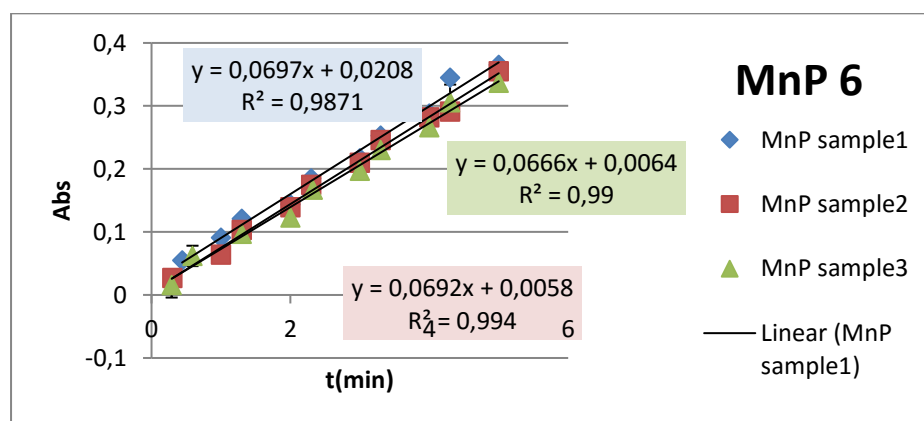
ΔΕΙΓΜΑ	HM/NIA	t1	Abs1	t2	Abs 2	dA/dt	stdev abs	stdev U/I
5	6/7	0.3	-0.042	0.3	-0.01	0.072	0.023	0
		1	0.003	1	0.03	0.072	0.019	
		1.33	0.044	1.3	0.048	U/L	0.003	
		2	0.074	2	0.093	10.942	0.013	
		2.3	0.112	2.3	0.135	10.942	0.016	
		3	0.148	3	0.179	Average U/I	0.022	
		3.3	0.188	3.3	0.221	10.942	0.023	
		4.01	0.229	4	0.264		0.025	
		4.3	0.264	4.3	0.308		0.031	
		5	0.302	5	0.353		0.036	



Διάγραμμα 12: Διαγραμματική απεικόνιση αποτελεσμάτων απορρόφησης ως προς το χρόνο για τη μέτρηση ενεργότητας της υπεροξειδάσης που είναι εξαρτημένη του μαγγανίου στο δείγμα 5.

Πίνακας 19: Πρωτογενείς μετρήσεις απορρόφησης για την εύρεση ενεργότητας της υπεροξειδάσης που είναι εξαρτημένη του μαγγανίου στο δείγμα 6.

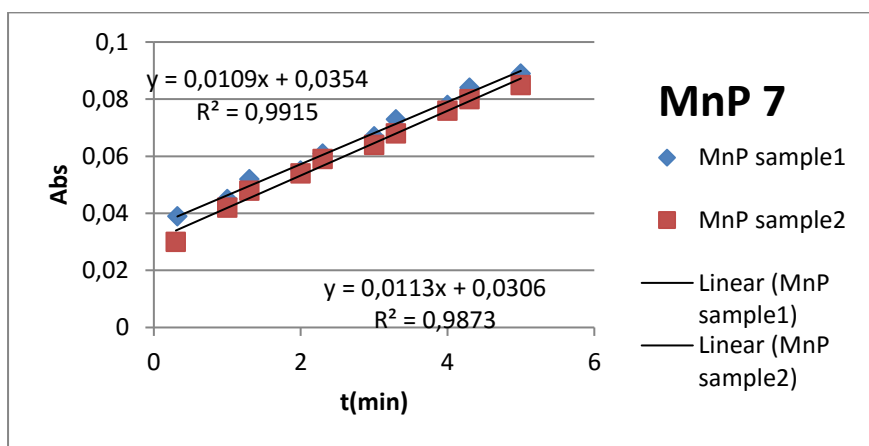
ΔΕΙΓΜΑ	ΗΜ/ΝΙΑ	t1	Abs1	t2	Abs 2	dA/dt	stdev abs	stdev U/I
6	6/7	0.44	0.055	0.3	0.027	0.07	0.020	0.316
		1	0.091	1	0.064	0.069	0.016	
		1.3	0.121	1.3	0.103	0.066	0.012	
		2	0.144	2	0.139	U/L	0.011	
		2.3	0.185	2.3	0.175	10.638	0.009	
		3	0.217	3	0.21	10.486	0.010	
		3.3	0.253	3.3	0.246	10.0304	0.012	
		4	0.288	4	0.282	Average U/I	0.011	
		4.3	0.345	4.3	0.291	10.385	0.028	
		5	0.365	5	0.355		0.014	
		t3	Abs3					
		0.29	0.016					
		0.59	0.062					
		1.3	0.097					
		2	0.123					
		2.32	0.167					
		3	0.197					
		3.3	0.23					
		4	0.266					
		4.3	0.306					
5	0.337							



Διάγραμμα 13: Διαγραμματική απεικόνιση αποτελεσμάτων απορρόφησης ως προς το χρόνο για τη μέτρηση ενεργότητας της υπεροξειδάσης που είναι εξαρτημένη του μαγγανίου στο δείγμα 6.

Πίνακας 20: Πρωτογενείς μετρήσεις απορρόφησης για την εύρεση ενεργότητας της υπεροξειδάσης που είναι εξαρτημένη του μαγγανίου στο δείγμα 7.

ΔΕΙΓΜΑ	ΗΜ/ΝΙΑ	t1	Abs1	t2	Abs 2	dA/dt	stdev abs	stdev U/l
7	8/7	0.32	0.039	0.3	0.03	0.011	0.006	0
		1	0.045	1	0.042	0.011	0.002	
		1.3	0.052	1.3	0.048	U/L	0.003	
		2	0.055	2	0.054	1.672	0.001	
		2.3	0.061	2.3	0.059	1.672	0.001	
		3	0.067	3	0.064	Average U/l	0.002	
		3.3	0.073	3.3	0.068	1.672	0.004	
		4	0.078	4	0.076		0.001	
		4.3	0.084	4.3	0.08		0.003	
		5	0.089	5	0.085		0.003	



Διάγραμμα 14: Διαγραμματική απεικόνιση αποτελεσμάτων απορρόφησης ως προς το χρόνο για τη μέτρηση ενεργότητας της υπεροξειδάσης που είναι εξαρτημένη του μαγγανίου στο δείγμα 7.

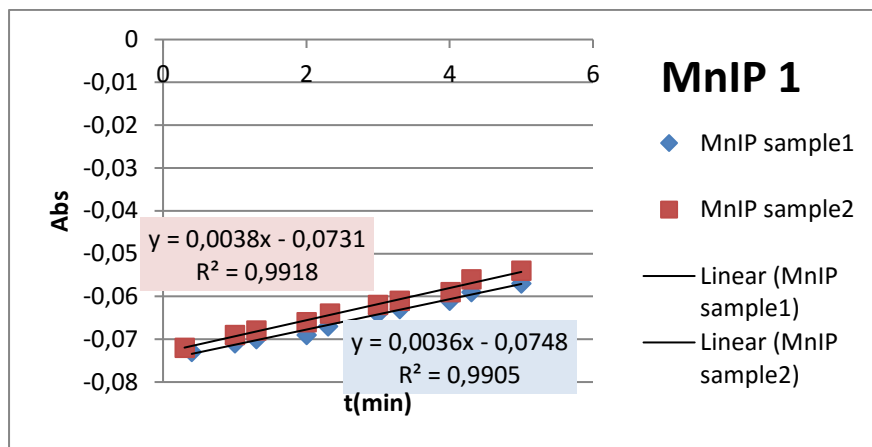
5. Μετρήσεις ενζυμικής ενεργότητας υπεροξειδάσης ανεξάρτητης του μαγγανίου

Ο υπολογισμός ενεργότητας της υπεροξειδάσης που είναι ανεξάρτητη του μαγγανίου έγινε με όμοιο τρόπο με τον υπολογισμό ενεργότητας της λακκάσης.

Πίνακας 21: Πρωτογενείς μετρήσεις απορρόφησης για την εύρεση ενεργότητας της υπεροξειδάσης που είναι ανεξάρτητη του μαγγανίου στο δείγμα 1.

ΔΕΙΓΜΑ	ΗΜ/ΝΙΑ	t1	Abs1	t2	Abs 2	dA/dt	stdev abs	stdev U/l
1	6/7	0.4	-0.073	0.3	-0.072	0.004	0.001	0.021
		1	-0.071	1	-0.069	0.004	0.001	
		1.3	-0.07	1.3	-0.068	U/L	0.001	
		2	-0.069	2	-0.066	0.578	0.002	
		2.3	-0.067	2.33	-0.064	0.547	0.002	

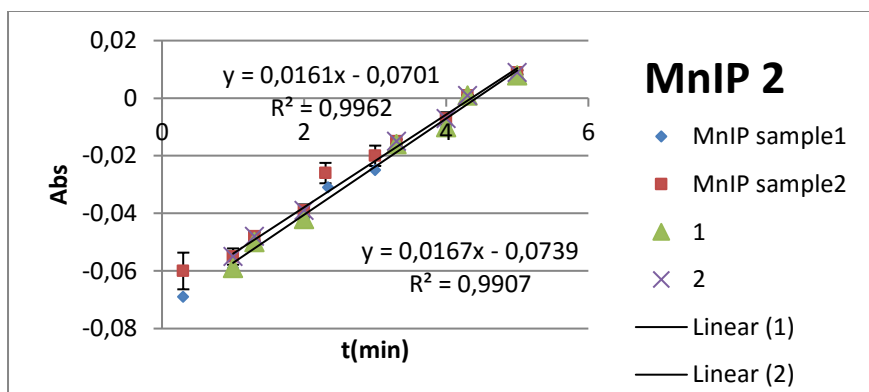
		3	-0.064	3	-0.062	Average U/l	0.001	
		3.3	-0.063	3.3	-0.061		0.562	0.001
		4	-0.061	4.01	-0.059			0.001
		4.3	-0.059	4.3	-0.056			0.002
		5	-0.057	5	-0.054			0.002



Διάγραμμα 15: Διαγραμματική απεικόνιση αποτελεσμάτων απορρόφησης ως προς το χρόνο για τη μέτρηση ενεργότητας της υπεροξειδάσης που είναι ανεξάρτητη του μαγγανίου στο δείγμα 1.

Πίνακας 22: Πρωτογενείς μετρήσεις απορρόφησης για την εύρεση ενεργότητας της υπεροξειδάσης που είναι ανεξάρτητη του μαγγανίου στο δείγμα 2.

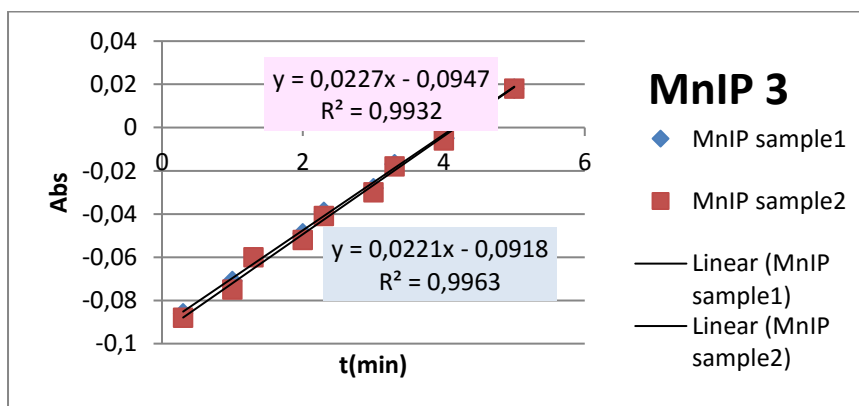
ΔΕΙΓΜΑ	ΗΜ/ΝΙΑ	t1	Abs1	t2	Abs 2	dA/dt	stdev abs	stdev U/l
2	6/7	0.3	-0.069	0.3	-0.06	0.016	0.006	0.107
		1	-0.059	1	-0.055	0.017	0.003	
		1.3	-0.05	1.3	-0.048	U/L	0.001	
		2	-0.042	2	-0.039	2.432	0.002	
		2.34	-0.031	2.3	-0.026	2.584	0.004	
		3	-0.025	3	-0.02	Average U/l	0.004	
		3.3	-0.016	3.3	-0.015	2.508	0.001	
		4	-0.01	4	-0.007		0.002	
		4.3	0.001	4.3	0.001		0.000	
		5	0.008	5	0.009		0.001	



Διάγραμμα 16: Διαγραμματική απεικόνιση αποτελεσμάτων απορρόφησης ως προς το χρόνο για τη μέτρηση ενεργότητας της υπεροξειδάσης που είναι ανεξάρτητη του μαγγανίου στο δείγμα 2.

Πίνακας 23: Πρωτογενείς μετρήσεις απορρόφησης για την εύρεση ενεργότητας της υπεροξειδάσης που είναι ανεξάρτητη του μαγγανίου στο δείγμα 3.

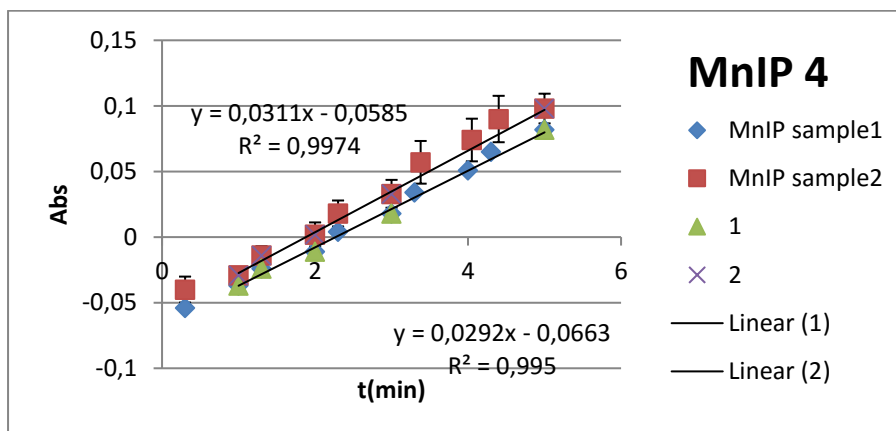
ΔΕΙΓΜΑ	ΗΜ/ΝΙΑ	t1	Abs1	t2	Abs 2	dA/dt	stdev abs	stdev U/I
3	6/7	0.3	-0.086	0.3	-0.088	0.023	0.001	0.064
		1	-0.071	1	-0.075	0.022	0.003	
		1.3	-0.06	1.3	-0.06	U/L	0.000	
		2	-0.049	2	-0.052	3.450	0.002	
		2.3	-0.039	2.3	-0.041	3.359	0.001	
		3	-0.028	3	-0.03	Average U/I	0.001	
		3.3	-0.017	3.3	-0.018	3.404	0.001	
		4.01	-0.005	4	-0.006		0.001	
		4.3	0.006	4.3	0.006		0.000	
		5	0.018	5	0.018		0.000	



Διάγραμμα 17: Διαγραμματική απεικόνιση αποτελεσμάτων απορρόφησης ως προς το χρόνο για τη μέτρηση ενεργότητας της υπεροξειδάσης που είναι ανεξάρτητη του μαγγανίου στο δείγμα 3.

Πίνακας 24: Πρωτογενείς μετρήσεις απορρόφησης για την εύρεση ενεργότητας της υπεροξειδάσης που είναι ανεξάρτητη του μαγγανίου στο δείγμα 4.

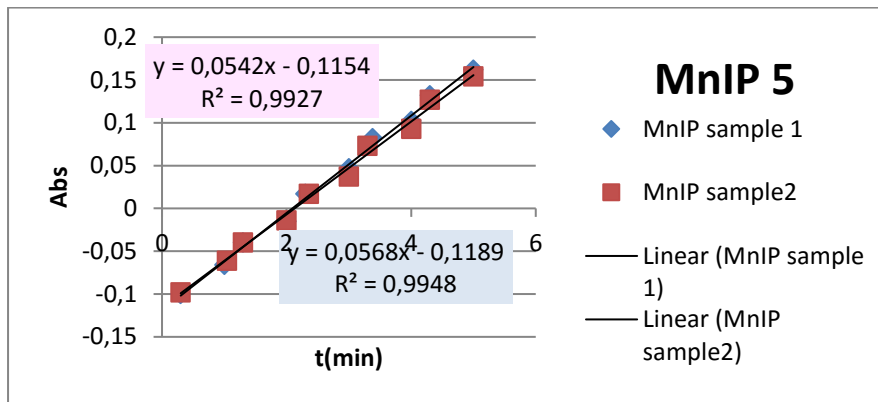
ΔΕΙΓΜΑ	HM/NIA	t1	Abs1	t2	Abs 2	dA/dt	stdev abs	stdev U/I
4	6/7	0.3	-0.054	0.3	-0.04	0.031	0.010	0.215
		1	-0.037	1	-0.029	0.029	0.006	
		1.3	-0.024	1.3	-0.014	U/L	0.007	
		2	-0.011	2	0.002	4.711	0.009	
		2.3	0.004	2.3	0.018	4.407	0.010	
		3	0.018	3	0.033	average	0.011	
		3.3	0.034	3.38	0.057	4.559	0.016	
		4	0.051	4.05	0.074		0.016	
		4.3	0.065	4.4	0.09		0.018	
		5	0.082	5	0.098		0.011	



Διάγραμμα 18: Διαγραμματική απεικόνιση αποτελεσμάτων απορρόφησης ως προς το χρόνο για τη μέτρηση ενεργότητας της υπεροξειδάσης που είναι ανεξάρτητη του μαγγανίου στο δείγμα 4.

Πίνακας 25: Πρωτογενείς μετρήσεις απορρόφησης για την εύρεση ενεργότητας της υπεροξειδάσης που είναι ανεξάρτητη του μαγγανίου στο δείγμα 5.

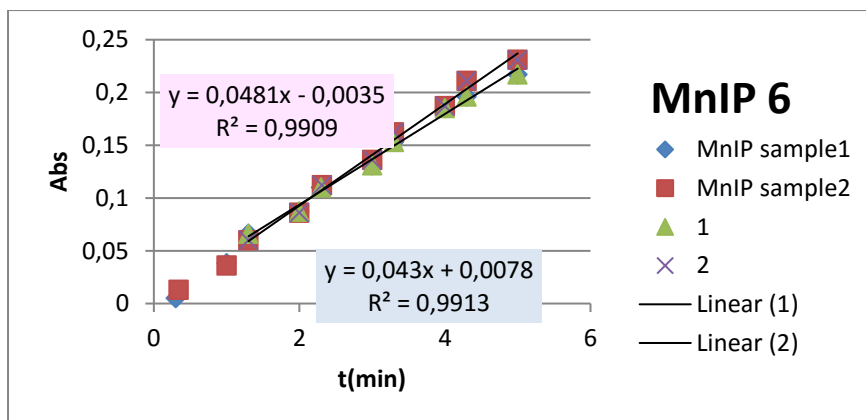
ΔΕΙΓΜΑ	HM/NIA	t1	Abs1	t2	Abs 2	dA/dt	stdev abs	stdev U/I
5	6/7	0.3	-0.1	0.3	-0.098	0.054	0.001	0.279
		1	-0.066	1.04	-0.061	0.057	0.004	
		1.3	-0.04	1.3	-0.04	U/L	0.000	
		2	-0.015	2	-0.014	8.237	0.001	
		2.3	0.017	2.36	0.017	8.632	0.000	
		3	0.047	3	0.037	Average U/I	0.007	
		3.38	0.082	3.3	0.073	8.435	0.006	
		4	0.102	4	0.093		0.006	
		4.3	0.132	4.3	0.127		0.004	
		5	0.162	5	0.154		0.006	



Διάγραμμα 19: Διαγραμματική απεικόνιση αποτελεσμάτων απορρόφησης ως προς το χρόνο για τη μέτρηση ενεργότητας της υπεροξειδάσης που είναι ανεξάρτητη του μαγγανίου στο δείγμα 5.

Πίνακας 26: Πρωτογενείς μετρήσεις απορρόφησης για την εύρεση ενεργότητας της υπεροξειδάσης που είναι ανεξάρτητη του μαγγανίου στο δείγμα 6.

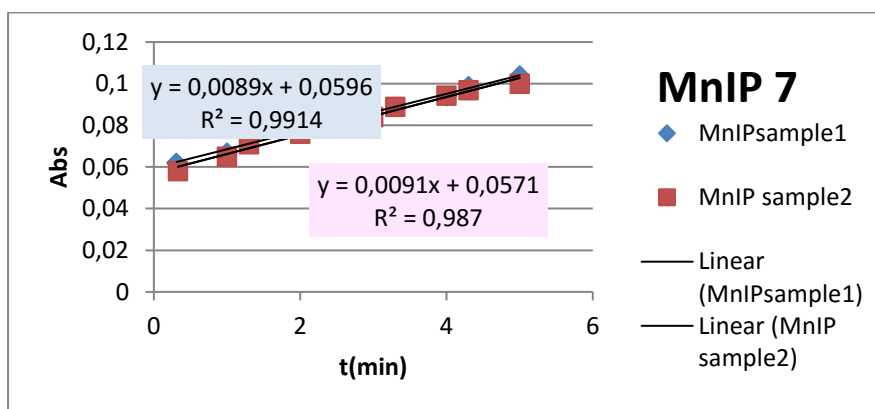
ΔΕΙΓΜΑ	HM/NIA	t1	Abs1	t2	Abs 2	dA/dt	stdev abs	stdev U/I
6	6/7	0.3	0.005	0.34	0.013	0.048	0.006	0.548
		1	0.038	1	0.036	0.043	0.001	
		1.3	0.066	1.3	0.06	U/L	0.004	
		2	0.087	2	0.086	7.310	0.001	
		2.3	0.11	2.31	0.112	6.535	0.001	
		3	0.131	3	0.136	Average U/I	0.004	
		3.3	0.153	3.3	0.162	6.922	0.006	
		4	0.185	4	0.187		0.001	
		4.3	0.196	4.3	0.211		0.011	
		5	0.217	5	0.231		0.010	



Διάγραμμα 20: Διαγραμματική απεικόνιση αποτελεσμάτων απορρόφησης ως προς το χρόνο για τη μέτρηση ενεργότητας της υπεροξειδάσης που είναι ανεξάρτητη του μαγγανίου στο δείγμα 6.

Πίνακας 27: Πρωτογενείς μετρήσεις απορρόφησης για την εύρεση ενεργότητας της υπεροξειδάσης που είναι ανεξάρτητη του μαγγανίου στο δείγμα 7.

ΔΕΙΓΜΑ	HM/NIA	t1	Abs1	t2	Abs 2	dA/dt	stdev abs	stdev U/I
7	8/7	0.31	0.062	0.33	0.058	0.009	0.003	0.021
		1	0.067	1	0.065	0.009	0.001	
		1.33	0.074	1.3	0.071	U/L	0.002	
		2	0.077	2	0.076	1.353	0.001	
		2.3	0.081	2.3	0.079	1.383	0.001	
		3	0.085	3	0.084	Average U/I	0.001	
		3.3	0.089	3.3	0.089	1.368	0.000	
		4	0.094	4	0.0943		0.000	
		4.3	0.099	4.3	0.097		0.001	
		5	0.104	5	0.1		0.003	



Διάγραμμα 21: Διαγραμματική απεικόνιση αποτελεσμάτων απορρόφησης ως προς το χρόνο για τη μέτρηση ενεργότητας της υπεροξειδάσης που είναι ανεξάρτητη του μαγγανίου στο δείγμα 7.

6. Μετρήσεις ενζυμικής ενεργότητας β-γλυκοζιδάσης

Για τον προσδιορισμό ενεργότητας της β-γλυκοζιδάσης κατά τη μέτρηση απορροφήσεων χρησιμοποιήθηκαν δύο τυφλά διαλύματα, το ένα περιείχε ποσότητα υποστρώματος και ρυθμιστικό διάλυμα, με το οποίο και μηδενίστηκε το όργανο και το άλλο περιείχε ότι ακριβώς και το διάλυμα αντίδρασης, υποβλήθηκε στην ίδια διαδικασία, με τη διαφορά ότι περιείχε βρασμένο ενζυμικό παρασκεύασμα. Τα αποτελέσματα των απορροφήσεων φαίνονται στον παρακάτω πίνακα (**πίνακας 28α**). Οι τιμές ΔAbs υπολογίστηκαν από τη διαφορά των απορροφήσεων του διαλύματος αντίδρασης με το μέσο όρο των απορροφήσεων των τυφλών διαλυμάτων. Η μετατροπή της απορρόφησης σε συγκέντρωση γλυκόζης πραγματοποιήθηκε βάση του **διαγράμματος 3** στο **ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ 1**. Στη συνέχεια ο υπολογισμός της ενεργότητας της β-γλυκοζιδάσης στηρίχθηκε στον ακόλουθο τύπο:

$$\frac{\text{Units enz}}{\text{ml cult}} = \frac{\mu\text{mol (gluc)}}{\text{ml}} * \frac{\text{Venz}}{\text{Vol}}$$

Πίνακας 28α: Πρωτογενείς μετρήσεις απορρόφησης για την εύρεση ενεργότητας της β-γλυκοζιδάσης.

HM/NIA	αρ. Δείγμ.	abs1	abs2	blank	Δabs 1	Δabs 2	stdev abs
16/6	1	0.006	0.008	0.002	0.006	0.008	0.001
22/6	2	0.004	0.004	0.003	0.004	0.004	0.000
22/6	3	0.002	0.003	0.002	0.002	0.003	0.000
28/6	4	0.023	0.020	0.014	0.023	0.020	0.002
1/7	5	0.070	0.061	0.045	0.070	0.061	0.006
5/7	6	0.067	0.061	0.058	0.067	0.061	0.004
8/7	7	0.076	0.079	0.068	0.076	0.079	0.002
				av. Blank	0.027		

Πίνακας 28β: Μετατροπή στοιχείων απορρόφησης σε μονάδες ενεργότητας της β-γλυκοζιδάσης.

HM/NIA	αρ. Δείγμ	μmol 1/ml	μmol 2/ml	av. μmol/ml	stdev μmol/ml	U1 στα 40ml E	U2 στα 40ml E	av.U στα 40ml E	stdev U στα 40mlE
16/6	1	0.032	0.079	0.056	0.033	6.12E-07	9.83E-07	7.98E-07	2.62E-07
22/6	2	0.037	0.051	0.044	0.010	1.86E-07	1.67E-07	1.76E-07	1.31E-08
22/6	3	0.034	0.030	0.032	0.003	5.57E-08	1.86E-08	3.71E-08	2.62E-08
28/6	4	0.197	0.323	0.260	0.089	1.67E-06	1.11E-06	1.39E-06	3.94E-07
1/7	5	0.632	0.984	0.808	0.248	4.64E-06	2.97E-06	3.80E-06	1.18E-06
5/7	6	0.815	0.941	0.878	0.089	1.67E-06	5.57E-07	1.11E-06	7.87E-07
8/7	7	0.956	1.068	1.012	0.079	1.48E-06	2.04E-06	1.76E-06	3.94E-07

Το "E" συμβολίζει το ενζυμικό παρασκεύασμα.

Πίνακας 29

MB glucose (g/mol)	Venz(ml)	Vol (ml)	tanτ(min)
180.16	0.01	1.01	30

7. Μετρήσεις ενζυμικής ενεργότητας β- ξυλοζιδάσης

Οι υπολογισμοί ενεργότητας της β-ξυλοζιδάσης πραγματοποιήθηκαν με όμοιο τρόπο με τους υπολογισμούς ενεργότητας της β-γλυκοζιδάσης. Ωστόσο η μετατροπή της απορρόφησης σε συγκέντρωση rNP έγινε με τη βοήθεια του **διαγράμματος 4** στο **ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ 1**. Η σχετική απόκλιση στα αποτελέσματα ενεργότητας στον **πίνακα 30β** είναι αυτή που χρησιμοποιήθηκε στα διαγράμματα αποτελεσμάτων ενεργότητας που βρίσκονται στην ενότητα «**Αποτελέσματα - συμπεράσματα**».

Πίνακας 30α: Πρωτογενείς μετρήσεις απορρόφησης για την εύρεση ενεργότητας της β-ξυλοζιδάσης.

HM/NIA	αρ. Δείγμ.	abs1	abs2	blank	Δabs 1	Δabs 2	stdev ΔAbs	average Δabs
16/6	1	0.210	0.234	0.300	0.117	0.093	0.017	0.105
22/6	2	0.075	0.105	0.022	0.252	0.222	0.021	0.063
	2	0.082	0.102	0.034	0.245	0.225	0.014	

22/6	3	0.489	0.443	0.398	0.162	0.116	0.033	0.139
28/6	4	0.329	0.339	0.544	0.002	0.012	0.007	0.007
1/7	5	0.207	0.246	0.533	0.120	0.081	0.028	0.101
6/7	6	0.356	0.368	0.503	0.029	0.041	0.008	0.035
8/7	7	0.524	0.539	0.285	0.197	0.212	0.011	0.204

Πίνακας 30β: Μετατροπή στοιχείων απορρόφησης σε μονάδες ενεργότητας της β-ξυλοζιδάσης.

HM/NIA	αρ. Δείγμ.	μmol/ml 1	μmol/ml 2	av. μmol/ml	stdev μmol/ml	U1 στα 40ml E	U2 στα 40ml E	stdev U στα 40ml E
16/6	1	2.251	2.508	2.379	0.182	6.00E-04	6.69E-04	4.85E-05
22/6	2	0.804	1.125	0.975	0.158	2.24E-04	2.96E-04	5.05E-05
	2	0.879	1.093					
22/6	3	5.241	4.748	4.995	0.349	1.40E-03	1.27E-03	9.30E-05
28/6	4	3.526	3.633	3.580	0.076	9.40E-04	9.69E-04	2.02E-05
1/7	5	2.219	2.637	2.428	0.296	5.92E-04	7.03E-04	7.88E-05
6/7	6	3.816	3.944	3.880	0.091	1.02E-03	1.05E-03	2.43E-05
8/7	7	5.616	5.777	5.697	0.114	1.50E-03	1.54E-03	3.03E-05

Το "Ε" συμβολίζει το ενζυμικό παρασκεύασμα.

Πίνακας 31

MB pNP (g/mol)	Venz(ml)	Vol (ml)	tanv(min)
139.11	0.2	1	30

8. Μετρήσεις ενζυμικής ενεργότητας κυτταρινασών

Οι υπολογισμοί ενεργότητας της κυτταρινάσης πραγματοποιήθηκαν με όμοιο τρόπο με τους υπολογισμούς ενεργότητας της β-γλυκοζιδάσης. Ωστόσο η μετατροπή της απορρόφησης σε συγκέντρωση γλυκόζης έγινε με τη βοήθεια του **διαγράμματος 2** στο **ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ 1**. Η σχετική απόκλιση στα αποτελέσματα ενεργότητας στον **πίνακα 32β** είναι αυτή που χρησιμοποιήθηκε στα διαγράμματα αποτελεσμάτων ενεργότητας που βρίσκονται στην ενότητα «**Αποτελέσματα - συμπεράσματα**».

Πίνακας 32α: Πρωτογενείς μετρήσεις απορρόφησης για την εύρεση ενεργότητας των κυτταρινασών.

HM/NIA	αρ. Δείγμ.	abs1	abs2	blank	Δabs 1	Δabs 2	average Δabs	Stdev Abs
16/6	1	0.223	0.257	0.308	-0.032	0.002	-0.015	0.024
22/6	2	0.317	0.314	0.255	0.062	0.059	0.062	0.004
		0.323	0.314	0.305	0.068	0.059		
22/6	3	0.322	0.284	0.312	0.067	0.029	0.048	0.027
28/6	4	0.312	0.322	0.336	0.057	0.067	0.062	0.007
1/7	5	0.292	0.274	0.184	0.037	0.019	0.028	0.013
6/7	6	0.267	0.257	0.236	0.012	0.002	0.007	0.007
8/7	7	0.079	0.086	0.106	-0.176	-0.169	-0.173	0.005

Πίνακας 32β: Πρωτογενείς μετρήσεις απορρόφησης για την εύρεση ενεργότητας των κυτταρινασών.

ΗΜ/ΝΙ Α	αρ. Δείγμ	μmol/ml 1	μmol/ml 2	Stdev μmol/ml	av.Υ στα 40ml Ε	U1 στα 40ml Ε	U2 στα 40ml Ε	stdevU στα 40ml Ε
16/6	1	1.670E+00	1.925E+00	1.801E-01	1.20E-03	1.11E-03	1.28E-03	1.20E-04
22/6	2	2.375E+00	2.352E+00	3.178E-02	1.58E-03	1.60E-03	1.57E-03	2.12E-05
		2.420E+00	2.352E+00					
22/6	3	2.412E+00	2.127E+00	2.013E-01	1.51E-03	1.61E-03	1.42E-03	1.34E-04
28/6	<u>4</u>	2.337E+00	2.412E+00	5.297E-02	1.58E-03	1.56E-03	1.61E-03	3.53E-05
1/7	<u>5</u>	2.187E+00	2.052E+00	9.534E-02	1.41E-03	1.46E-03	1.37E-03	6.36E-05
6/7	6	2.000E+00	1.925E+00	5.297E-02	1.31E-03	1.33E-03	1.28E-03	3.53E-05
8/7	7	5.918E-01	6.442E-01	3.708E-02	4.12E-04	3.95E-04	4.29E-04	2.47E-05

Το "Ε" συμβολίζει το ενζυμικό παρασκεύασμα.

Βιβλιογραφία

1. Anwar,Z., Gulfraz,M., Irshad,M., 2014. Agro-industrial lignocellulosic biomass a key to unlock the future bio-energy: A brief review. *Journal of radiation researce and applied sciences* 7, 163-173
2. Bansal, N., Tewari, R., Gupta,J.,K., Soni,S.,K., Soni,R., 2011. A novel strain *Aspergillus niger* producing a cocktail of indystrial depolymerising enzymes for production of second generation biofuels. *BioRes* 6, 552-569
3. Bansal,N., Tewari,R., Soni,R., Soni,S.,K., 2012. Production of cellulases from *Aspergillus niger* NS-2 in solid state fermentation on agricultural and kitchen waste residues. *Waste Manage* 33 (7), 1341-1346
4. Behera, S., Arora, R., Nandhagopal, N., Kumar, S., 2014. Importance of chemical pretreatment for bioconversion of lignocellulosic biomass. *Renew. Sust. Energ. Rev.* 36, 91–106.
5. Bourbonnais,R. and M.G. Paice, 1990. Oxidation of non-phenolic substrates: An expanded role for laccase in lignin biodegradation. *FEBS Letters* 267(1), 99-102
6. Chakar, F.,S., Ragauskas, A.,J., 2004. Review of current and future softwood kraft lignin process chemistry. 6th International Lignin Institute conference, *Industrial Crops and Products* Vol. 20(2), 131–141, doi:10.1016/j.indcrop.2004.04.016
7. Dashtban,M.,Schaft,H.,Qin,W.,2009. Fungal Bioconversion f Lignocellulosic Residues; Opportunities & Perspectives. *Int Biol Sci* 2009; 5(9),578-595. Doi: 10.7150/ijbs.5.578. Available from: <http://www.ijbs.com/v05p0578.htm>
8. Gao, F., Gao, L., Zhang, D., Ye, N., Chen, S., Li, D., 2015. Enhanced hydrolysis of *Macrocystis pyrifera* by integrated hydroxyl radicals and hot water pretreatment. *Bioresour. Technol.* 179, 490–496
9. Ghose T.K., (1987) Measurement of cellulase activity. *Pure and Applied Chemistry* 59(2), p.257-268
10. Godliving,Y., Mtui,S., 2009. Recent advances in pretreatment of lignocellulosic wastes and production of value added products. *African Journal of Biotechnology* Vol. 8 (8), pp. 1398-1415, 20 April, 2009
11. HARHANGI,H.,R., Steenbakkers, P.,J.,M., AKHMANOVA,A., JETTEN,M.,S.,M., VAN DER DRIFT, OP DEN CAMP,C., Huub,J.,M., 2002. A highly expressed family 1 β - glucosidase with transglycosylation capacity from the anaerobic fungus *Piromyces* sp. E2. *Biochimica et Biophysica Acta* vol. 1574(3), 293-303
12. He,F. (2011). Bradford Protein Assay. *Bio-protocol* Bio 101, 45. Available from:<http://www.bio-protocol.org/e45>
13. Healey,A.,L, Lee,D.,J, Furtado,A., Simmons,B.,A., Henry,R.,J., 2015. Efficient Eucalypt Cell Wall Deconstruction and Conversion for Sustainable Lignocellulosic Biofuels. *Front. Bioeng. Biotechnol.* 3(190),doi: 10.3389/fbioe.2015.00190
14. Janveja,C., Rana,S.,S., Soni,S.,K., 2013. Kitchen Waste Residues as Potential Renewable Biomass Resources for the Production of Multiple Fungal Carbohydrases and Second Generation Bioethanol, *Journal of Technology Innovations In Renewable Energy* 2(2), 186-200
15. Jeng,W.,J., Wang,N.,C., Lin,M.,H., Lin,C.,T., Liaw,Y.,C., Chang,W.,J., Liu,C., Liang,P.,H., Wang,A.,J., 2011. Structural and functional analysis of three β -glucosidases from bacterium *Clostridium cellulovorans*, fungus *Trichoderma reesei* and termite *Neotermes koshunensis*. *Journal of Structural Biology*, Vol.173(1), 46-56

16. Krzyzaniaka, M., Stolarski, M., J., Waliszewska, B., Szczukowski, S., Tworkowski, J., Załuski, D., Snieg, M., 2014. Willow biomass as feedstock for an integrated multi-product biorefinery. *Industrial Crops and Products* 58, 230–237
17. Limayem, A., Ricke, S., C., 2012. Lignocellulosic biomass for bioethanol production: Current perspectives, potential issues and future prospects”, *Progress in Energy and Combustion Science* 38, 449-467
18. Liu, W., Jiang, H., Yu, H., 2015. Thermochemical conversion of lignin to functional materials: a review and future directions. *Green Chemistry* 11
19. Merino, S., T., Cherry, J., 2007. Progress and challenges in enzyme development for biomass utilization. *Adv Biochem Eng Biotechnol* 108, 95-120
20. Nanda, S., Azargohar, R., Dalai, A., K., Kozinski, J., A., 2015. An assessment on the sustainability of lignocellulosic biomass for biorefining. *Renewable and Sustainable Energy Reviews* 50, 925–941
21. Nasir, M., Hashim, R., Sulaiman, O., Nordin, N., A., Lamaming, J., Asim, M., 2015, Laccase, an Emerging Tool to Fabricate Green Composites: A Review. *Bioresources* 10(3), 6262-6284, DOI: 10.15376/biores.10.3.
22. Ngo, T. T., Lenhoff, H., M., 1980. A sensitive and versatile chromogenic assay for peroxidase and peroxidase-coupled reactions. *Analytical Biochemistry* 105(1), 389-397
23. Quiroz-Castañeda, R. E., Folch-Mallol, J. L., 2013. Hydrolysis of Biomass Mediated by Cellulases for the Production of Sugars, Sustainable Degradation of Lignocellulosic Biomass - Techniques, Applications and Commercialization. Dr. Anuj Chandel (Ed.), InTech, DOI: 10.5772/53719. Available from: <http://www.intechopen.com/books/sustainable-degradation-of-lignocellulosic-biomass-techniques-applications-and-commercialization/hydrolysis-of-biomass-mediated-by-cellulases-for-the-production-of-sugars>
24. Ravindran, R., Jaiswal, A., K., 2016. A comprehensive review on pre-treatment strategy for lignocellulosic food industry waste: Challenges and opportunities, *Bioresource Technology* 199, 92–102
25. Rebelo de Mira, R., Kroeze, C., 2006. Greenhouse gas emissions from willow-based electricity: a scenario analysis for Portugal and The Netherlands. *Energy Policy* 34 , 1367–1377
26. Ride, J. P., Drysdale, R. B., 1972. A rapid method for the chemical estimation of filamentous fungi in plant tissue”, *Physiological Plant Pathology* 2, 7-15
27. Sánchez, C., 2009. Lignocellulosic residues: Biodegradation and bioconversion by fungi. *Biotechnology Advances* 27, 185–194
28. Shrestha, P., Rasmussen, M., Khanal, S., K., Pometto, A., L., Van Leeuwen, J., 2008. Solid-substrate fermentation of corn fiber by *Phanerochaete chrysosporium* and subsequent fermentation of hydrolysate into ethanol. *J Agric Food Chem* 56, 3918–24.
29. Shuler, M. L., Kargi, F., 2005. ΜΗΧΑΝΙΚΗ ΒΙΟΔΙΕΡΓΑΣΙΩΝ Βασικές Έννοιες, ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΑΚΕΣ ΕΚΔΟΣΕΙΣ Ε.Μ.Π., 209-213
30. Stephenson, A., L., Dupree, P., Scott, S., A., J. S. Dennis, 2010. The environmental and economic sustainability of potential bioethanol from willow in the UK. *Bioresource Technology* 101, 9612–9623
31. Tomaselli Scotti, C., Vergoignan, C., Feron, G., Durand, A., 2000. Glucosamine measurement as indirect method for biomass estimation of *Cunninghamella elegans* grown in solid state cultivation conditions, *Biochemical Engineering Journal* 7(1), 1-5
32. Van Dyk, J., S., Pletscke, B., I., 2012. A review of lignocellulose bioconversion using enzymatic hydrolysis and synergistic cooperation between enzymes- Factors affecting enzymes, conversion and synergy. *Biotechnology Advances*, 30, 1458-1480
33. Varnai, A., Siika-aho, M., Viikari, L., 2010. Restriction of the enzymatic hydrolysis of steam-pretreated spruce by lignin and hemicellulose. *Enzyme Microb Technol* 46, 185–93

34. Wagner,R., 2013. Microbial Degradation of Lignocellulosic Biomass, Sustainable Degradation of Lignocellulosic Biomass – Techniques. Applications and Commercialization, Dr. Anuj Chandel (Ed.), InTech, DOI: 10.5772/54325
35. Wan,C., Li,Y., 2012. Fungal pretreatment of lignocellulosic biomass. *Biotechnology advances* 30, 1447-1457
36. Wanga,F., Xie-a,H., Chen-a,W., Wangb,E., Guang Du c,F., Song,A., 2013. Biological pretreatment of corn stover with ligninolytic enzyme for high efficient enzymatic hydrolysis. *Bioresource Technology* 144, 572–578
37. Zerva,A., Savvides,A.,L., Katsifas,E.,A., Karagouni,A., Hatzinikolaou,D.,G., 2014. Evaluation of *Paecilomyces variotii* potential in bioethanol production from lignocellulose through consolidated bioprocessing, *Bioresource Technology* 162, 294-299.
38. Zhang,Y.,HP., Lynd,LR., 2004. Toward an aggregated understanding of enzymatic hydrolysis of cellulose: noncomplexed cellulase systems. *Biotechnol Bioeng* 88(7), 797–824
39. Zhou,C., Wu,Q., 2012. Recent Development in Applications of Cellulose Nanocrystals for Advanced Polymer-Based Nanocomposites by Novel Fabrication Strategies, *Nanocrystals - Synthesis, Characterization and Applications*. Dr. Sudheer Neralla (Ed.), InTech, DOI: 10.5772/48727. Available from: <http://www.intechopen.com/books/nanocrystals-synthesis-characterization-and-applications/recent-development-in-applications-of-cellulose-nanocrystals-for-advanced-polymer-based-nanocomposit>
40. Δρίτσα,Β., 2006. Μελέτη της αποδόμηση τοξικών ουσιών με λιγνινολυτικούς μύκητες, *Σχολή Χημικών Μηχανικών, Εθνικό Μετσόβιο Πολυτεχνείο*, 186-189
41. Κέκκος,Δ., Καλογεράς,Ε., 2010. ΣΤΟΙΧΕΙΑ ΒΙΟΧΗΜΙΚΗΣ ΜΗΧΑΝΙΚΗΣ, ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΑΚΕΣ ΕΚΔΟΣΕΙΣ Ε.Μ.Π., 39-42
42. Χριστακόπουλος,Π., Τόπακας,Ε., 2013. ΒΙΟΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑ ΠΑΡΑΓΩΓΗΣ ΒΙΟΚΑΥΣΙΜΩΝ, ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΑΚΕΣ ΕΚΔΟΣΕΙΣ Ε.Μ.Π.
43. <http://www.celignis.com/chemistry.php>
44. <http://www.chemeng.ntua.gr/courses/bioenv/files/LAB%20Manual%202013.pdf>
45. <https://commons.wikimedia.org/wiki/File:Lignin.png>