



**ΕΘΝΙΚΟ ΜΕΤΣΟΒΙΟ ΠΟΛΥΤΕΧΝΕΙΟ**  
ΣΧΟΛΗ ΧΗΜΙΚΩΝ ΜΗΧΑΝΙΚΩΝ  
ΤΟΜΕΑΣ IV: ΣΥΝΘΕΣΗΣ ΚΑΙ ΑΝΑΠΤΥΞΗΣ  
ΒΙΟΜΗΧΑΝΙΚΩΝ ΔΙΑΔΙΚΑΣΙΩΝ



# ΔΙΠΛΩΜΑΤΙΚΗ ΕΡΓΑΣΙΑ

Βαραμογιάννη – Μαματσή Δέσποινα

«Αξιοποίηση  
λιγνοκυτταρινούχου  
βιομάζας για την  
παραγωγή  
προϊόντων  
προστιθέμενης  
αξίας»

Επιβλέπων Καθηγητής:

Τόπακας Ευάγγελος, Αναπληρωτής  
Καθηγητής Ε.Μ.Π.

**Αθήνα, 2019**



# Ευχαριστίες

Η παρούσα διπλωματική εργασία εκπονήθηκε στο Εργαστήριο Βιοτεχνολογίας της Σχολής των Χημικών Μηχανικών του Εθνικού Μετσόβιου Πολυτεχνείου υπό την επίβλεψη του Αναπληρωτή Καθηγητή, κύριου Τόπακα Ευάγγελου. Στα πλαίσια αυτά, θα ήθελα να ευχαριστήσω όλους όσους συνέβαλαν στην διεξαγωγή και ολοκλήρωση της διπλωματικής αυτής εργασίας.

Αρχικά, ιδιαίτερες ευχαριστίες θα απονεμηθούν στον υπεύθυνο καθηγητή μου, κύριο Τόπακα Ευάγγελο, για την ευκαιρία που μου έδωσε να εργαστώ στο εργαστήριο Βιοτεχνολογίας και την εμπιστοσύνη που μου έδειξε κατά τη διεξαγωγή της εργασίας.

Στη συνέχεια, θα ήθελα να ευχαριστήσω θερμά τη διδάκτορα Καρναούρη Ανθή, της οποίας η βοήθεια και καθοδήγηση υπήρξε κάτι παραπάνω από πολύτιμη κατά την επιτέλεση της παρούσας εργασίας. Το γνωστικό της επίπεδο και η εργαστηριακή της εμπειρία της υπήρξαν πυλώνες στο να κατανοήσω το αντικείμενο της Βιοτεχνολογίας, και να αποκτήσω τριβή με τον εργαστηριακό χώρο.

Ακόμη, θερμές ευχαριστίες θα ήθελα να αποδώσω στην υποψήφια διδάκτορα Ασημακοπούλου Γεωργία, για το συνεχές ενδιαφέρον και τη βοήθειά της καθ' όλη τη διάρκεια της παρούσας εργασίας.

Δεν μπορώ να παραλείψω, φυσικά, τη συμβολή και βοήθεια όλων των μελών και παιδιών του Εργαστηρίου Βιοτεχνολογίας. Δεδομένου της έλλειψης της εργαστηριακής μου πείρας υπήρξαν πολύ πρόθυμοι και βοηθητικοί, και τους ευχαριστώ για αυτό.

Τέλος, θα ήθελα πάνω απ' όλα να ευχαριστήσω την οικογένειά μου και τους φίλους μου, για την υπομονή και κατανόηση που έδειξαν κατά την εκτέλεση της διπλωματικής μου εργασίας, και η συμβολή των οποίων υπήρξε καθοριστική στο να φτάσω έως το πέρας της.

Βαραμογιάννη – Μαματσή Δέσποινα,

Αθήνα 2019

## Περίληψη

Η λιγνοκυτταρινούχα βιομάζα, η πιο άφθονη και ανανεώσιμη πηγή άνθρακα παγκοσμίως, έχει κεντρίσει ιδιαίτερα το ενδιαφέρον τα τελευταία χρόνια ως πρώτη ύλη για την παραγωγή βιοκαυσίμων και προϊόντων προστιθέμενης αξίας. Ωστόσο, η πολύπλοκη και σύνθετη δομή της συνιστά εμπόδιο στην άμεση βιομετατροπή και αξιοποίησή της. Η προκατεργασία αποτελεί το πρώτο βήμα για να ξεπεραστεί η πολυπλοκότητα και η ανθεκτικότητα της λιγνοκυτταρινούχου βιομάζας, καθιστώντας την κυτταρίνη, ευάλωτη στην ενζυμική υδρόλυση. Κατά την ενζυμική υδρόλυση, τα υδατανθρακικά πολυμερή μετατρέπονται με τη δράση εξειδικευμένων ενζύμων σε μονομερή σάκχαρα, που μπορούν να χρησιμοποιηθούν ως τροφοδοσία για διάφορες ζυμώσεις. Οι ζυμώσεις μπορούν να πραγματοποιηθούν είτε ταυτόχρονα με την ενζυμική υδρόλυση (SSF) είτε ξεχωριστά (SHF).

Σκοπός της παρούσας διπλωματικής εργασίας είναι η παραγωγή προϊόντων προστιθέμενης αξίας, όπως γαλακτικό οξύ και ω-3 λιπαρά οξέα μέσω ζύμωσης, από σάκχαρα προερχόμενα από ξύλο οξιάς και πεύκου. Τα δύο αυτά προϊόντα έχουν κεντρίσει ιδιαίτερα το ενδιαφέρον της παγκόσμιας αγοράς, λόγω των δυνητικών τους εφαρμογών στη βιομηχανία των τροφίμων ως συστατικά ή συμπληρώματα διατροφής. Όσον αφορά το γαλακτικό οξύ, πολλά υποσχόμενη είναι η εφαρμογή του ως μονομερές για την παραγωγή ενός βιοδιασπώμενου και βιοσυμβατού πολυμερούς, του πολυγαλακτικού οξέος (PLA). Όσον αφορά τα ω-3 λιπαρά οξέα, η παραγωγή εστιάζεται ως προς το εικοσιδυαεξαενοϊκό οξύ (22:6, DHA), λόγω των θεραπευτικών και ευεργετικών του ιδιοτήτων στην ανθρώπινη υγεία. Ως εκ τούτου, η εύρεση φθηνών, ανανεώσιμων πρώτων υλών για την παραγωγή τους καθίσταται μεγίστης σημασίας.

Σε πρώτο στάδιο, ξύλο οξιάς και πεύκου υπέστη προκατεργασία με τη μέθοδο της ήπιας οργανολυτικής οξειδωσης, σε ένα εύρος διαλυτών και συνθηκών θερμοκρασίας, πίεσης οξυγόνου και χρόνου. Τα προκατεργασμένα υποστρώματα ελέγχθηκαν ως προς την ικανότητα υδρόλυσής τους, και συσχέτιστηκε η επίδραση των διαφόρων συνθηκών προκατεργασίας στην απόδοση της σακχαροποίησης. Από αυτά, επιλέχθηκαν τα καλύτερα, ως δυνητικές πηγές άνθρακα για διεργασίες SSF και SHF, για την παραγωγή γαλακτικού οξέος και ω-3 λιπαρών αντίστοιχα.

Σε δεύτερο στάδιο, τα καλύτερα υποστρώματα χρησιμοποιήθηκαν ως στερεή τροφοδοσία για διεργασία SSF παραγωγής γαλακτικού οξέος από το βακτήριο γαλακτικού οξέος *Lactobacillus delbrueckii*. Ύστερα από 168 ώρες επώασης σε αναερόβιες συνθήκες, 44°C, pH=5.0, συγκέντρωση στερεών 9% w/v, και ενζυμικό φορτίο 9 mg/g υποστρώματος, η υψηλότερη απόδοση γαλακτικού οξέος που επιτεύχθηκε ήταν 74,41% κ.β. από προκατεργασμένο υπόστρωμα οξιάς, με συγκέντρωση γαλακτικού οξέος 63,49 g/L, και 45,57 % κ.β. από προκατεργασμένο υπόστρωμα πεύκου, με συγκέντρωση γαλακτικού οξέος 40,06 g/L.

Παράλληλα, σάκχαρα προερχόμενα από τα καλύτερα υποστρώματα χρησιμοποιήθηκαν ως υγρή τροφοδοσία για διεργασία SHF παραγωγής ω-3 λιπαρών οξέων από το ετερότροφο μικροφύκος *Cryptocodinium cohnii*. Το μικροφύκος ήταν ικανό να παράγει λιπαρά με 29,51% κ.β. DHA, με ανάπτυξη σε σάκχαρα προερχόμενα από υδρόλυση οξιάς. Σε ημιδιαλείποντος έργου διεργασία σε κωνικές φιάλες,

παρατηρήθηκε ενίσχυση της παραγωγής του DHA κατά 47,8%, με ποσοστά DHA που άγγιξαν το 43,5% κ.β. των συνολικών λιπαρών. Περαιτέρω, μελετήθηκε η ικανότητα ανάπτυξης και παραγωγής λιπαρών σε καλλιέργειες με καθαρά σάκχαρα, όπου το μικροφύκος έδειξε προτίμηση ως προς τη γλυκόζη, με το DHA να αποτελεί το  $34,88 \pm 6,93\%$  κ.β. των ολικών λιπαρών. Τα μικροφύκη ήταν ικανά να καταβολίζουν εκτός από τη γλυκόζη και άλλα σάκχαρα που υπάρχουν στη λιγνοκυτταρινούχα βιομάζα (ξυλόζη, αραβινόζη, μαννόζη), ενώ μικρή ποσότητα λιγνίνης έδειξε να ευνοεί την ανάπτυξη του μικροφύκου. Η παρουσία φουρανίων ανέδειξε παρεμποδιστική δράση στην ανάπτυξη και παραγωγή λιπαρών. Τέλος, η μείωση της συγκέντρωσης του αζώτου στο θρεπτικό μέσο, μείωσε την κυτταρική ανάπτυξη αλλά διέγειρε τη λιποσυσσώρευση, με το DHA να συνιστά το 40,21% κ.β. των λιπαρών.

# Abstract

Lignocellulosic biomass, the most abundant and renewable carbon source worldwide, has garnered a lot of interest as a raw material for the production of biofuels and other high-added value products through the past years. However, its complex and recalcitrant structure serves as an obstacle to its immediate bioconversion and utilization. Pretreatment stands to be the first step to overcome the complexity and recalcitrance of lignocellulosic biomass, rendering cellulose vulnerable to enzymatic hydrolysis. By this, specialized enzymes convert carbohydrate polymers into monomeric sugars, which can be further utilized as a feedstock for various fermentation processes. Fermentation can be either conducted simultaneously with enzymatic hydrolysis (SSF) or separately (SHF).

The main purpose of this diploma thesis is the production of high-added value products, such as lactic acid and omega-3 fatty acids, through fermentation processes, by using softwood and hardwood derived sugars as a carbon source. These two products have been of particular interest to the world market, due to their potential applications in the food industry as ingredients or supplements. As far as lactic acid is concerned, its application as a monomer in the production of a biodegradable and biocompatible polylactate polymer, PLA, is highly promising. For omega-3 fatty acids, production is mainly focused on the docosahexaenoic acid (22: 6, DHA), due to its therapeutic and beneficial properties in human health. Therefore, finding cheap, renewable raw materials for their production is of paramount importance.

As a first step, beech and pine wood solid pulps, pretreated by a mild oxidative organosolv method in a range of temperature, oxygen pressure and time conditions and in presence of different solvents, were tested for their enzymatic vulnerability. The correlation of various pretreatment parameters and the enzymatic hydrolysis yield was determined. Of these, those exhibiting efficient saccharification were selected as potential candidates to be tested as carbon sources for SSF and SHF processes of lactic acid and omega-3 fatty acid production, respectively.

As a second step, the best substrates were used as a solid feedstock for the production of lactic acid by lactic acid bacteria *Lactobacillus delbrueckii* by employing a SSF process. After 168 hours of incubation under anaerobic conditions, 44 °C, pH = 5.0, in a substrate concentration of 9% w / v and enzyme loading of 9 mg / g substrate, a yield of 74.41% w/w and a lactic acid concentration of 63.49 g / L was achieved, using pretreated beech wood as a substrate. As far as pretreated pine is concerned, a yield of 45.57 % w/w with a lactic acid concentration of 40.06 g / L was achieved.

As a next step, best substrate derived sugars were used as liquid feedstock for the production of omega-3 fatty acids by the heterotrophic microalgae *Cryptocodinium cohnii* by employing a SHF process. The microalgae cells were able to produce lipids with a DHA content of 29.51% w/w when beech wood derived sugars were used as a carbon source. In a fed-batch process, DHA content of lipids was enhanced by 47.8% w/w, with lipids to consist of 43.5% w/w DHA. Furthermore, the growth and fatty acid production was investigated in batches using pure sugars. Microalgae seemed to prefer glucose as a carbon source, as DHA reached the  $34,88 \pm 6,93\%$  w/w of total lipids.

Except for glucose, the microalgae were capable of catabolizing other sugars present in lignocellulose biomass as well (xylose, arabinose, mannose), while low lignin concentration seemed to promote microalgae growth. Presence of furans seemed to inhibit cell growth and fatty acid production as well. Finally, a decrease in the nitrogen concentration in the medium reduced the cell growth but stimulated lipid accumulation, with DHA accounting for 40,21% w/w of total lipids.

# ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ

---

<b>1</b>	<b>ΘΕΩΡΗΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ</b>	<b>12</b>
<b>1.1</b>	<b>ΕΙΣΑΓΩΓΗ</b>	<b>12</b>
<b>1.2</b>	<b>ΒΙΟΜΑΖΑ</b>	<b>13</b>
1.2.1	Λιγνοκυτταρινούχα Βιομάζα	13
1.2.2	Πηγές λιγνοκυτταρινούχου βιομάζας	14
1.2.3	Δομή της λιγνοκυτταρινούχου βιομάζας	15
1.2.4	Προϊόντα Λιγνοκυτταρινούχου Βιομάζας	17
<b>1.3</b>	<b>ΑΞΙΟΠΟΙΗΣΗ ΒΙΟΜΑΖΑΣ</b>	<b>19</b>
1.3.1	ΠΡΟΚΑΤΕΡΓΑΣΙΑ	19
1.3.2	ΣΑΚΧΑΡΟΠΟΙΗΣΗ	23
1.3.3	ΖΥΜΩΣΕΙΣ	29
<b>2</b>	<b>ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ</b>	<b>41</b>
<b>2.1</b>	<b>Υλικά</b>	<b>41</b>
2.1.1	Συσκευές – Όργανα	41
2.1.2	Μικροοργανισμοί και συνθήκες ανάπτυξης	42
2.1.3	Χημικά Αντιδραστήρια – Αναλώσιμα Υλικά	44
2.1.4	Διαλύτες	44
2.1.5	Ρυθμιστικά Διαλύματα	45
2.1.6	Εμπορικά ένζυμα	46
2.1.7	Βιομάζα	46
<b>2.2</b>	<b>ΜΕΘΟΔΟΙ</b>	<b>47</b>
2.2.1	Υδρολύσεις Βιομαζών	47
2.2.2	Παραγωγή γαλακτικού οξέος από <i>Lactobacillus delbrueckii</i>	53
2.2.3	Παραγωγή ω-3 λιπαρών οξέων από <i>Cryptocodinium cohnii</i>	56
<b>3</b>	<b>ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ</b>	<b>60</b>
<b>3.1</b>	<b>ΥΔΡΟΛΥΣΕΙΣ ΒΙΟΜΑΖΩΝ</b>	<b>60</b>
3.1.1	Αξιολόγηση των διαφορετικών παραμέτρων προκατεργασίας	60
3.1.2	Επιλογή δειγμάτων για τις διεργασίες SSF, SHF	80
<b>3.2</b>	<b>Παραγωγή γαλακτικού οξέος από <i>LACTOBACILLUS DELBRUECKII</i> με διεργασία SSF</b>	<b>83</b>
3.2.1	Παραγωγή γαλακτικού οξέος από σάκχαρα προερχόμενα από οξιά	83
3.2.2	Παραγωγή γαλακτικού οξέος από σάκχαρα προερχόμενα από πεύκο	87
3.2.3	Σύγκριση της απόδοσης από σάκχαρα οξιάς και πεύκου με την ίδια προκατεργασία	91
<b>3.3</b>	<b>Παραγωγή ω-3 λιπαρών οξέων από <i>CRYPTHOCODINIUM COHNII</i> με διεργασία SHF</b>	<b>93</b>
3.3.1	Καλλιέργειες για παραγωγή ω-3 λιπαρών οξέων με χρήση καθαρών σακχάρων	93
3.3.2	Μελέτη της ανάπτυξης και παραγωγής ω-3 λιπαρών οξέων με διαφορετικούς λόγους C/N με χρήση καθαρών σακχάρων	98
3.3.3	Καλλιέργειες για παραγωγή ω-3 λιπαρών οξέων με χρήση υδρολυμάτων λιγνοκυτταρινούχου βιομάζας (Α' Σειρά)	101



3.3.4	Καλλιέργειες για παραγωγή ω-3 λιπαρών οξέων με χρήση υδρολυμάτων λιγνοκυτταρινούχου βιομάζας (Β' Σειρά).....	106
3.3.5	Καλλιέργειες για παραγωγή ω-3 λιπαρών οξέων με χρήση υδρολυμάτων λιγνοκυτταρινούχου βιομάζας σε ημιδιαλείποντος έργου διεργασία.....	113
<b>4</b>	<b>ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ ΚΑΙ ΣΥΖΗΤΗΣΗ.....</b>	<b>119</b>
<b>4.1</b>	<b>ΥΔΡΟΛΥΣΕΙΣ ΒΙΟΜΑΖΩΝ .....</b>	<b>119</b>
4.1.1	Οξιά .....	119
4.1.2	Πεύκο .....	121
4.1.3	Σύγκριση απόδοσης υδρόλυσης οξιάς - πεύκου.....	121
4.1.4	Σύγκριση απόδοσης ακατέργαστης-προκατεργασμένης βιομάζας.....	122
<b>4.2</b>	<b>Παραγωγή γαλακτικού οξέος από <i>LACTOBACILLUS DELBRUECKII</i> με διεργασία SSF.....</b>	<b>122</b>
<b>4.3</b>	<b>Παραγωγή ω-3 λιπαρών οξέων από <i>CRYPTHOCODINIUM COHNII</i>.....</b>	<b>125</b>
4.3.1	Ανάπτυξη και παραγωγή ω-3 λιπαρών οξέων με χρήση καθαρών σακχάρων .....	125
4.3.2	Ανάπτυξη και παραγωγή ω-3 λιπαρών οξέων σε γλυκόζη παρουσία άλλων ουσιών .....	125
4.3.3	Επίδραση του λόγου C/N στην ανάπτυξη και συσσώρευση λιπαρών .....	126
4.3.4	Καλλιέργειες για παραγωγή ω-3 λιπαρών οξέων με χρήση υδρολυμάτων λιγνοκυτταρινούχου βιομάζας .....	127
4.3.5	Καλλιέργειες ημι-διαλείποντος έργου με χρήση σακχάρων από υδρολύματα βιομαζών.....	130
4.3.6	Σύγκριση με αυτότροφα/μιξότροφα συστήματα.....	131
<b>4.4</b>	<b>ΜΕΛΛΟΝΤΙΚΟΙ ΣΤΟΧΟΙ .....</b>	<b>131</b>
<b>5</b>	<b>ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ.....</b>	<b>133</b>
<b>6</b>	<b>ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ.....</b>	<b>141</b>

# ΠΙΝΑΚΑΣ ΕΙΚΟΝΩΝ

Εικόνα 1.1. Τυπική δομή λιγνοκυτταρινούχου βιομάζας: (α) γειτονικά κύτταρα, β) Στρώματα κυτταρικού τοιχώματος. (γ) Κατανομή των λιγνοκυτταρινούχων συστατικών στο δευτερεύον τοίχωμα και (δ) Σχηματισμός του λιγνοκυτταρινούχου δικτύου (Zabed, et al., 2019).....	15
Εικόνα 1.2. Στερεοχημική αναπαράσταση των φαινολικών μονομερών της λιγνίνης: (a) κουμαρμηλική αλκοόλη, (b) κονικυλική αλκοόλη, (c) σιναπυλική αλκοόλη (Amidon, et al., 2008) .....	16
Εικόνα 1.3. Στερεοχημική δομή μιας κοινής ημικυτταρίνης από σκληρό ξύλο: γλυκουρονοξυλάνη (Amidon, et al., 2008).....	16
Εικόνα 1.4. Στερεοχημική δομή κυτταρίνης (Amidon, et al., 2008) .....	17
Εικόνα 1.5. Σχηματική αναπαράσταση του στόχου της προκατεργασίας για το λιγνοκυτταρινούχο υλικό (Mosier, et al., 2005) .....	20
Εικόνα 1.6 Λιγνοκυτταρινούχα υποστρώματα που έχουν χρησιμοποιηθεί για την παραγωγή γαλακτικού οξέος. ..	33
Εικόνα 1.7. Χημική δομή του cis-4,7,10,13,16,19-εικοσιδυαεξανοϊκού οξέος (DHA, C22: 6) (Taberna, 2008)..	35
Εικόνα 1.8. Ηλεκτρονική μικρογραφία ενός είδους Crypthecodinium (Mendes, et al., 2009) (αριστερά) και κύτταρο του <i>Cryptocodium cohni</i> , γεμάτο με σωματίδια λιπαρών πλούσια σε DHA (Wynn, et al., 2010) (δεξιά). .....	40
Εικόνα 2.1. Φωτόμετρο UV2000, Hitachi .....	43
Εικόνα 2.2. Η αντίδραση αναγωγής του 3,5-δινιτροσαλικυλικού οξέος σε 3-αμινο-5-νιτροσαλικυλικό οξύ σε αλκαλικό περιβάλλον και θέρμανση, που συνοδεύεται από αλλαγή χρώματος του δείγματος από κίτρινο σε πορτοκαλί-κόκκινο. (Biocyclopedia, n.d.) .....	49
Εικόνα 2.3. Η συσκευή φωτομέτρησης microplate reader Spectra Max 250 (Molecular Devices) .....	50
Εικόνα 2.4. Σύστημα Αέριας Χρωματογραφίας (GC) που χρησιμοποιήθηκε για τον ποιοτικό και ποσοτικό προσδιορισμό των FAME .....	59
Εικόνα 3.1. Επίδραση του διαλύτη ως προς την ικανότητα απελευθέρωσης γλυκόζης (mg απελευθερωμένης γλυκόζης ανά g προκατεργασμένης βιομάζας) από προκατεργασμένα δείγματα οξιάς, υπό συνθήκες 16 bar, 120 min και 175°C, μετά από 72 ώρες ενζυμικής υδρόλυσης. ....	61
Εικόνα 3.2. Επίδραση του διαλύτη ως προς την ικανότητα απελευθέρωσης γλυκόζης (mg απελευθερωμένης γλυκόζης ανά g προκατεργασμένης βιομάζας) από προκατεργασμένα δείγματα οξιάς, υπό συνθήκες 12 bar, 120 min και 175°C, μετά από 72 ώρες ενζυμικής υδρόλυσης. ....	62
Εικόνα 3.3. Επίδραση του διαλύτη ως προς την ικανότητα απελευθέρωσης γλυκόζης (mg απελευθερωμένης γλυκόζης ανά g προκατεργασμένης βιομάζας) από προκατεργασμένα δείγματα οξιάς, υπό συνθήκες 8 bar, 120 min και 175°C, μετά από 72 ώρες ενζυμικής υδρόλυσης. ....	63
Εικόνα 3.4. Επίδραση του διαλύτη ως προς την ικανότητα απελευθέρωσης γλυκόζης (mg απελευθερωμένης γλυκόζης ανά g προκατεργασμένης βιομάζας) από προκατεργασμένα δείγματα οξιάς, υπό συνθήκες 12 bar, 60 min και 175°C, μετά από 72 ώρες ενζυμικής υδρόλυσης. ....	64
Εικόνα 3.5. Επίδραση του διαλύτη στην ενζυμική υδρόλυση διαφόρων δειγμάτων πεύκου μετά από 72 ώρες, με συνθήκες προκατεργασίας 16 bar, 60 και 120 min και 175°C.....	64
Εικόνα 3.6. Επίδραση του χρόνου προκατεργασίας στην απόδοση της υδρόλυσης (εκφρασμένη σε mg γλυκόζης/ g βιομάζας) λιγνοκυτταρινούχων δειγμάτων οξιάς, που έχουν προκατεργαστεί με διαλύτη ACO, σε πίεση 12 bar και θερμοκρασία 175°C. Το αποτέλεσμα αφορά τις 72 ώρες από την έναρξη της υδρόλυσης.....	66
Εικόνα 3.7. Επίδραση του χρόνου προκατεργασίας στην απόδοση της υδρόλυσης (εκφρασμένη σε mg γλυκόζης/ g βιομάζας) λιγνοκυτταρινούχων δειγμάτων οξιάς, που έχουν προκατεργαστεί με διαλύτη EtOH, σε πίεση 12 bar και θερμοκρασία 175°C. Το αποτέλεσμα αφορά τις 72 ώρες από την έναρξη της υδρόλυσης.....	67
Εικόνα 3.8. Επίδραση του χρόνου προκατεργασίας στην απόδοση της υδρόλυσης (εκφρασμένη σε mg γλυκόζης/ g βιομάζας) λιγνοκυτταρινούχων δειγμάτων οξιάς, που έχουν προκατεργαστεί με διαλύτη THF, σε πίεση 12 bar και θερμοκρασία 175°C. Το αποτέλεσμα αφορά τις 72 ώρες από την έναρξη της υδρόλυσης.....	67
Εικόνα 3.9. Επίδραση του χρόνου προκατεργασίας στην απόδοση της υδρόλυσης (εκφρασμένη σε mg γλυκόζης/ g βιομάζας) λιγνοκυτταρινούχων δειγμάτων πεύκου, που έχουν προκατεργαστεί με διαλύτη EtOH, σε πίεση 16 bar και θερμοκρασία 175°C. Το αποτέλεσμα αφορά τις 72 ώρες από την έναρξη της υδρόλυσης .....	68
Εικόνα 3.10. Επίδραση του χρόνου προκατεργασίας στην απόδοση της υδρόλυσης (εκφρασμένη σε mg γλυκόζης/ g βιομάζας) λιγνοκυτταρινούχων δειγμάτων πεύκου, που έχουν προκατεργαστεί με διαλύτη THF, σε πίεση 16 bar και θερμοκρασία 175°C. Το αποτέλεσμα αφορά τις 72 ώρες από την έναρξη της υδρόλυσης .....	69
Εικόνα 3.11. Επίδραση της πίεσης στην απόδοση της υδρόλυσης (εκφρασμένη σε mg γλυκόζης/ g βιομάζας) λιγνοκυτταρινούχων δειγμάτων οξιάς, που έχουν προκατεργαστεί με διαλύτη EtOH, σε χρόνο 120 min και θερμοκρασία 175°C. Το αποτέλεσμα αφορά τις 72 ώρες από την έναρξη της υδρόλυσης.....	70
Εικόνα 3.12. Επίδραση του χρόνου προκατεργασίας στην απόδοση της υδρόλυσης (εκφρασμένη σε mg γλυκόζης/ g βιομάζας) λιγνοκυτταρινούχων δειγμάτων οξιάς, που έχουν προκατεργαστεί με διαλύτη THF, σε χρόνο 120 min και θερμοκρασία 175°C. Το αποτέλεσμα αφορά τις 72 ώρες από την έναρξη της υδρόλυσης .....	71

Εικόνα 3.13. Επίδραση του χρόνου προκατεργασίας στην απόδοση της υδρόλυσης (εκφρασμένη σε mg γλυκόζης/ g βιομάζας) λιγνοκυτταρινούχων δειγμάτων οξιάς, που έχουν προκατεργαστεί με διαλύτη ACO, σε χρόνο 120 min και θερμοκρασία 175°C. Το αποτέλεσμα αφορά τις 72 ώρες από την έναρξη της υδρόλυσης.....	71
Εικόνα 3.14. Επίδραση της θερμοκρασίας προκατεργασίας στην απόδοση της υδρόλυσης (εκφρασμένη σε mg γλυκόζης/ g βιομάζας) λιγνοκυτταρινούχων δειγμάτων πεύκου, που έχουν προκατεργαστεί με διαλύτη THF, σε χρόνο 120 min και θερμοκρασία 175°C. Το αποτέλεσμα αφορά τις 72 ώρες από την έναρξη της υδρόλυσης. ....	73
Εικόνα 3.15. Συγκέντρωση απελευθερωμένης γλυκόζης (αριστερά) και ολικών αναγωγικών σακχάρων (TRS) (δεξιά) κατά τη διάρκεια της ενζυμικής υδρόλυσης προκατεργασμένων με EtOH δειγμάτων οξιάς σε συγκέντρωση στερεών 9% DM, 50 ° C, 100 mM ρυθμιστικού διαλύματος κιτρικού-φωσφορικού άλατος pH=5.0 και ενζυμικό φορτίο 9 mg/g. Αυτά είναι, κατά αύξουσα αριθμητική σειρά: 1 (γκρι ρόμβος, συνθήκες προκατεργασίας: 16 bar, 175°C, 120 min), 3 (γκρι τετράγωνο, συνθήκες προκατεργασίας: 8 bar, 175°C, 120 min), 6 (γκρι τρίγωνο, συνθήκες προκατεργασίας: 12 bar, 175°C, 120 min) και 12 (μαύρο χι, συνθήκες προκατεργασίας: 12 bar, 175°C, 60 min). Για σύγκριση, παρατίθεται και το ακατέργαστο δείγμα οξιάς (untreated, γκρι αστερίσκος).....	74
Εικόνα 3.16. Συγκέντρωση απελευθερωμένης γλυκόζης (αριστερά) και ολικών αναγωγικών σακχάρων (TRS) (δεξιά) κατά τη διάρκεια της ενζυμικής υδρόλυσης προκατεργασμένων με THF δειγμάτων οξιάς, σε συγκέντρωση στερεών 9% DM, 50 ° C, 100 mM ρυθμιστικού διαλύματος κιτρικού-φωσφορικού άλατος pH=5.0 και ενζυμικό φορτίο 9 mg/g. Αυτά είναι, κατά αύξουσα αριθμητική σειρά: 2 (γκρι ρόμβος, συνθήκες προκατεργασίας: 16 bar, 175°C, 120 min), 4 (γκρι τετράγωνο, συνθήκες προκατεργασίας: 8 bar, 175°C, 120 min), 7 (γκρι τρίγωνο, συνθήκες προκατεργασίας: 12 bar, 175°C, 120 min) και 11 (μαύρο χι, συνθήκες προκατεργασίας: 12 bar, 175°C, 60 min) Για σύγκριση, παρατίθεται και το ακατέργαστο δείγμα οξιάς (untreated, γκρι αστερίσκος).....	75
Εικόνα 3.17. Συγκέντρωση απελευθερωμένης γλυκόζης (αριστερά) και ολικών αναγωγικών σακχάρων (TRS) (δεξιά) κατά τη διάρκεια της ενζυμικής υδρόλυσης προκατεργασμένων με ACO δειγμάτων οξιάς, σε συγκέντρωση στερεών 9% DM, 50 ° C, 100 mM ρυθμιστικού διαλύματος κιτρικού-φωσφορικού άλατος pH=5.0 και ενζυμικό φορτίο 9 mg/g. Αυτά είναι, κατά αύξουσα αριθμητική σειρά: 5 (γκρι ρόμβος, συνθήκες προκατεργασίας: 12 bar, 175°C, 120 min), 8 (γκρι τετράγωνο, συνθήκες προκατεργασίας: 25 bar, 175°C, 120 min), και 9 (γκρι τρίγωνο, συνθήκες προκατεργασίας: 12 bar, 175°C, 60 min). Για σύγκριση, παρατίθεται και το ακατέργαστο δείγμα οξιάς (untreated, μαύρο χι).....	76
Εικόνα 3.18. Συγκέντρωση απελευθερωμένης γλυκόζης (αριστερά) και ολικών αναγωγικών σακχάρων (TRS) (δεξιά) κατά τη διάρκεια της ενζυμικής υδρόλυσης προκατεργασμένων με EtOH δειγμάτων πεύκου σε συγκέντρωση στερεών 9% DM, 50 ° C, 100 mM ρυθμιστικού διαλύματος κιτρικού-φωσφορικού άλατος pH=5.0 και ενζυμικό φορτίο 9 mg/g. Αυτά είναι, κατά αύξουσα αριθμητική σειρά: 12 (γκρι ρόμβος, συνθήκες προκατεργασίας: 16 bar, 175°C, 60 min), 16 (γκρι τετράγωνο, συνθήκες προκατεργασίας: 16 bar, 175°C, 120 min). Για σύγκριση, παρατίθεται και το ακατέργαστο δείγμα πεύκου (untreated, γκρι αστερίσκος). ....	77
Εικόνα 3.19. Συγκέντρωση απελευθερωμένης γλυκόζης (αριστερά) και ολικών αναγωγικών σακχάρων (TRS) (δεξιά) κατά τη διάρκεια της ενζυμικής υδρόλυσης προκατεργασμένων με THF δειγμάτων πεύκου σε συγκέντρωση στερεών 9% DM, 50 ° C, 100 mM ρυθμιστικού διαλύματος κιτρικού-φωσφορικού άλατος pH=5.0 και ενζυμικό φορτίο 9 mg/g. Αυτά είναι, κατά αύξουσα αριθμητική σειρά: 14 (γκρι ρόμβος, συνθήκες προκατεργασίας: 16 bar, 175°C, 60 min), 15 (γκρι τετράγωνο, συνθήκες προκατεργασίας: 16 bar, 175°C, 120 min), 17 (γκρι τρίγωνο, συνθήκες προκατεργασίας: 16 bar, 150°C, 120 min) και 18 (μαύρο χι, συνθήκες προκατεργασίας: 16 bar, 160°C, 120 min). Για σύγκριση, παρατίθεται και το ακατέργαστο δείγμα πεύκου (untreated, γκρι αστερίσκος). ....	78
Εικόνα 3.20. Συγκέντρωση γλυκόζης (αριστερά) και ολικών αναγωγικών σακχάρων (TRS) (δεξιά) που απελευθερώνονται κατά τη διάρκεια της ενζυμικής υδρόλυσης προκατεργασμένου με διαλύτη ACO πεύκου, σε συγκέντρωση στερεών 9% DM, 50 ° C, ενζυμικό φορτίο 9 mg/g και ρυθμιστικό διάλυμα κιτρικού-φωσφορικού άλατος συγκέντρωσης 100 mM, pH=5.0. Οι συνθήκες προκατεργασίας του δείγματος είναι 16 bar, 175°C, 60 min και αντιστοιχεί στον αριθμό 14 (γκρι ρόμβος). Για σύγκριση, παρατίθεται και το ακατέργαστο δείγμα πεύκου (untreated, γκρι αστερίσκος). ....	79
Εικόνα 3.21. Μετατροπή κυτταρίνης σε γλυκόζη κατά τη διάρκεια της ενζυμικής υδρόλυσης για 72 ώρες στα καλύτερα υποστρώματα οξιάς και πεύκου. ....	82
Εικόνα 3.22. Συγκέντρωση γαλακτικού οξέος που παράγεται κατά τη διεργασία SSF από το <i>Lactobacillus delbrueckii</i> , σε 9% w/v αρχική συγκέντρωση στερεού προκατεργασμένου και ακατέργαστου υποστρώματος οξιάς (DM), 9 mg/g ενζυμικό φορτίο, θερμοκρασία 44°C και pH=5.0. Για σύγκριση αναπαρίσταται και η παραγωγή γαλακτικού οξέος από ακατέργαστο πεύκο (Untreated). ....	84
Εικόνα 3.23. Ποσοστιαία απόδοση γαλακτικού οξέος (g/g) για τις διάφορες καλλιέργειες <i>L.delbrueckii</i> που χρησιμοποιήθηκαν ως υποστρώματα δείγματα οξιάς. Κάθε καλλιέργεια αναπαρίσταται με τον αντίστοιχο αριθμό του χρησιμοποιούμενου δείγματος οξιάς, ο οποίος αναγράφεται στον οριζόντιο άξονα. ....	86
Εικόνα 3.24. Συγκέντρωση γαλακτικού οξέος που παράγεται κατά τη διεργασία SSF από το <i>Lactobacillus delbrueckii</i> , σε 9% αρχική συγκέντρωση στερεού προκατεργασμένου υποστρώματος πεύκου (DM), 9 mg/g ενζυμικό φορτίο, θερμοκρασία 44°C και pH=5.0. Για σύγκριση αναπαρίσταται και η παραγωγή γαλακτικού οξέος από ακατέργαστο πεύκο (Untreated). ....	88
Εικόνα 3.25. Ποσοστιαία απόδοση γαλακτικού οξέος (g/g) για τις διάφορες καλλιέργειες <i>L.delbrueckii</i> που χρησιμοποιήθηκαν ως υποστρώματα δείγματα πεύκου. Κάθε καλλιέργεια αναπαρίσταται με τον αντίστοιχο αριθμό του χρησιμοποιούμενου δείγματος, ο οποίος αναγράφεται στον οριζόντιο άξονα. ....	90

Εικόνα 3.26. Ποσοστιαία απόδοση γαλακτικού οξέος (g/g) για τις καλλιέργειες <i>L.delbrueckii</i> που χρησιμοποιήθηκαν ως υποστρώματα δείγματα οξιάς και πεύκου ίδιας προκεταργασίας. ....	92
Εικόνα 3.27. Κυτταρική ανάπτυξη του μικροφύκου <i>C.cohnii</i> σε διαφορετικά υποστρώματα καθαρών σακχάρων (γλυκόζη, ξυλόζη, μαννόζη, αραβινόζη, γλυκόζη-ξυλόζη) και παρουσίας άλλων ουσιών (λιγνίνη, HMF). ....	94
Εικόνα 3.28. Κατανάλωση γλυκόζης παρουσία ξυλόζης, λιγνίνης και HMF από το μικροφύκος <i>C.cohnii</i> σε διάστημα 120 ωρών επώασης. ....	95
Εικόνα 3.29. Κατανάλωση καθαρών σακχάρων από το μικροφύκος <i>C.cohnii</i> σε διάστημα 120 ωρών επώασης. ....	95
Εικόνα 3.30. Ποσοστό ολικών παραγόμενων λιπαρών οξέων ως προς τη βιομάζα των κυττάρων και ποσοστό DHA ως προς τα ολικά παραγόμενα λιπαρά οξέα κατά βάρος, με καθαρά σάκχαρα ως πηγή άνθρακα. ....	97
Εικόνα 3.31. Κυτταρική ανάπτυξη του μικροφύκου <i>C.cohnii</i> σε θρεπτικό μέσο με διαφορετικές αναλογίες C/N. ....	99
Εικόνα 3.32. Κατανάλωση γλυκόζης σε θρεπτικό μέσο με διαφορετικές αναλογίες C/N. ....	99
Εικόνα 3.33. Ποσοστό ολικών παραγόμενων λιπαρών οξέων ως προς τη βιομάζα των κυττάρων και ποσοστό DHA ως προς τα ολικά παραγόμενα λιπαρά οξέα κατά βάρος, για τις διαφορές συγκεντρώσεις εκχυλίσματος ζύμης. .	100
Εικόνα 3.34. Κυτταρική ανάπτυξη του μικροφύκου <i>C.cohnii</i> σε σάκχαρα προερχόμενα από υδρολύσεις προκατεργασμένου ξύλου οξιάς και πεύκου. Η καλλιέργεια ελέγχου ορίστηκε ως η ανάπτυξη σε καθαρή γλυκόζη. ....	102
Εικόνα 3.35. Κατανάλωση γλυκόζης προερχόμενη από υδρόλυμα οξιάς και πεύκου σε διάστημα επώασης 120 ωρών. Ως καλλιέργεια ελέγχου ορίστηκε η ανάπτυξη σε καθαρή γλυκόζη. ....	103
Εικόνα 3.36. Κατανάλωση ξυλόζης προερχόμενη από υδρόλυμα οξιάς και πεύκου σε διάστημα επώασης 120 ωρών. ....	103
Εικόνα 3.37. Κατανάλωση ολικών σακχάρων (TRS), προερχόμενων από υδρόλυμα οξιάς και πεύκου σε διάστημα επώασης 120 ωρών. ....	104
Εικόνα 3.38. Ποσοστό ολικών παραγόμενων λιπαρών οξέων ως προς τη βιομάζα των κυττάρων και ποσοστό DHA ως προς τα ολικά παραγόμενα λιπαρά οξέα κατά βάρος, που λαμβάνεται ύστερα από 120 ώρες επώασης <i>C.cohnii</i> σε σάκχαρα προερχόμενα από υδρολύματα οξιάς και πεύκου. Παρατίθενται και τα αντίστοιχα ποσοστά TFA και DHA από καθαρή γλυκόζη για σύγκριση. ....	105
Εικόνα 3.39. Κυτταρική ανάπτυξη του μικροφύκου <i>C.cohnii</i> σε σάκχαρα προερχόμενα από υδρολύσεις προκατεργασμένου και ακατέργαστου ξύλου οξιάς. Η καλλιέργεια ελέγχου ορίστηκε ως η ανάπτυξη σε καθαρή γλυκόζη. ....	108
Εικόνα 3.40. Κατανάλωση γλυκόζης προερχόμενη από υδρόλυμα οξιάς σε διάστημα επώασης 120 ωρών. Ως καλλιέργεια ελέγχου ορίστηκε η ανάπτυξη σε καθαρή γλυκόζη. ....	109
Εικόνα 3.41. Κατανάλωση ξυλόζης προερχόμενη από υδρόλυμα οξιάς σε διάστημα επώασης 120 ωρών. ....	109
Εικόνα 3.42. Κατανάλωση ολικών σακχάρων (TRS), προερχόμενων από υδρόλυμα οξιάς σε διάστημα επώασης 120 ωρών. ....	110
Εικόνα 3.43. Ποσοστό ολικών παραγόμενων λιπαρών οξέων ως προς τη βιομάζα των κυττάρων, και ποσοστό DHA ως προς τα ολικά παραγόμενα λιπαρά οξέα κατά βάρος, που λαμβάνεται ύστερα από 120 ώρες επώασης <i>C.cohnii</i> σε σάκχαρα προερχόμενα από υδρολύματα οξιάς, προκατεργασμένης και ακατέργαστης. Παρατίθενται και τα αντίστοιχα ποσοστά TFA και DHA από καθαρή γλυκόζη για σύγκριση. ....	111
Εικόνα 3.44. Κυτταρική ανάπτυξη του μικροφύκου <i>C.cohnii</i> σε σάκχαρα προερχόμενα από υδρολύσεις προκατεργασμένου ξύλου οξιάς για 220 ώρες, με επανατροφοδότηση υδρολύματος στις 120 ώρες επώασης. Ως καλλιέργεια ελέγχου ορίστηκε η ανάπτυξη σε κρυσταλλική κυτταρίνη. ....	114
Εικόνα 3.45. Κατανάλωση γλυκόζης προερχόμενη από υδρόλυμα οξιάς σε διάστημα επώασης 220 ωρών με επανατροφοδότηση υδρολύματος στις 120 ώρες. Ως καλλιέργεια ελέγχου ορίστηκε η ανάπτυξη σε κρυσταλλική κυτταρίνη. ....	115
Εικόνα 3.46. Κατανάλωση ξυλόζης προερχόμενη από υδρόλυμα οξιάς σε διάστημα επώασης 220 ωρών με επανατροφοδότηση υδρολύματος στις 120 ώρες. ....	115
Εικόνα 3.47. Κατανάλωση ολικών σακχάρων (TRS) προερχόμενων από υδρόλυμα οξιάς σε διάστημα επώασης 220 ωρών με επανατροφοδότηση υδρολύματος στις 120 ώρες. Ως καλλιέργεια ελέγχου ορίστηκε η ανάπτυξη σε κρυσταλλική κυτταρίνη. ....	116
Εικόνα 3.48. Ποσοστό ολικών παραγόμενων λιπαρών οξέων ως προς τη βιομάζα των κυττάρων, και ποσοστό DHA ως προς τα ολικά παραγόμενα λιπαρά οξέα κατά βάρος, που λαμβάνεται για διεργασία ημιδιαλείποντος έργου παραγωγής ω-3 λιπαρών οξέων από μικροφύκος <i>C.cohnii</i> . Η ανάπτυξη λαμβάνει χώρα σε υδρολύματα προκατεργασμένης οξιάς για 220 ώρες και επανατροφοδότηση της καλλιέργειας με φρέσκο υδρόλυμα στις 120 ώρες. Ως καλλιέργεια ελέγχου χρησιμοποιήθηκε η ανάπτυξη σε σάκχαρα προερχόμενα από κρυσταλλική κυτταρίνη με επώαση για 120 ώρες. ....	117
Εικόνα 3.49. Σύγκριση της SHF διεργασίας διαλείποντος (επώαση 120 ώρες, χωρίς επανατροφοδότηση) και ημιδιαλείποντος έργου (επώαση 220 ώρες, επανατροφοδότηση στις 120 ώρες) για την παραγωγή ω-3 λιπαρών οξέων από σάκχαρα του υδρολύματος 19 (αριστερά) και 20 (δεξιά) ....	118

# 1 ΘΕΩΡΗΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ

---

## 1.1 ΕΙΣΑΓΩΓΗ

Καθώς οι απαιτήσεις σε ενέργεια αυξάνονται συνεχώς λόγω της ταχείας ανάπτυξης του πληθυσμού και της βιομηχανοποίησης, η ανάπτυξη ενεργειακών πηγών δεν συμβαδίζει με την αυξανόμενη κατανάλωση ενέργειας. Οι ανεπτυγμένες χώρες δεν είναι σε θέση να αντισταθμίσουν το φαινόμενο αυτό, ακόμη και μετά την αύξηση της παραγωγής ενέργειας κατά πολλαπλάσιες φορές. Επί του παρόντος, το μεγαλύτερο μέρος των ενεργειακών απαιτήσεων καλύπτεται από συμβατικές πηγές ενέργειας όπως ο άνθρακας, το πετρέλαιο, το φυσικό αέριο κ.λ.π. Τα δύο μεγαλύτερα προβλήματα που αντιμετωπίζει κάθε χώρα με αυτά τα συμβατικά καύσιμα, είναι τα εξής:

- Η προοδευτική εξάντληση των ορυκτών καυσίμων, που οδηγεί σε αύξηση της τιμής τους. Τα παγκόσμια αποθέματα πετρελαίου υπολογίζεται ότι εξαντλούνται το 2050.
- Η υποβάθμιση του περιβάλλοντος. Ρύποι όπως το διοξείδιο του θείου, SO<sub>2</sub>, που παράγεται από την καύση ορυκτών καυσίμων, είναι η κύρια αιτία της όξινης βροχής. Ακόμη, σε παγκόσμιο επίπεδο, η αύξηση των ποσοστών εκπομπής αερίων θερμοκηπίου, δηλαδή του CO<sub>2</sub>, που αποτελεί, επίσης προϊόν καύσης τους, συνιστά απειλή για το παγκόσμιο κλίμα (Saxena, et al., 2009).

Επί του παρόντος, υπάρχει επιτακτική ανάγκη για ανάπτυξη εναλλακτικών και βιώσιμων πηγών καυσίμων, χημικών, και ενέργειας, οι οποίες να είναι φθηνές, ανανεώσιμες και να μην προκαλούν ρύπανση (Gong, et al., 2012). Ιδιαίτερο ενδιαφέρον έχει δοθεί σε εναλλακτικές και ανανεώσιμες πηγές ενέργειας όπως η ηλιακή, η αιολική, η θερμική, η υδροηλεκτρική, η βιομάζα κ.λ.π. Η βιομάζα και τα υλικά που προέρχονται από βιομάζα έχουν επισημανθεί ως μία από τις πιο ελπιδοφόρες εναλλακτικές. Αυτά τα υλικά παράγονται από το διαθέσιμο ατμοσφαιρικό CO<sub>2</sub>, το νερό και το ηλιακό φως μέσω της βιολογικής φωτοσύνθεσης. Ως εκ τούτου, η βιομάζα θεωρείται ως η μόνη βιώσιμη πηγή οργανικού άνθρακα στη γη και το τέλειο ισοδύναμο με το πετρέλαιο για την παραγωγή καυσίμων και χημικών προϊόντων με μηδενική καθαρή εκπομπή άνθρακα (Isikgor & Becer, 2015). Η βιομάζα αποτελεί την τέταρτη μεγαλύτερη πηγή ενέργειας στον κόσμο μετά τον άνθρακα, το πετρέλαιο και το φυσικό αέριο, αντιπροσωπεύοντας περίπου το 14% της παγκόσμιας κατανάλωσης πρωτογενούς ενέργειας. Είναι η μόνη ανανεώσιμη πηγή άνθρακα που μπορεί να μετατραπεί εύκολα σε στερεά, υγρά και αέρια καύσιμα, καθώς και άλλα προϊόντα προστιθέμενης αξίας, μέσω διαφορετικών διεργασιών μετατροπής, ενώ η παραγωγή της μπορεί να προσαρμοστεί έτσι ώστε να ανταποκρίνεται στις μεταβολές των απαιτήσεων της αγοράς. Ως εκ τούτου, θεωρείται σημαντικός ενεργειακός πόρος σε όλο τον κόσμο (Saxena, et al., 2009; Nomiyama, et al., 2014).

## 1.2 ΒΙΟΜΑΖΑ

Ως βιομάζα ορίζεται το βιολογικό υλικό, το οποίο προέρχεται από ζωντανούς οργανισμούς (Soni, et al., 2018). Τέτοιο μπορεί να είναι υλικό φυτικής προέλευσης όπως από αναπτυσσόμενα φυτά, συμπεριλαμβανομένων των φυκών, δέντρων και καλλιεργειών, ή ζωικής προέλευσης όπως από κοπριά (Saxena, et al., 2009). Αποτελείται από διάφορα μόρια με βάση τον άνθρακα (C) που περιέχουν υδρογόνο (H), οξυγόνο (O), άζωτο (N), μικρές ποσότητες βαρέων μετάλλων και στοιχεία των ομάδων I και II (Soni, et al., 2018). Το θείο είναι επίσης παρόν σε μικρές αναλογίες. Αποτελείται επίσης από σημαντικές ποσότητες ανόργανων ειδών. Πηγή βιομάζας είναι η οργανική ύλη στην οποία η ηλιακή ενέργεια αποθηκεύεται με χημικούς δεσμούς. Τα φυτά, μέσω της φωτοσύνθεσης, παράγουν υδατάνθρακες οι οποίοι αποτελούν τα δομικά στοιχεία της βιομάζας (Saxena, et al., 2009).

Υπάρχουν τρεις κατηγορίες πηγών βιομάζας, με βάση την προέλευσή τους:

- (1) **βιομάζα αποβλήτων**, συμπεριλαμβανομένων των οργανικών αποβλήτων, όπως τα ζωικά περιττώματα και τα κατάλοιπα τροφίμων που απορρίπτονται από τις οικίες και τις βιομηχανίες τροφίμων
- (2) **η αχρησιμοποίητη βιομάζα**, που αποτελείται από μη βρώσιμα μέρη γεωργικών προϊόντων, όπως υπολείμματα υλοτομίας, άχυρο ρυζιού και φλοιό ρυζιού
- (3) **ενεργειακές καλλιέργειες**, που μπορούν να χρησιμοποιηθούν για την παραγωγή βιοαιθανόλης και καυσίμου βιοντίζελ, όπως το κραμβέλαιο, το καλαμπόκι και το ρύζι.

Η βιομάζα παράγεται τόσο στη γεωργία, όσο και στη δασοκομία και την αλιεία, είτε ως κύριες καλλιέργειες είτε ως απόβλητα και αχρησιμοποίητα υλικά.

Οι πηγές της βιομάζας μετατρέπονται σε έξι τύπους τελικών προϊόντων: (1) **λιπάσματα και ζωοτροφές**, (2) **πρώτες ύλες χημικών προϊόντων**, όπως αμινοξέα και χημικές ουσίες υψηλής προστιθέμενης αξίας, (3) **υλικά όπως πλαστικά και ρητίνες**, (4) **καύσιμα** όπως η αιθανόλη, το ντίζελ, το βιοαέριο και στερεά καύσιμα, (5) **θερμική ενέργεια**, (6) **ηλεκτρική ενέργεια** (Nomiyama, et al., 2014).

### 1.2.1 Λιγνοκυτταρινούχα Βιομάζα

Η λιγνοκυτταρινούχα βιομάζα είναι η πιο άφθονη οργανική πηγή στη γη, με μια ετήσια παραγωγή στη βιόσφαιρα περίπου 170 δισεκατομμυρίων μετρικών τόνων (Amidon, et al., 2008). Σε αυτήν συγκαταλέγονται ξύλα, γεωργικά κατάλοιπα και βιομηχανικά απόβλητα. Η επεξεργασία της λιγνοκυτταρινούχου βιομάζας έχει κερδίσει τεράστια προσοχή, λόγω του τεράστιου βιοτεχνολογικού της δυναμικού, δεδομένου ότι αποτελεί μια φθηνή και ανανεώσιμη φυσική πηγή για την οικονομική παραγωγή ενώσεων προστιθέμενης αξίας. Διάφορες γεωργικές και βιομηχανικές διεργασίες παράγουν

τεράστιες ποσότητες λιγνοκυτταρινούχων υπολειμμάτων, οι οποίες δεν χρησιμοποιούνται επαρκώς και συνιστούν απειλή για το περιβάλλον. Η αποτελεσματική αξιοποίηση αυτών των αποβλήτων στις βιομηχανικές διεργασίες, όχι μόνο θα λύσει το πρόβλημα της περιβαλλοντικής ρύπανσης, αλλά θα αποτελέσει και ένα οικονομικά αποδοτικό υπόστρωμα για την κάλυψη των συνεχώς αυξανόμενων απαιτήσεων των βιομηχανιών (Soni, et al., 2018). Επιπλέον, η λιγνοκυτταρινούχα βιομάζα δεν απαιτεί επιπλέον καλλιεργητική γη, και επομένως δεν έρχεται σε αντιπαλότητα με τις βιομηχανίες κλωστοϋφαντουργίας και τροφίμων (Al-Battashi, et al., 2019).

## 1.2.2 Πηγές λιγνοκυτταρινούχου βιομάζας

Η λιγνοκυτταρινούχα βιομάζα προέρχεται κυρίως από ζώα, φυτά, δέντρα, χόρτα, καλλιέργειες, λαχανικά, υπολείμματα αγροτικών – δασικών εκτάσεων και υδρόβια φυτά (Soni, et al., 2018). Κατατάσσεται σε τρεις βασικές ομάδες με βάση τις πηγές προέλευσής της: **(1) υπολείμματα καλλιεργειών**, **(2) υπολείμματα δασών** και **(3) αστικά στερεά απόβλητα (MSW)**. Οι πηγές αυτές έχουν βρίσκονται σε μεγαλύτερη αφθονία και διαθεσιμότητα παγκοσμίως (Al-Battashi, et al., 2019).

### Υπολείμματα καλλιεργειών

Τα περισσότερα από τα παγκόσμια γεωργικά κατάλοιπα προέρχονται από τέσσερις καλλιέργειες που είναι καλαμπόκι, ρύζι, σιτάρι και ζαχαροκάλαμο, ενώ τα υπόλοιπα αγροτικά απόβλητα αποτελούν ένα μικρό μέρος της συνολικής παγκόσμιας βιομάζας. Η Ασία είναι ο κορυφαίος παραγωγός ρυζιού και άχυρου σίτου, ενώ το ζαχαροκάλαμο και το καλαμπόκι παράγονται κυρίως στην Αμερική. Επιπλέον, οι ενεργειακές καλλιέργειες, όπως τα αιωνόβια και υδρόβια φυτά, είναι η πιο ελπιδοφόρα πηγή μεταξύ άλλων λιγνοκυτταρινούχων βιομαζών λόγω της αποτελεσματικής τους φωτοσυνθετικής οδού. Παράγουν υπερδιπλάσια ποσότητα βιομάζας ετησίως σε θερμές και εύκρατες περιοχές.

### Υπολείμματα Δασών

Τα δασικά απόβλητα αποτελούνται κυρίως από αγνά δασικά και δασικά υποπροϊόντα όπως πριονίδια, φλοίδες ξύλου από το κύριο σώμα και από τα κλαδιά νεκρών δένδρων, κατάλοιπα από κλάδεμα, φλοιούς με τη μορφή σκληρού ξύλου (π.χ. ιτιά και λεύκες) και μαλακού ξύλου (π.χ. πεύκα και έλατα).

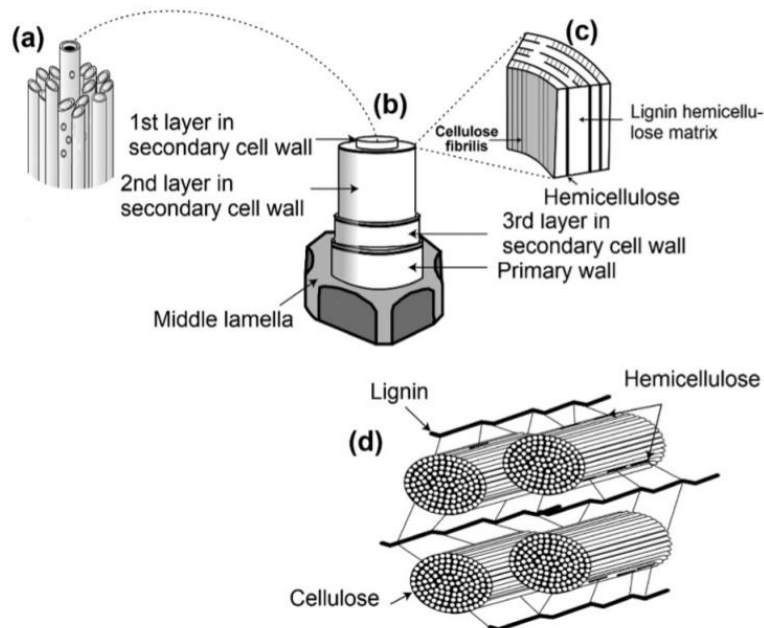
### Αστικά Στερεά Απόβλητα (MSW)

Το οργανικό κλάσμα MSW υπό τη μορφή απορριμμάτων τροφίμων και απορριμμάτων χαρτιού θεωρείται ως εναλλακτική και πολλά υποσχόμενη πηγή. Ωστόσο, οι μεγάλες διακυμάνσεις στη σύνθεση τους και η ευαισθησία τους στις μολύνσεις καθιστούν

δύσκολη την αξιοποίησή τους σε βιοτεχνολογικές εφαρμογές (Al-Battashi, et al., 2019).

### 1.2.3 Δομή της λιγνοκυτταρινούχου βιομάζας

Η λιγνοκυτταρινούχα βιομάζα είναι ένα ανθεκτικό και ετερογενές υλικό, το οποίο είναι δύσκολο να αποπολυμεριστεί (Soni, et al., 2018). Αποτελείται κυρίως από τρία πολυμερή: κυτταρίνη, ημικυτταρίνη και λιγνίνη, μαζί με μικρές ποσότητες άλλων συστατικών, όπως ακετυλομάδες, ανόργανα στοιχεία και φαινολικούς υποκαταστάτες (Isikgor & Becer, 2015). Η κυτταρίνη, η ημικυτταρίνη και η λιγνίνη δεν κατανέμονται ομοιόμορφα στο κυτταρικό τοίχωμα (Isikgor & Becer, 2015). Η ακριβής σύνθεση της λιγνοκυτταρινούχου βιομάζας ποικίλει από πηγή σε πηγή ανάλογα με το είδος του φυτού, τις συνθήκες ανάπτυξης, την ωριμότητα του τοιχώματος των φυτικών κυττάρων και τον τύπο του φυτικού ιστού. Συνήθως περιλαμβάνει 35-50% κυτταρίνη, 20-35% ημικυτταρίνη και 10-25% λιγνίνη (Al-Battashi, et al., 2019) (Isikgor & Becer, 2015). Αυτά τα συστατικά συνδέονται μεταξύ τους και σχηματίζουν ένα πολύπλοκο δίκτυο, γνωστό ως λιγνοκυτταρινούχο πλέγμα (Εικόνα 1), το οποίο προσδίδει ανθεκτικότητα στη βιομάζα (Zabed, et al., 2019).

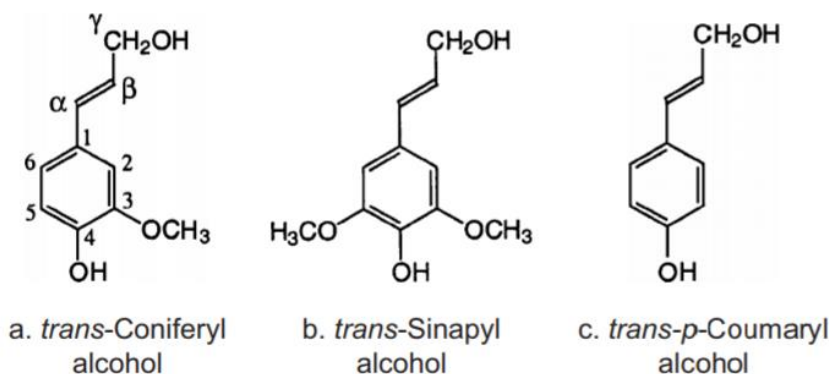


Εικόνα 1.1. Τυπική δομή λιγνοκυτταρινούχου βιομάζας: (α) γειτονικά κύτταρα, (β) Στρώματα κυτταρικού τοιχώματος. (γ) Κατανομή των λιγνοκυτταρινούχων συστατικών στο δευτερεύον τοίχωμα και (δ) Σχηματισμός του λιγνοκυτταρινούχου δικτύου (Zabed, et al., 2019).

**Λιγνίνη:** Η λιγνίνη είναι το κύριο δομικό συστατικό της λιγνοκυτταρίνης, η οποία αποτελείται από τρεις διαφορετικούς τύπους φαινολικών μονομερών: p-κουμαρμηλική αλκοόλη, κωνικυλική αλκοόλη και σιναπυλική αλκοόλη. Προσφέρει αντοχή στη λιγνοκυτταρινούχα βιομάζα και εμποδίζει τη δράση των υδρολυτικών ενζύμων,

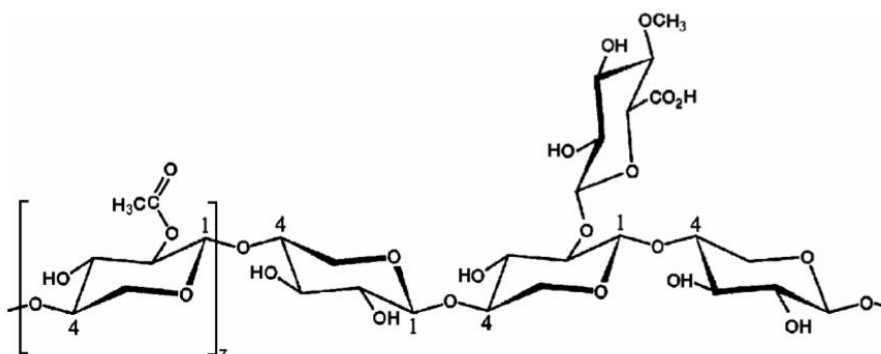


λειτουργώντας ως φυσικός φραγμός στη βιολογική αποικοδόμηση της κυτταρίνης και της ημικυτταρίνης σε ξυλώδη βιομάζα. Θεωρείται ως το πιο ανυποχώρητο συστατικό του λιγνοκυτταρινούχου υλικού λόγω της δομικής πολυπλοκότητάς του. Κατά τον αποπολυμερισμό, η λιγνίνη μπορεί να παράγει πολύτιμες αρωματικές ενώσεις που έχουν πολλές εφαρμογές (Soni, et al., 2018) (Amidon, et al., 2008).



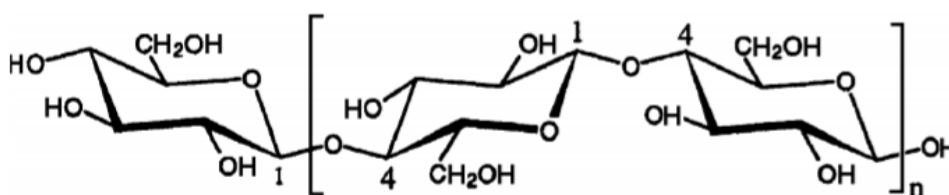
Εικόνα 1.2. Στερεοχημική αναπαράσταση των φαινολικών μονομερών της λιγνίνης: (α) κουμαρμηλική αλκοόλη, (β) κονικυλική αλκοόλη, (γ) σιναπυλική αλκοόλη (Amidon, et al., 2008)

**Ημικυτταρίνη:** Η ημικυτταρίνη είναι το δεύτερο πιο άφθονο πολυμερές του κόσμου που περιλαμβάνει μικρά γραμμικά και διακλαδισμένα πολυμερή, με μέσο μοριακό βάρος κάτω από 30.000 (Barkodia, et al., 2016) (Saxena, et al., 2009). Σε αντίθεση με την κυτταρίνη, η ημικυτταρίνη έχει μια τυχαία και άμορφη δομή. Τα πολυμερή αποτελούνται από διαφορετικές πεντόζες (D-αραβινόζη, D-ξυλόζη), εξόζες (D-γαλακτόζη, D-γλυκόζη, D-μαννόζη) και οξέα σακχάρων. Οι ημικυτταρίνες διαφέρουν ως προς τη σύνθεσή τους. Οι ημικυτταρίνες σε σκληρό ξύλο (hardwood) αποτελούνται κυρίως από ξυλάνες, ενώ οι γλυκομαννάνες είναι τα κύρια συστατικά σε μαλακό ξύλο (softwood). Η ημικυτταρίνη υδρολύεται γρήγορα λόγω της άμορφης και διακλαδισμένης φύσης της, σε σύγκριση με την κυτταρίνη (Isikgor & Becer, 2015) (Soni, et al., 2018). Χρησιμεύει ως συνδετικό υλικό μεταξύ της λιγνίνης και των ινών κυτταρίνης, πράγμα που καθιστά όλο το δίκτυο της κυτταρίνης-ημικυτταρίνης-λιγνίνης πιο άκαμπτο (Al-Battashi, et al., 2019).



Εικόνα 1.3. Στερεοχημική δομή μιας κοινής ημικυτταρίνης από σκληρό ξύλο: γλυκουρονοξυλάνη (Amidon, et al., 2008)

**Κυτταρίνη:** Η κυτταρίνη αποτελεί έναν ευρέως γνωστό αντιπρόσωπο των φυσικών πολυμερών. Παράγεται κυρίως από φυτά, αλλά ορισμένοι μικροοργανισμοί, είδη φυκών και ζώα μπορούν επίσης να τη συνθέσουν. Η κυτταρίνη αποτελείται από δύο διαφορετικές κρυσταλλικές μορφές: Ia και Ib. Η μορφή Ia συναντάται κυρίως στη κυτταρίνη που συντίθεται από βακτήρια και φύκη, ενώ η Ib είναι η κυρίαρχη μορφή που υπάρχει στα ανώτερα φυτά. Το δίκτυο κυτταρίνης έχει μια σύνθετη αρχιτεκτονική που αποτελείται από μικροϊνίδια, διατεταγμένα σε δέσμες (Soni, et al., 2018). Τα μικροϊνίδια προσδίδουν στα μόρια κυτταρίνης μεγαλύτερη αντοχή και ακαμψία, το οποίο με τη σειρά του αυξάνει την κρυσταλλικότητα της κυτταρίνης (Zabed, et al., 2019). Κάθε μικροϊνίδιο αποτελείται από 36-1200 αλυσίδες κυτταρίνης, που συγκρατούνται μεταξύ τους με δεσμούς υδρογόνου και δυνάμεις Van der Waals, οδηγώντας σε μια εξαιρετικά οργανωμένη κρυσταλλική δομή. Κάθε αλυσίδα κυτταρίνης είναι μία γραμμική αλυσίδα μονομερών D-γλυκόζης (100-20.000) που συνδέονται μεταξύ τους με β-1,4 γλυκοζιδικούς δεσμούς. Η κελλοβιόζη, ένας δισακχαρίτης, είναι η επαναλαμβανόμενη μονάδα κυτταρίνης. Η τρισδιάστατη δομή της κυτταρίνης αποτελείται από φύλλα δακτυλίων γλυκοπυρανόζης που βρίσκονται σε ένα επίπεδο με φύλλα στοιβαγμένα μεταξύ τους για να σχηματίσουν μια πολύ οργανωμένη μορφή. Οι εξαιρετικά οργανωμένες κρυσταλλικές δομές της κυτταρίνης παρεμβάλλονται από αποδιοργανωμένες άμορφες περιοχές (Soni, et al., 2018).



Εικόνα 1.4. Στερεοχημική δομή κυτταρίνης (Amidon, et al., 2008)

## 1.2.4 Προϊόντα Λιγνοκυτταρινούχου Βιομάζας

Δεδομένου ότι η χημική σύνθεση των λιγνοκυτταρινούχων υλικών αποτελείται κυρίως από πολυμερή σάκχαρα (κυτταρίνη και ημικυτταρίνη) και λιγνίνη, αυτά τα χημικά συστατικά μπορούν να ανακυκλωθούν και να χρησιμοποιηθούν για την παραγωγή ενός αριθμού προϊόντων προστιθέμενης αξίας με ζύμωση, χρησιμοποιώντας κατάλληλες διεργασίες βασισμένες σε ένζυμα (Maitan-Alfenas, et al., 2015; Soni, et al., 2018). Ιδιαίτερα, ο όρος «Biorefinery» είναι μια πολλά υποσχόμενη προσέγγιση που κερδίζει την προσοχή παγκοσμίως για την παραγωγή βιοκαυσίμων χρησιμοποιώντας βιομάζα με μεγάλη αποτελεσματικότητα. Εκτός από τα βιοκαύσιμα, στο πλαίσιο αυτό, η λιγνοκυτταρινούχα βιομάζα αξιοποιείται εμπορικά για την παραγωγή πολύτιμων

χημικών ουσιών με πιθανό ρόλο ως θρεπτικές και φαρμακευτικές ουσίες (Soni, et al., 2018).

### **Βιοκαύσιμα**

Πληθώρα βιοκαύσιμων λαμβάνονται από λιγνοκυτταρινούχο βιομάζα όπως βιοντίζελ, βιοαιθανόλη, βιοϋδρογόνο, βιοαέριο, βιομεθανόλη, βουτανόλη, syngas και άλλα (Kumar & Sharma, 2017) (Irmak, 2017) (Soni, et al., 2018). Ιδιαίτερα, η βιοαιθανόλη αποτελεί έναν πολλά υποσχόμενο εναλλακτικό υποψήφιο έναντι των μη ανανεώσιμων ορυκτών καυσίμων λόγω των μοναδικών ιδιοτήτων της ως ενισχυτή του αριθμού οκτανίου, ως χημικής τροφοδοσίας και πρόσθετου βενζίνης. Διάφορα υπολείμματα καλλιέργειών όπως αραβοσιτέλαιο, φλοιοί φρούτων, μίσχοι ηλίανθου, άχυρο ρυζιού, άχυρο σίτου και άλλα έχουν χρησιμοποιηθεί για την παραγωγή βιοαιθανόλης (Soni, et al., 2018).

### **Χημικά – Βιοπροϊόντα – Προϊόντα Προστιθέμενης αξίας**

Εκτός από την ενέργεια και τα καύσιμα, η βιομάζα μπορεί να χρησιμοποιηθεί για τη δημιουργία πολύτιμων χημικών ουσιών και υλικών με βάση τον άνθρακα, που είναι γνωστά ως βιοπροϊόντα (Irmak, 2017). Οι χημικές ουσίες που παράγονται από την λιγνοκυτταρινούχα βιομάζα μπορεί να προέρχονται είτε από τους υδατάνθρακες είτε από την λιγνίνη. Πρόσφατα, η λιγνίνη έχει προσελκύσει το ενδιαφέρον ως πλούσια πηγή πολύτιμων προϊόντων όπως είναι οι φαινολικές ενώσεις (Kumar & Sharma, 2017). Ιδιαίτερα, αναφέρεται ότι η υψηλής ποιότητας λιγνίνη μπορεί να χρησιμοποιηθεί ως υποκατάστατο πολυμερικών υλικών όπως ρητίνες φαινολικής σκόνης, πολυϊσοκυανουρικοί αφροί και αφροί πολυουρεθάνιου καθώς και εποξικές ρητίνες (Zhao, et al., 2009). Από την άλλη, οι υδατάνθρακες των έξι και πέντε ατόμων άνθρακα μπορούν να υποβληθούν σε εκλεκτικές αντιδράσεις αφυδάτωσης, υδρογόνωσης και οξειδωσης για να δώσουν χρήσιμα προϊόντα, όπως σορβιτόλη, φουρφουράλη, γλουκαρικό οξύ, HMF, λεβουλινικό οξύ και άλλα (de Jong & Gosselink, 2014).

### **Φουρφουράλες**

Η απλούστερη χημική ουσία που προέρχεται από υδατάνθρακες είναι η φουρφουράλη και η 5-υδροξυμεθυλοφουρφουράλη (HMF) που παράγεται μέσω καταλυόμενης με οξύ αφυδάτωσης των C5 και C6 (Kumar & Sharma, 2017). Η φουρφουράλη αποτελεί φυσικό πρόδρομο για τα χημικά που βασίζονται σε φουράνιο. Έχει θεωρηθεί ένα σημαντικό δομικό στοιχείο για την παραγωγή χημικών ουσιών που δεν προέρχονται από πετρέλαιο, μιας νέας γενιάς βιοπλαστικών και δυναμικών βιοκαυσίμων ή προσθέτων καυσίμων (Irmak, 2017).

### **Αλκοόλες Σακχάρων**

Ιδιαίτερου εμπορικού ενδιαφέροντος είναι διάφορες αλκοόλες σακχάρων όπως η σορβιτόλη και η ξυλιτόλη που λαμβάνονται με υδρογόνωση εξοζών και της πεντοζών και συνιστούν σημαντικά προϊόντα στη βιομηχανία τροφίμων. (Kumar & Sharma, 2017) (Irmak, 2017). Πάνω από 1 εκατομμύριο τόνοι σορβιτόλης παράγονται ετησίως

ως συστατικό τροφίμων ή προσωπικής φροντίδας (π.χ. οδοντόκρεμας) και για βιομηχανική χρήση (de Jong & Gosselink, 2014). Η ξυλιτόλη είναι αλκοόλη σακχάρου πεντόζης που χρησιμοποιείται ως υποκατάστατο ζάχαρης στη βιομηχανία τροφίμων λόγω των χαμηλών θερμιδικών και αντικαρκινογόνων ιδιοτήτων της (Irmak, 2017). Ακόμη, μέσω των προαναφερθέντων αλκοολών, μπορεί να παραχθεί γλυκερόλη, που χρησιμοποιείται ευρέως για την παρασκευή βιοδιαλυτών, πολυμερών, επιφανειοδραστικών κλπ. (Kumar & Sharma, 2017).

### *Οξέα*

Το γαλακτικό οξύ και το ηλεκτρικό οξύ μπορούν να ληφθούν μέσω ζυμώσεων από βακτήρια και μούχλα (Kumar & Sharma, 2017). Άλλα σημαντικά οξέα που παράγονται μέσω ζυμώσεων χρησιμοποιώντας ως πρώτη ύλη τη λιγνοκυτταρινούχο βιομάζα είναι το γλυκονικό, προπιονικό, φουμαρικό, ιτακονικό, μηλικό οξύ καθώς και διάφορα αμινοξέα (Tandon, 2014; Irmak, 2017). Πολλά υποσχόμενη είναι, επίσης, η παραγωγή ω-3 λιπαρών οξέων από αυτότροφα ή ετερότροφα συστήματα, όπως μικροφύκη, χρησιμοποιώντας ως πρώτη ύλη υδρόλυμα λιγνοκυτταρινούχου βιομάζας.

## **1.3 ΑΞΙΟΠΟΙΗΣΗ ΒΙΟΜΑΖΑΣ**

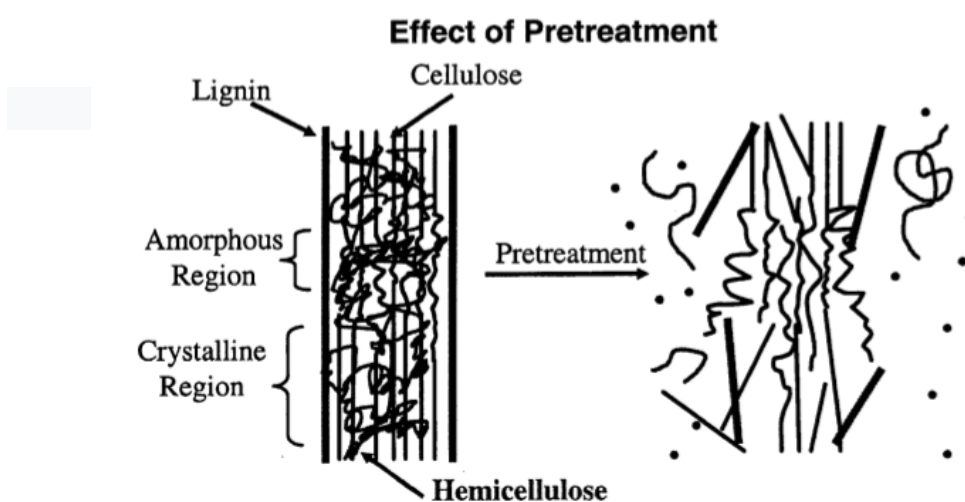
Οι πρώτες ύλες λιγνοκυτταρινούχου βιομάζας έχουν συγκεντρώσει μεγάλο ενδιαφέρον, καθώς αποτελούν πλούσια πηγή για την παραγωγή βιοκαυσίμων και άλλων βιολογικών υλικών υψηλής προστιθέμενης αξίας (Katsimpouras, et al., 2017). Ωστόσο, πληθώρα παραγόντων με κύριους την κρυσταλλικότητα της κυτταρίνης και την πολυπλοκότητα της δομής της λιγνίνης, συνιστούν εμπόδιο για την άμεση βιομετατροπή της και περαιτέρω αξιοποίησή της (Al-Battashi, et al., 2019) (Soni, et al., 2018). Ως εκ τούτου, η διεργασία παραγωγής προϊόντων από λιγνοκυτταρινούχα βιομάζα, όπως γεωργικά ή δασικά υπολείμματα, περιλαμβάνει τα εξής στάδια: προκατεργασία, ενζυμική σακχαροποίηση και ζύμωση (Katsimpouras, et al., 2017).

### **1.3.1 ΠΡΟΚΑΤΕΡΓΑΣΙΑ**

Αρκετοί παράγοντες επηρεάζουν τη μετατροπή της λιγνοκυτταρινούχου βιομάζας όπως η κρυσταλλικότητα της κυτταρίνης, η διαθέσιμη ειδική επιφάνεια, η προστασία της από λιγνίνη και ημικυτταρίνη, ο βαθμός πολυμερισμού της κυτταρίνης και ο βαθμός ακετυλίωσης των ημικυτταρινών (Al-Battashi, et al., 2019). Η προκατεργασία αποτελεί το πρώτο βήμα για να ξεπεραστεί η πολυπλοκότητα και η ανθεκτικότητα της λιγνοκυτταρινούχου βιομάζας, καθιστώντας την κυτταρίνη ευάλωτη στην ενζυμική υδρόλυση. Αποτελεί, επίσης, το πιο δαπανηρό μέρος της διαδικασίας παραγωγής βιοκαυσίμων (Katsimpouras, et al., 2017).

### *Στόχοι Προκατεργασίας*

Κύριοι στόχοι της προκατεργασίας είναι η **απομάκρυνση ή η μεταβολή της λιγνίνης** από το λιγνοκυτταρινούχο πλέγμα, η **μείωση της κρυσταλλικότητας της κυτταρίνης** και η **αύξηση της διαθέσιμης ειδικής επιφάνειας** (Zabed, et al., 2019). Όπως αναφέρθηκε, τα λιγνοκυτταρινούχα υλικά δεν περιέχουν μονοσακχαρίτες που είναι άμεσα διαθέσιμοι για βιομετατροπή. Αντίθετα, περιέχουν πολυσακχαρίτες, όπως κυτταρίνη και ημικυτταρίνες, οι οποίες περιβάλλονται από λιγνίνη, γεγονός που καθιστά τη βιομάζα εξαιρετικά δυσπρόσιτη σε μικροοργανισμούς και ένζυμα (Studer, et al., 2011; Barkodia, et al., 2016). Η προκατεργασία είναι απαραίτητη κυρίως για να αλλάξει η δομή της κυτταρινούχας βιομάζας, για να γίνει **πιο προσβάσιμη η κυτταρίνη στα ένζυμα** που μετατρέπουν τα υδατανθρακικά πολυμερή σε ζυμώσιμα σάκχαρα (Mosier, et al., 2005; Barkodia, et al., 2016). Αποτελεί κρίσιμο στάδιο πριν από την ενζυμική υδρόλυση, καθώς επιταχύνει την αποικοδόμηση της λιγνίνης και οδηγεί σε πιο αποτελεσματική υδρόλυση και υψηλή απόδοση σακχάρων. Ωστόσο, η λιγνίνη και τα ξυλοολιγομερή που απελευθερώνονται κατά τη διάρκεια της προκατεργασίας αναστέλλουν την ενζυμική πέψη με το να προσδέονται μη αναστρέψιμα στα ένζυμα, ή εμποδίζοντας την προσβασιμότητα του υποστρώματος στα ένζυμα (Al-Battashi, et al., 2019). Ακόμη, ένας από τους σημαντικότερους στόχους της «εξευγένισης» της λιγνοκυτταρινούχου βιομάζας είναι η **κλασματοποίηση** της στα τρία μεγάλα της συστατικά: κυτταρίνη, ημικυτταρίνες και λιγνίνη, αυξάνοντας έτσι τη διαθεσιμότητα κάθε συστατικού στα ένζυμα (Isikgor & Becer, 2015) (Soni, et al., 2018). Κατά την προκατεργασία, το μεγαλύτερο μέρος της ποσότητας της ημικυτταρίνης και μικρό ποσοστό κυτταρίνης υδρολύεται προς σχηματισμό μονομερών. Διάφορες στρατηγικές προκατεργασίας περιλαμβάνουν βιολογικές, χημικές και φυσικές διεργασίες (Soni, et al., 2018).



Εικόνα 1.5. Σχηματική αναπαράσταση του στόχου της προκατεργασίας για το λιγνοκυτταρινούχο υλικό (Mosier, et al., 2005)

## **Μέθοδοι Προκατεργασίας**

Μέχρι σήμερα έχουν αναπτυχθεί πολυάριθμες μέθοδοι για τη βελτίωση της απόδοσης των σακχάρων με διαδικασίες προκατεργασίας. Αυτές οι διεργασίες ενισχύουν την αποτελεσματικότητα της σακχαροποίησης καθώς η σακχαροποίηση της μη επεξεργασμένης βιομάζας είναι πολύ αργή και αποδίδει λιγότερα προϊόντα (Soni, et al., 2018). Υπάρχουν διάφορα κριτήρια για την επιλογή της κατάλληλης μεθόδου προκατεργασίας: (α) η επιλεγμένη μέθοδος θα πρέπει να αποφεύγει τη μείωση του μεγέθους των σωματιδίων βιομάζας, (β) το κλάσμα της ημικυτταρίνης θα πρέπει να διατηρείται, (γ) να ελαχιστοποιεί το σχηματισμό προϊόντων αποικοδόμησης που είναι ανασταλτικά για τις μετέπειτα διεργασίες υδρόλυσης και ζύμωσης, (δ) να ελαχιστοποιεί τις ενεργειακές απαιτήσεις και τέλος, (ε) θα πρέπει να περιλαμβάνει έναν καταλύτη προκατεργασίας χαμηλού κόστους ή / και μια φθηνή ανακύκλωση του καταλύτη, καθώς και ανάκτηση των προϊόντων πλούσιων σε λιγνίνη (Kumar & Sharma, 2017).

Οι μέθοδοι προκατεργασίας ταξινομούνται σε δύο ευρείες κατηγορίες: μη βιολογικές και βιολογικές. Η διαφορά τους έγκειται στη χρήση μικροοργανισμών, που λαμβάνει χώρα μόνο κατά τις βιολογικές μεθόδους. Η μη βιολογική προκατεργασία ταξινομείται περαιτέρω σε τρεις κατηγορίες: χημικές, φυσικές και φυσικοχημικές διεργασίες (Soni, et al., 2018).

### **Χημικές Μέθοδοι**

Οι χημικές μέθοδοι περιλαμβάνουν κατεργασία με αραιά οξέα, ήπια αλκάλια, ιοντικά υγρά, βαθείς ευτηκτικούς διαλύτες, φυσικούς βαθείς ευτηκτικούς διαλύτες, οζονόλυση (επεξεργασία με όζον) και οργανικό διαλύτη (επεξεργασία με υδατικούς οργανικούς διαλύτες) (Soni, et al., 2018; Kumar & Sharma, 2017).

### **Φυσικές Μέθοδοι**

Στις φυσικές μεθόδους προκατεργασίας συγκαταλέγονται οι μέθοδοι μηχανικής εξώθησης, άλεσης, πυρόλυσης, μικροκυμάτων, υπερήχων και παλμικού ηλεκτρικού πεδίου. Από αυτές, η μηχανική εξώθηση είναι η πιο συνηθισμένη μέθοδος (Soni, et al., 2018; Kumar & Sharma, 2017).

### **Φυσικοχημικές Μέθοδοι**

Από τις φυσικοχημικές μεθόδους χρησιμοποιούνται συνήθως η υγρή οξείδωση, η προκατεργασία SPORL (Sulfite pretreatment to overcome recalcitrance of lignocellulose), η έκρηξη ατμού, η υδροθερμική προκατεργασία, η προκατεργασία με χρήση αμμωνίας, η έκρηξη CO<sub>2</sub> και οι μέθοδοι οξειδωτικής προκατεργασίας (Soni, et al., 2018; Kumar & Sharma, 2017).

### **Ήπια Οργανολυτική οξείδωση**

Μεταξύ των μεθόδων προκατεργασίας που έχουν προσελκύσει πρόσφατα το ενδιαφέρον είναι οι διεργασίες organosolv, οι οποίες χρησιμοποιούν οργανικούς

διαλύτες για την απομάκρυνση του κλάσματος της λιγνίνης με ή χωρίς προσθήκη καταλύτη (οξύ, βάση ή άλας) (Katsimpouras, et al., 2017) (Salara, et al., 2017). Το μείγμα αυτό υδρολύει μερικώς δεσμούς λιγνίνης και λιγνίνης - υδρογονανθράκων, οδηγώντας σε ένα στερεό υπόλειμμα που αποτελείται κυρίως από κυτταρίνη και κάποια ημικυτταρίνη (Salara, et al., 2017). Η απομάκρυνση της λιγνίνης από τη βιομάζα εκθέτει τις ίνες κυτταρίνης προς ενζυμική υδρόλυση οδηγώντας σε υψηλότερη μετατροπή της βιομάζας (Kumar & Sharma, 2017).

Αν και η αιθανόλη φαίνεται να είναι ο πιο δημοφιλής οργανικός διαλύτης κατά τη διάρκεια των ετών, έχουν μελετηθεί και άλλοι διαλύτες όπως η μεθανόλη (Gilarranz, et al., 1999), η ακετόνη (Huijgen, et al., 2010), το μυρμηκικό οξύ, το οξικό οξύ (Snelders, et al., 2014; Daría, et al., 2002) και η γλυκερόλη (Sun, et al., 2015). Ενδιαφέρον παρουσιάζει, επίσης, και η χρήση του τετραϋδροφουράνιου (THF). Πρόκειται για έναν διαλύτη χαμηλού ιξώδους που μπορεί να παραχθεί με βιώσιμο τρόπο από βιομάζα μέσω καταλυτικής αποκαρβοξυλίωσης και υδρογόνωσης φουρφουράλης. Είναι αναμίξιμο με το νερό και το χαμηλό σημείο ζέσεώς του (66 ° C) επιτρέπει την εύκολη ανάκτησή του (Nguyen, et al., 2015).

Η υγρή οξείδωση της βιομάζας που χρησιμοποιεί θερμό νερό, αλκάλια και οξυγόνο έχει βρεθεί ότι είναι μια ενδιαφέρουσα μέθοδος προκατεργασίας. Σε σύγκριση με την έκρηξη ατμού, έχει βρεθεί ότι παράγει πολύ λιγότερα προϊόντα αποικοδόμησης, όπως ενώσεις 2-φουρφουράλης και 5-υδροξυμεθυλ-2-φουρφουράλης, που είναι γνωστοί αναστολείς της μικροβιακής ανάπτυξης. Ως περαιτέρω εξέλιξη, πρόσφατα αναπτύχθηκε μια νέα διαδικασία οξείδωσης ακετόνης / νερού (AWO) που ονομάζεται ήπια οργανολυτική οξείδωση. Σε αυτή τη διαδικασία, χρησιμοποιείται ένα μίγμα ακετόνης / νερού αντί του νερού, χωρίς χρήση αλκαλίων, αλλά μόνο οξυγόνου (Katsimpouras, et al., 2017). Στην παρούσα διπλωματική εργασία, πέρα από την ακετόνη, χρησιμοποιούνται διαλύτες όπως η αιθανόλη και το τετραϋδροφουράνιο σε ανάμιξη με το νερό.

#### *Παράγοντες που επηρεάζουν τα χαρακτηριστικά της προκατεργασμένης βιομάζας*

Τα φυσικά χαρακτηριστικά της προκατεργασμένης βιομάζας όπως το μήκος της ίνας, ο βαθμός πολυμερισμού κυτταρίνης και η κρυσταλλικότητα εξαρτώνται από μεταβλητούς παράγοντες όπως η θερμοκρασία, ο χρόνος αντίδρασης, η συγκέντρωση του διαλύτη και ο χρησιμοποιούμενος καταλύτης. Σχετικές αναφορές δείχνουν ότι οι υψηλές θερμοκρασίες, οι υψηλές συγκεντρώσεις οξέων και ο μακρύς χρόνος αντίδρασης έχουν οδηγήσει στο σχηματισμό αναστολέων της ζύμωσης (Kumar & Sharma, 2017). Η θερμοκρασία στην προκατεργασία με οργανικό διαλύτη εξαρτάται από τον τύπο της βιομάζας και του καταλύτη και μπορεί να φτάσει έως και 200 ° C (Kumar & Sharma, 2017).

#### *Πλεονεκτήματα και μειονεκτήματα της μεθόδου*

Η ήπια οργανολυτική οξείδωση συνδυάζει τα πλεονεκτήματα της υγρής οξείδωσης όπως η χαμηλή θερμοκρασία και η χαμηλή απόδοση των προϊόντων αποικοδόμησης σε ένα στάδιο της διαδικασίας, επιτυγχάνοντας ταυτόχρονα πολύ υψηλότερη

απολιγνίνωση της βιομάζας. Η χρήση ακετόνης/αιθανόλης/THF και νερού, δύο εύκολα διαχωρίσιμων και ανακυκλώσιμων διαλυτών, επιτρέπει την ανάπτυξη μιας πράσινης διεργασίας, με χαμηλή κατανάλωση ενέργειας και χαμηλό κόστος (Katsimpouras, et al., 2017). Τα κύρια πλεονεκτήματα αυτών των μεθόδων, λοιπόν, είναι ότι οι διαλύτες και τα υλικά μπορούν να ανακτηθούν και να επαναχρησιμοποιηθούν (Katsimpouras, et al., 2017). Η απομάκρυνση των διαλυτών είναι πολύ σημαντική επειδή ο διαλύτης μπορεί να προκαλέσει αρνητικές επιπτώσεις στην ανάπτυξη των μικροοργανισμών, την ενζυμική υδρόλυση και ζύμωση (Kumar & Sharma, 2017). Επίσης, η ελαχιστοποίηση της αποικοδόμησης των διαλυμένων κλασμάτων επιτρέπει τη χρήση τους για την παραγωγή χημικών ουσιών υψηλής προστιθέμενης αξίας, όπως φαινόλες και υδροξυμεθυλοφουρφουράλες. Επιπλέον, οι παραγόμενοι πολτοί ζυμώνονται ευκολότερα μειώνοντας το συνολικό κόστος παραγωγής βιοκαυσίμων (Katsimpouras, et al., 2017). Η μόνη δυσκολία συνίσταται στον χειρισμό των οργανικών διαλυτών που είναι εξαιρετικά εύφλεκτοι, γι' αυτό και κρίνεται απαραίτητη η λήψη κατάλληλων μέτρων ασφαλείας (Kumar & Sharma, 2017).

### **Ολοκληρωμένες Μέθοδοι**

Οι ολοκληρωμένες διεργασίες προκατεργασίας (συνδυασμός δύο ή περισσότερων διεργασιών) κερδίζουν την προσοχή αυτές τις μέρες καθώς μειώνουν τον αριθμό των λειτουργικών βημάτων και την παραγωγή ανεπιθύμητων αναστολέων. Περιλαμβάνουν διάφορα πλεονεκτήματα όπως (α) αύξηση της απόδοσης σε σάκχαρα κατά τη διάρκεια της ενζυματικής υδρόλυσης λόγω της παραγωγής εξαιρετικά ζυμώσιμων στερεών, (β) την ελαχιστοποίηση του σχηματισμού αναστολέων για τα επόμενα στάδια της ζύμωσης και (γ) την ανάκτηση λιγνίνης για μετατροπή σε προϊόντα προστιθέμενης αξίας (Soni, et al., 2018; Kumar & Sharma, 2017). Χαρακτηριστικά παραδείγματα αποτελούν οι συνδυασμοί προκατεργασιών υγρής οξειδωσης με προσθήκη αλκαλίων (Bjerre, et al., 1996), προσθήκη αλκαλίων και αραιωμένων οξέων (Lu, et al., 2009), υπερκρίσιμου CO<sub>2</sub> με έκρηξη ατμού (Alinia, et al., 2010), προκατεργασία με αμμωνία και ιονικό υγρό (Nguyen, et al., 2010), οργανολυτικών μεθόδων με βιολογικές (Monroy, et al., 2010) και άλλα.

### **Βιολογικές Μέθοδοι**

Η βιολογική μέθοδος προκατεργασίας είναι μια οικονομική και φιλική προς το περιβάλλον διεργασία σε σύγκριση με τη μη βιολογική. Αυτή η μέθοδος περιλαμβάνει τη χρήση μικροοργανισμών, κυρίως μυκήτων, οι οποίοι ευνοούν την επιλεκτική αποικοδόμηση της λιγνίνης της λιγνοκυτταρινούχου βιομάζας και βελτιώνουν τη σακχαροποίησή της (Soni, et al., 2018).

## **1.3.2 ΣΑΚΧΑΡΟΠΟΙΗΣΗ**

Η κυτταρίνη και η ημικυτταρίνη στη λιγνοκυτταρινούχα βιομάζα μπορούν να υδρολυθούν είτε ενζυματικά είτε χημικά, σε σάκχαρα, όπως γλυκόζη, ξυλόζη κλπ., τα



οποία αποτελούν πιθανές πηγές άνθρακα για την παραγωγή χημικών προστιθέμενης αξίας. Γενικά, η όξινη και ενζυμική υδρόλυση βιομάζας είναι οι πιο συνηθισμένες και ευρέως χρησιμοποιούμενες μέθοδοι στην πράξη (Al-Battashi, et al., 2019). Εντούτοις, η ενζυμική υδρόλυση θεωρείται ως καταλληλότερη επειδή απαιτεί λιγότερη ενέργεια και ήπιες συνθήκες περιβάλλοντος, ενώ παράλληλα παράγονται λιγότερα προϊόντα αναστολής της ζύμωσης (Maitan-Alfenas, et al., 2015).

### **Όξινη Υδρόλυση**

Μεταξύ των διαφόρων μεθόδων υδρόλυσης, η όξινη υδρόλυση είναι ευρέως γνωστή και χρησιμοποιείται πολύ καθώς μπορεί να διεισδύσει στη λιγνίνη και να διασπάσει τόσο την κυτταρίνη όσο και την ημικυτταρίνη για να παράγει απλά σάκχαρα, χωρίς να έχει προηγηθεί προκατεργασία της βιομάζας. Γενικά, η όξινη υδρόλυση μπορεί να γίνει χρησιμοποιώντας είτε πυκνό (10-30%) είτε αραιωμένο (2-5%) θειικό οξύ, υδροχλωρικό οξύ, ανόργανα οξέα (φωσφορικό και νιτρικό οξύ) και μερικά οργανικά οξέα (μυρμηκικό οξύ). Η όξινη υδρόλυση με πυκνά οξέα απαιτεί μέτρια θερμοκρασία και παράγει υψηλής απόδοσης γλυκόζη (90%), αλλά προκαλεί δριμύτατη διάβρωση και βλάβες στον εξοπλισμό. Από την άλλη, η υδρόλυση με χρήση αραιωμένου οξέος απαιτεί υψηλές θερμοκρασίες για να επιτευχθεί ικανοποιητική απόδοση σακχάρων και αποικοδόμηση κυτταρίνης. Αν και η υδρόλυση βιομάζας με τη χρήση συμπυκνωμένου και αραιωμένου οξέος είναι γρήγορη και εύκολα εκτελέσιμη μέθοδος για την παραγωγή σακχάρων, οδηγεί στην παραγωγή προϊόντων αποικοδόμησης όπως η φουρφουράλη και η HMF, η οποία αναστέλλει σημαντικά την κυτταρική ανάπτυξη και απόδοση του προϊόντος (Al-Battashi, et al., 2019; Palmqvist & Hahn-Hägerdal, 2000). Αναφορές δείχνουν ότι το φωσφορικό οξύ είναι συγκριτικά λιγότερο επιζήμιο από άλλα οξέα και παράγει λιγότερους αναστολείς ανάπτυξης (Lenihan, et al., 2010).

### **Ενζυμική Υδρόλυση**

Σε αντίθεση με την όξινη, η ενζυμική υδρόλυση λαμβάνει χώρα σε ήπιες συνθήκες θερμοκρασίας (45–50°C) και πίεσης (Xiros, et al., 2013) (Mohanram, et al., 2013). Ως αποτέλεσμα, οι αποδόσεις γλυκόζης είναι υψηλές, οι πιθανότητες για την αποικοδόμηση των σακχάρων και την παραγωγή αναστολέων ζύμωσης είναι λιγότερες, οι απαιτήσεις σε εξοπλισμό δεν είναι σημαντικές και υπάρχει μείωση των συνολικών περιβαλλοντικών επιπτώσεων ολόκληρης της διαδικασίας καθώς τα ένζυμα αποτελούν βιοδιασπώμενους, ανανεώσιμους πόρους (Xiros, et al., 2013). Έτσι, η ενζυμική υδρόλυση θεωρείται ως η πιο ελπιδοφόρα προσέγγιση, καθώς είναι μια ήπια και φιλική προς το περιβάλλον διεργασία που απαιτεί λιγότερη ενέργεια (Maitan-Alfenas, et al., 2015).

Για την αποδόμηση της σύνθετης λιγνοκυτταρινούχου δομής, ως επί το πλείστον, απαιτούνται πολλαπλά ένζυμα με διαφορετικές ιδιότητες. Συγκεκριμένα, μια συνεργιστική δράση λιγνοκυτταρινασών -κυτταρινασών, ημικυτταρινασών, λιγνασών (λιγνινολυτικών ενζύμων) και, πιο πρόσφατα, μιας κατηγορίας ενζύμων καλούμενη

LPMOs (lytic polysaccharide mono-oxygenases)- απαιτείται για την αποτελεσματική αποδόμηση του προκατεργασμένου λιγνοκυτταρινούχου υλικού (Obeng, et al., 2017).

## Κυτταρινάσες

Οι κυτταρινάσες ανήκουν στην οικογένεια των υδρολασών των γλυκοζιδίων (GH), ενζύμων, που καταλύουν την υδρόλυση των β-1,4-γλυκοζιδικών δεσμών κυτταρίνης προς γλυκόζη. Τα ένζυμα αποικοδόμησης της κυτταρίνης περαιτέρω ταξινομούνται σε τρεις κύριες ομάδες σύμφωνα με τη δομή και τη λειτουργία τους: ενδογλουκανάσες (EG), εξωγλουκανάσες (κελλοβιοϋδρολάσες, CBH) και β-γλυκοζιδάσες (BGL), που ανήκουν στην κλάση EC 3.2.1.X (Ezeilo, et al., 2017). Για την υδρόλυση της κυτταρίνης προς διαλυτά σάκχαρα, που μπορούν να μεταβολιστούν από μικροοργανισμούς με διαδικασίες ζύμωσης, απαιτείται η δράση πολλαπλών ενζύμων (Xiros, et al., 2013), των οποίων οι λειτουργίες αναλύονται παρακάτω.

- **β-1,4-Ενδογλουκανάση ή Γλουκανοϋδρολάση (EC 3.2.1.4):** Οι ενδογλουκανάσες δρουν τυχαία στους εσωτερικούς γλυκοζιτικούς δεσμούς της άμορφης περιοχής της αλυσίδας της κυτταρίνης, δημιουργώντας έτσι νέα άκρα αλυσίδας και ολιγοσακχαρίτες με ποικίλα μήκη. Είναι δραστικές έναντι διαλυτών μορφών κυτταρίνης όπως η καρβοξυμεθυλοκυτταρίνη (CMC) και η άμορφη κυτταρίνη (Sharma, et al., 2016; Maitan-Alfenas, et al., 2015).
- **Εξωγλουκανάσες:**
  - **Κελλοβιοϋδρολάση (EC 3.2.1.91):** Αυτό το ένζυμο δρα στα αναγωγικά ή μη αναγωγικά άκρα της αλυσίδας της κυτταρίνης. Με βάση το κύριο προϊόν που λαμβάνεται μετά τη δράση του, ονομάζεται γλουκανοϋδρολάση (απελευθέρωση γλυκόζης) και κελλοβιοϋδρολάση (απελευθέρωση κελλοβιόζης). Είναι δραστικό σε κρυσταλλικά υποστρώματα όπως το avicel, οι κελλο-ολιγοσακχαρίτες και άλλα.
  - **D-Κελλοδεξτρινάση (EC 3.2.1.74):** Δρα για την απομάκρυνση της κελλοβιόζης από τους κελλοολιγοσακχαρίτες. Είναι γενικά αδρανής έναντι της άμορφης κυτταρίνης ή των διαλυτών μορφών όπως το CMC.
- **β-γλυκοζιδάση (EC 3.2.1.21):** Δρα σε μη αναγωγικά άκρα και υδρολύει τους κελλοολιγοσακχαρίτες και την κελλοβιόζη σε γλυκόζη. Είναι ανενεργό τόσο έναντι της κρυσταλλικής όσο και της άμορφης κυτταρίνης (Sharma, et al., 2016) (Soni, et al., 2018) (Ezeilo, et al., 2017).

Αξίζει να σημειωθεί ότι τα προϊόντα από τη δράση τόσο των ενδο- όσο και των εξωγλουκανάσεων μπορούν να αναστείλουν το αντίστοιχο ένζυμο, κάτι που ονομάζεται ανάδρομη αναστολή (Obeng, et al., 2017). Οι κυτταρινάσες και η β-γλυκοζιδάση αναστέλλονται από την κελλοβιόζη και τη γλυκόζη, αντίστοιχα. Όπως είναι φυσικό, η αναστολή του ενζύμου από το αντίστοιχο προϊόν μειώνει την απόδοση της υδρόλυσης (Palmqvist & Hahn-Hägerdal, 2000). Η προσθήκη β-γλυκοζιδάσης κατά τη διάρκεια της ενζυμικής υδρόλυσης μπορεί να μειώσει την αναστολή των κυτταρινάσεων σε κάποιο βαθμό. Ωστόσο, υψηλή περιεκτικότητα γλυκόζης στο υδρόλυμα αναστέλλει τόσο τις δραστικότητες της β-γλυκοζιδάσης όσο και των κυτταρινάσεων (Andrić, et al., 2010).

## Ημικυτταρινάσες

Η υδρόλυση του κλάσματος της ημικυτταρίνης απαιτεί μια πιο περίπλοκη ομάδα ενζύμων, που αναφέρονται ως ημικυτταρινάσες (Maitan-Alfenas, et al., 2015). Η ομάδα αυτή περιλαμβάνει ένζυμα όπως υδρολάσες γλυκοζιδίων (GH), εστεράσες υδατανθράκων, λυάσες πολυσακχαριτών, ενδο-ημικυτταρινάσες και άλλα. Η συνδυασμένη δράση τους υδρολύει γλυκοζιδικούς δεσμούς, δεσμούς εστέρων και απομακρύνει πλευρικές αλυσίδες ή υποκαταστάτες της αλυσίδας. Ονομαστικά την ομάδα αυτήν αποτελούν η ενδο-1,4-β-ξυλανάση, β-ξυλοζιδάση, β-μαννανάση, α-γλυκουρονιδάση, β-μαννοσιδάση, α-L-αραβινοφουρανοσιδάση, ακετυλοξυλανεστέρα και άλλα ένζυμα (Mohanram, et al., 2013).

Η ενζυμική αποικοδόμηση της ημικυτταρίνης επικεντρώνεται κυρίως στην ξυλάνη, που είναι η κύρια ημικυτταρίνη των σκληρών ξύλων και γεωργικών κατάλοιπων (Karnaouri, et al., 2016) (Gaurav, et al., 2017). Για την πλήρη υδρόλυσή της απαιτείται η δράση μιας ενδο-β-1,4-ξυλανάσης (EC 3.2.1.8), η οποία δρα τυχαία στον εσωτερικό δεσμό της ξυλάνης για την απελευθέρωση των ξυλο-ολιγοσακχαριτών, μιας β-ξυλοζιδάσης (EC 3.2.1.37) που υδρολύει τα μη αναγωγικά άκρα αλυσίδων ξυλάνης για την απελευθέρωση ξυλόζης, και διαφόρων βοηθητικών ενζύμων συμπεριλαμβανομένου της α-L-αραβινοφουρανοσιδάσης (EC 3.2.1.55), α-γλυκουρονιδάσης (EC 3.2.1.139), α-γαλακτοζιδάσης (EC 3.2.1.22), ακετυλοξυλάνη εστεράσης (EC 3.1.1.72) και εστεράσης του φερουλικού οξέος (EC 3.1.1.73) (Maitan-Alfenas, et al., 2015). Οι α-γλυκουρονιδάσες, α-αραβινοφουρανοσιδάσες, μαννανάσες και οι α-γαλακτοζιδάσες δρουν στους γλυκοζιδικούς δεσμούς ενώ οι ακετυλο- ή φερούλο-εστεράσες υδρολύουν τους εστερικούς δεσμούς οξικών ή φερούλικών οξέων των πλευρικών ομάδων στην δομή του τοιχώματος των φυτικών κυττάρων (Obeng, et al., 2017).

Στις περισσότερες περιπτώσεις, οι ημικυτταρινάσες χρησιμοποιούνται σε συνδυασμό με τις κυτταρινάσες στον αποπολυμερισμό της λιγνοκυτταρινούχου βιομάζας σε ζυμώσιμα σάκχαρα. Δεδομένου ότι η ημικυτταρίνη παρουσιάζει πλούσια πηγή άνθρακα, η επιτυχής της υδρόλυση βελτιώνει την απόδοση σε ζυμώσιμα σάκχαρα (Obeng, et al., 2017).

## LPMOs

Πρόσφατες μελέτες έχουν αναδείξει μια ομάδα οξειδωτικών ενζύμων, ονόματι LPMOs, ως βασικούς συντελεστές στην αποσύνθεση της βιομάζας. Σύμφωνα με τις αναφορές, τα LPMOs ενισχύουν τη λειτουργικότητα των κανονικών κυτταρινασών βελτιώνοντας την προσβασιμότητα του υποστρώματος στην αλυσίδα της κυτταρίνης και προκαλώντας «κενά» σε αυτήν με οξειδωτικά μέσα (Obeng, et al., 2017).

## Πηγές ενζύμων αποικοδόμησης του κυτταρικού τοιχώματος

Οι κυτταρινάσες προέρχονται συνήθως από διάφορους οργανισμούς, κυρίως από μύκητες, ακτινομύκητες, βακτήρια και πρωτόζωα, αν και είναι γνωστές και κάποιες φυτικές και ζωικές κυτταρινάσες (Kim & Kim, 2012) (Soni, et al., 2018). Επίσης, τόσο αερόβιοι όσο και αναερόβιοι μικροοργανισμοί έχουν την ικανότητα να αποικοδομούν

την κυτταρίνη. Από αυτούς, ιδιαίτερο ενδιαφέρον έχει δοθεί στους αερόβιους μύκητες και τα βακτήρια λόγω των ευνοϊκών χαρακτηριστικών τους όπως η ταχεία ανάπτυξη και οι καλύτεροι τίτλοι ενζύμων που επιτυγχάνουν (Soni, et al., 2018). Επίσης, έχουν την ικανότητα να εκφράζουν λειτουργικά μια ποικιλία πολλαπλών, ισόμορφων ενζύμων που αποικοδομούν το κυτταρικό τοίχωμα, ως αποτέλεσμα γενετικού πλεονασμού, διαφορικής επεξεργασίας mRNA ή μετα-μεταφραστικών τροποποιήσεων (Badhan, et al., 2007). Ως εκ τούτου, έχουν γίνει το επίκεντρο της σύγχρονης βιομηχανίας κυτταρινασών.

### *Μύκητες*

Τόσο οι μύκητες όσο και τα βακτήρια έχουν μελετηθεί σε μεγάλο βαθμό για την ικανότητά τους να παράγουν μια ευρεία ποικιλία κυτταρινασών και ημικυτταρινασών για την υδρόλυση των λιγνοκυτταρινούχων υλικών. Ωστόσο, σε βιομηχανικό επίπεδο ιδιαίτερη έμφαση έχει δοθεί στη χρήση μυκήτων λόγω της ικανότητάς τους να παράγουν άφθονες ποσότητες κυτταρινασών και ημικυτταρινασών εξωκυτταρικά, καθιστώντας εύκολη την εκχύλιση και τον καθαρισμό τους (Mohanram, et al., 2013). Τα στελέχη *Trichoderma* και *Aspergillus*, φυσικά ή γενετικά τροποποιημένα, αποτελούν συχνούς μικροοργανισμούς επιλογής για τη βιομηχανική παραγωγή κυτταρινασών και ημικυτταρινασών (Yang, et al., 2011) (Maitan-Alfenas, et al., 2015). Οι κυτταρινάσες από *Aspergillus* συνήθως έχουν υψηλή δραστηριότητα β-γλυκοζιδάσης, αλλά χαμηλότερα επίπεδα ενδογλουκανάσης, ενώ το στέλεχος *Trichoderma* διαθέτει ενδο- και εξωγλουκανάσες με χαμηλότερα επίπεδα β-γλυκοζιδάσης και επομένως έχει περιορισμένη αποτελεσματικότητα στην υδρόλυση της κυτταρίνης (Mohanram, et al., 2013).

Είναι ήδη γνωστό ότι τα εκχυλίσματα ενζύμων που λαμβάνονται από έναν μόνο μικροοργανισμό δεν είναι τόσο αποτελεσματικά στην υδρόλυση βιομάζας, κυρίως λόγω της έλλειψης ισορροπίας των ενζύμων. Τα «κοκτέιλ» περιέχουν διαφορετικά ένζυμα σε επαρκή αναλογία, έτσι ώστε να είναι εξειδικευμένα για τις επιμέρους συνθέσεις των προκατεργασμένων βιομαζών. Περαιτέρω, τα ένζυμα πρέπει να παρουσιάζουν σταθερότητα σε θερμοκρασίες και περιοχές pH, αντίσταση στην αναστολή του προϊόντος, συνεργιστική δράση και μεγάλη καταλυτική δραστηριότητα. Η ανάμειξη μεμονωμένων ενζύμων και η συμπλήρωση των ακατέργαστων εκχυλισμάτων ενζύμου με κατάλληλες δραστηριότητες είναι πολλά υποσχόμενη, καθώς μπορεί να οδηγήσει σε συνεργιστικές επιδράσεις για τη βελτίωση της αποτελεσματικότητας της σακχαροποίησης της βιομάζας, για μια μεγάλη ποικιλία λιγνοκυτταρινούχων υποστρωμάτων (Maitan-Alfenas, et al., 2015) (Karnaouri, et al., 2016).

Οι εμπορικές κυτταρινάσες παράγονται σχεδόν όλες από αερόβιους κυτταρινολυτικούς μύκητες, όπως *Hypocrea jecorina* (*Trichoderma reesei*), που αποτελεί την πιο συνηθισμένη πηγή, ή *Humicola insolens*. Αυτό οφείλεται στο ότι τα κατασκευασμένα στελέχη των οργανισμών αυτών είναι ικανά να παράγουν εξαιρετικά μεγάλες ποσότητες ακατέργαστης κυτταρινάσης (πάνω από 100 g ανά λίτρο) με σχετικά υψηλή εκλεκτικότητα στην κρυσταλλική κυτταρίνη. Επίσης, τα στελέχη αυτά μπορούν να

τροποποιηθούν γενετικά έτσι ώστε να το σύνολο των παραγόμενων ενζύμων να παρουσιάζει βέλτιστη δραστηριότητα, για συγκεκριμένες χρήσεις (Mohanram, et al., 2013). Τα μίγματα κυτταρινάσης του *T.reesei* αποτελούνται κυρίως από εξωγλουκανάσες, οι οποίες συνεισφέρουν έως και στο 80% της συνολικής πρωτεΐνης, ενδογλουκανάσες (μέχρι 15% της συνολικής πρωτεΐνης), και μικρότερες ποσότητες ενζύμων με άλλες υδρολυτικές δραστηριότητες. Ο *T.reesei* επίσης διαθέτει ενδοκυτταρική β-γλυκοζιδάση για την αποφυγή επιδράσεων ανάδρομης αναστολής της κελλοβιόζης κατά την διάρκεια της υδρόλυσης της κυτταρίνης. Ωστόσο, τα επίπεδα των β-γλυκοσιδάσεων στα μίγματα κυτταρινάσης του *T.reesei* είναι ως επί το πλείστον χαμηλά και, συνεπώς, απαιτούνται συμπληρώματα από άλλες πηγές όπως από το *Aspergilli* (Obeng, et al., 2017).

### Εμπορικά σκευάσματα

Η χρήση εμπορικών σκευασμάτων ενζύμων για την υδρόλυση προκατεργασμένων λιγνοκυτταρινούχων υλικών οδηγεί σε υψηλές μετατροπές βιομάζας. Γνωστά εμπορικά σκευάσματα κυτταρινασών/ημικυτταρινασών αποτελούν τα Cellic® CTec2 και Celluclast (όλα από την Novozymes A / S, Bagsvaerd, Δανία).

Το εμπορικό προϊόν κυτταρινάσης Celluclast, που προέρχεται από *Trichoderma reesei* (Novozymes A / S, Bagsvaerd, Denmark), χρησιμοποιείται ευρέως για υδρόλυση τροφοδοτικών υλικών λιγνοκυτταρινούχου βιομάζας. Αυτό το παρασκεύασμα ενζύμου περιέχει ένα ευρύ φάσμα κυτταρινολυτικών ενζυμικών δραστηριοτήτων, κυρίως κελλοβιοϋδρολάσες (CBHs) και ενδο-1,4-β-γλουκανάσες (EGs). Ωστόσο, υστερεί β-γλυκοζιδάσης. Επίσης, οι δραστηριότητες των περιεχόμενων ενζύμων CBH και EG δεν βρίσκονται στη βέλτιστη αναλογία για την υδρόλυση των προκατεργασμένων λιγνοκυτταρινικών υποστρωμάτων (Rosgaard, et al., 2007). Σε αντίθεση με το Celluclast, το εμπορικό σκεύασμα Cellic® CTec2 περιλαμβάνει πέρα από υψηλές δραστηριότητες κελλοβιοϋδρολασών, β-γλυκοζιδάσης και ξυλανάσης, (Yang, et al., 2017), μικρότερες δραστηριότητες βοηθητικών ενζύμων LPMOs, που ενισχύουν τη δράση των κυτταρινασών (Sun, et al., 2015). Ωστόσο, μελέτες αναφέρουν ότι η αναλογία των ενζυμικών αυτών δραστηριοτήτων στο σκεύασμα είναι βελτιστοποιημένη για την υδρόλυση συγκεκριμένου τύπου προκατεργασμένων λιγνοκυτταρινούχων υποστρωμάτων (Yang, et al., 2017).

Σε σχετικό πείραμα που πραγματοποιήθηκε από τον Rodriguez και την ομάδα του, άχυρο σίτου υπέστη υδροθερμική προκατεργασία στην πιλοτική εγκατάσταση Inbicon (Skærbæk, Δανία) και εν συνεχεία υδρολύθηκε χρησιμοποιώντας δύο διαφορετικές εμπορικές κυτταρινάσες, Cellic® CTec2 και Celluclast, με ενζυμικό φορτίο 10 FPU / g κυτταρίνης. Το Cellic ήταν ικανό να μετατρέψει πάνω από το 98% των γλυκανών ενώ με τη χρήση Celluclast, χωρίς συμπλήρωμα β-γλυκοζιδάσης (Novozyme 188), η απόδοση των διαλυτών σακχάρων έφθασε μόλις το 52% μετά από 96 ώρες υδρόλυσης. Η συμπλήρωση του Celluclast με β-γλυκοζιδάση (Novozyme 188) βελτίωσε σημαντικά τη συνολική απόδοση της υδρόλυσης, επιτυγχάνοντας μετατροπή 81% (Rodrigues, et al., 2015).

### *Κυτταρινολυτικά ένζυμα παραγόμενα από ανασυνδυασμένα στελέχη μικροοργανισμών*

Η ανασυνδυασμένη τεχνολογία μπορεί πάντα να χρησιμοποιηθεί για τη βελτίωση της ενζυμικής παραγωγής σε ομόλογα και ετερόλογα συστήματα και έχουν αναπτυχθεί αρκετές μέθοδοι για την αύξηση της παραγωγής ανασυνδυασμένης πρωτεΐνης στους μύκητες και τη βελτίωση των χαρακτηριστικών της όπως η δραστικότητα και σταθερότητα (Maitan-Alfenas, et al., 2015; Obeng, et al., 2017).

Αξιοσημείωτες είναι οι προσπάθειες που έχουν καταβληθεί για τη βελτίωση της παραγωγής κυτταρινασών στο *T.reesei* με ομόλογη ή ετερόλογη υπερέκφραση γονιδίων β-γλυκοζιδάσης (Dashtban & Qin, 2012). Για παράδειγμα, ο Dashtban και η ομάδα του κατασκεύασαν ένα θερμοσταθερό γονίδιο από τον μύκητα *Periconia sp.* στο γονιδίωμα του στελέχους *T. reesei* QM9414. Το τροποποιημένο στέλεχος *T.reesei* έδειξε περίπου 10,5 φορές (23,9 IU / mg) υψηλότερη δραστικότητα β-γλυκοζιδάσης σε σύγκριση με το γονικό στέλεχος (2,2 IU / mg) μετά από 24 ώρες επώασης. Σε επόμενο στάδιο, τα μετασηματισμένα στελέχη χρησιμοποιήθηκαν για την ενζυμική υδρόλυση προκατεργασμένου με Organosolv άχυρου κριθαριού. Μετά από 72 ώρες επώασης, οι μέγιστοι τίτλοι αναγωγικών σακχάρων και γλυκόζης που λήφθηκαν από το ικανότερο μετασηματισμένο στέλεχος (19,42 και 9,71 mg / mL αντίστοιχα) ήταν 3,67 και 2,55 φορές, αντίστοιχα, υψηλότεροι από αυτούς του γονικού στελέχους (5,28 και 3,80 mg / mL) (Dashtban & Qin, 2012).

Σε παρόμοια μελέτη του Ma και των συνεργατών του, μία κωδικοποιητική αλληλουχία β-γλυκοζιδάσης από *Penicillium decumbens* συνδέθηκε με τον προαγωγό κελλοβιοϋδρολάσης (cbh1) του *T. reesei* και εισήχθη στο γονιδίωμα του στελέχους *T.reesei* Rut-C30. Σε σύγκριση με το γονικό στέλεχος, η δραστικότητα β-γλυκοζιδάσης του ενζυμικού συμπλόκου από δύο επιλεγμένα μετασηματισμένα κύτταρα αυξήθηκε κατά 6- έως 8 φορές και η ενεργότητά τους (FPAs) αυξήθηκε κατά 30% κατά μέσο όρο. Η ικανότητα σακχαροποίησης του μετασηματισμένου συμπλόκου ως προς το προκατεργασμένο αραβόσιτο ενισχύθηκε επίσης σημαντικά. Για να επιβεβαιωθεί περαιτέρω η επίδραση της ετερόλογης β-γλυκοζιδάσης στην ενεργότητα της κυτταρινάσης του *T. reesei*, το ετερόλογα εκφραζόμενο ένζυμο καθαρίστηκε και προστέθηκε στο σύμπλοκο ενζύμου που παρήχθη από τον *T. reesei* Rut-C30. Η συμπλήρωση του συμπλόκου ενζύμου RutC30 με τη β-γλυκοζιδάση προκάλεσε περίπου 80% αύξηση της απόδοσης γλυκόζης κατά τη διάρκεια της σακχαροποίησης του προκατεργασμένου αραβοσίτου (Ma, et al., 2011).

### **1.3.3 ZYMΩΣΕΙΣ**

Στο στάδιο αυτό τα μονομερή προϊόντα που λαμβάνονται μετά την υδρόλυση της βιομάζας μετατρέπονται σε πολύτιμες ενώσεις. Ανάλογα με το σχεδιασμό της διεργασίας, τα στάδια υδρόλυσης και ζύμωσης μπορούν να διεξαχθούν ξεχωριστά (διακριτή υδρόλυση και ζύμωση ή SHF) ή ταυτόχρονα (ταυτόχρονη σακχαροποίηση και ζύμωση ή SSF). Στην SHF, τα υδρολυμένα προϊόντα υποβάλλονται σε ζύμωση σε

ξεχωριστό στάδιο. Στην SSF, η διαδικασία της υδρόλυσης της προκατεργασμένης βιομάζας ακολουθείται από ζύμωση των μονομερών (προϊόντων υδρόλυσης) στον ίδιο αντιδραστήρα (Soni, et al., 2018). Σημαντική είναι, επίσης, η διεργασία ενοποιημένης βιομετατροπής (CBP) κατά την οποία πραγματοποιείται παραγωγή ενζύμων, ανάπτυξη μικροοργανισμών, ενζυμική υδρόλυση και ζύμωση στον ίδιο αντιδραστήρα. Όταν εμπλέκονται C5 σάκχαρα (πεντόζες), μία τέταρτη διεργασία, η ταυτόχρονη σακχαροποίηση και συν-ζύμωση (SScF), λαμβάνεται υπόψιν (Xiros, et al., 2013). Περαιτέρω, οι διεργασίες αυτές μπορούν να διακριθούν σε διαλείποντος, ημιδιαλείποντος αλλά και συνεχούς έργου (Maitan-Alfenas, et al., 2015).

### **1.3.3.1 Διακριτή Υδρόλυση και Ζύμωση (SHF)**

Στην SHF, τα στάδια υδρόλυσης και ζύμωσης πραγματοποιούνται σε διαφορετικούς αντιδραστήρες. Το κύριο πλεονέκτημα αυτής της διαδικασίας είναι το γεγονός ότι κάθε βήμα μπορεί να διεξαχθεί σε βέλτιστες συνθήκες pH και θερμοκρασίας. Ωστόσο, η συσσώρευση γλυκόζης και κελλοβιόζης (που εμφανίζεται κατά την διάρκεια του σταδίου της υδρόλυσης) έχει ανασταλτικές επιδράσεις στην ενεργότητα των κυτταρινασών, μειώνοντας σημαντικά, μετά από κάποιο χρονικό διάστημα, την σακχαροποίηση και συνεπώς την συνολική απόδοση της μεθόδου (Xiros, et al., 2013).

### **1.3.3.2 Ταυτόχρονη Ζύμωση και Σακχαροποίηση (SSF)**

Σε μια διεργασία SSF, η ενζυμική υδρόλυση και η ζύμωση δεν είναι διακριτά στάδια ούτε χρονικά ούτε τοπικά. Και οι δύο διεξάγονται στον ίδιο αντιδραστήρα και έτσι η γλυκόζη που απελευθερώνεται με την δράση των κυτταρινασών μετατρέπεται απευθείας σε βιοπροϊόν από τον μικροοργανισμό της ζύμωσης. Η συνεχής απομάκρυνση της γλυκόζης από το μέσο επιδρά θετικά στη συνολική απόδοση της διεργασίας λόγω του ότι ελαχιστοποιούνται τα προϊόντα που αναστέλλουν την δράση των ενζύμων που μετέχουν στην αποικοδόμηση της κυτταρίνης (Xiros, et al., 2013). Ωστόσο, για μια αποτελεσματική διαδικασία SSF, ο μικροοργανισμός και τα ένζυμα θα πρέπει να λειτουργούν άριστα υπό τις ίδιες συνθήκες. Δεδομένου ότι οι μυκητιακές κυτταρινάσες είναι ένας από τους σημαντικούς παράγοντες κόστους στη ζύμωση λιγνοκυτταρινούχων υλικών, χρειάζονται μικροοργανισμοί που αναπτύσσονται και ζυμώνουν βέλτιστα σε φθηνά μέσα υπό συνθήκες που είναι βέλτιστες για την δράση των κυτταρινασών (Patel, et al., 2005).

## **A. ΠΑΡΑΓΩΓΗ ΓΑΛΑΚΤΙΚΟΥ ΟΞΕΟΣ ΑΠΟ ΛΙΓΝΟΚΥΤΤΑΡΝΟΥΧΟ ΒΙΟΜΑΖΑ**

### *Γαλακτικό Οξύ – Εφαρμογές*

Το γαλακτικό οξύ (2-υδροξυπροπανοϊκό οξύ,  $\text{CH}_3\text{-CH}(\text{OH})\text{-COOH}$ ), το απλούστερο υδροξυκαρβοξυλικό οξύ, είναι μία χημική ουσία με δύο οπτικά ενεργά εναντιομερή (D (-) και L (+)) (Srivastava, et al., 2015) (Daful & Görgens, 2017). Αποτελεί ένα φυσικό οργανικό οξύ με μεγάλη παγκόσμια αγορά και ευρείες βιομηχανικές εφαρμογές (Buyondo & Liu, 2011). Χρησιμοποιείται κυρίως στις βιομηχανίες τροφίμων, χημικών, φαρμάκων, κλωστοϋφαντουργίας, καλλυντικών, και προϊόντων υγειονομικής περίθαλψης (Daful & Görgens, 2017) (Buyondo & Liu, 2011). Οι εφαρμογές του στη βιομηχανία τροφίμων περιλαμβάνουν τη χρήση του ως φυσικό συντηρητικό (Srivastava, et al., 2015), αλλά και ως ρυθμιστικό μέσο, αρωματικό παράγοντα, παράγοντα οξίνισης και βακτηριακό αναστολέα (Buyondo & Liu, 2011). Σε αυτές, όπως και στη βιομηχανία φαρμάκων, χρησιμοποιείται κατά προτίμηση το L (+) ισομερές, δεδομένου ότι είναι το μόνο ισομερές γαλακτικού οξέος που παράγεται στο ανθρώπινο σώμα (Srivastava, et al., 2015). Στις χημικές βιομηχανίες μπορεί να χρησιμοποιηθεί ως πρώτη ύλη για την παραγωγή πολλαπλών χημικών και χημικών ενδιάμεσων, όπως το ακρυλικό οξύ, η 1,2-προπανοδιόλη, πυροσταφυλικό οξύ, ακεταλδεΐδη και 2,3-πεντανοδιόνη (Daful & Görgens, 2017).

Σήμερα, η πιο σημαντική ίσως εφαρμογή του γαλακτικού οξέος αποτελεί η χρήση του ως μονομερούς στην παραγωγή ενός βιοαποδομήσιμου και βιοσυμβατού πολυμερούς, του πολυγαλακτικού οξέος (PLA), που είναι μια φιλική προς το περιβάλλον εναλλακτική λύση έναντι των μη βιοαποδομήσιμων πλαστικών που προέρχονται από τα πετροχημικά. Το PLA είναι θερμοπλαστικός πολυεστέρας, πλήρως κομποστοποιήσιμος και ο κύκλος ζωής του θα μπορούσε ενδεχομένως να μειώσει τα επίπεδα διοξειδίου του άνθρακα στην ατμόσφαιρα της Γης (Buyondo & Liu, 2011). Οι εφαρμογές του περιλαμβάνουν τη χρήση σε χειρουργικά ράμματα, ορθοπεδικά εμφυτεύματα, συστήματα χορήγησης φαρμάκων και συσκευασίες καταναλωτικών προϊόντων (Buyondo & Liu, 2011; Srivastava, et al., 2015).

### *Τρόποι παραγωγής γαλακτικού οξέος*

Το γαλακτικό οξύ μπορεί να παραχθεί είτε με χημική σύνθεση είτε με μικροβιακή ζύμωση. Για τη σύνθεση του γαλακτικού οξέος με χημικά μέσα συνήθως χρησιμοποιούνται πετροχημικά υλικά, οδηγώντας σε ένα αδρανές ρακεμικό μίγμα των L και D ισομερών του προϊόντος, το οποίο αποτελεί το μεγαλύτερο μειονέκτημα αυτής της διεργασίας (Srivastava, et al., 2015; Daful & Görgens, 2017). Η ζύμωση προσφέρει πολλά πλεονεκτήματα έναντι της χημικής σύνθεσης, συμπεριλαμβανομένου του χαμηλού κόστους των υποστρωμάτων, της χαμηλής θερμοκρασίας παραγωγής, της χαμηλής κατανάλωσης ενέργειας και της υψηλής εξειδίκευσης του προϊόντος, πράγμα που σημαίνει ότι κατά τη βιολογική ζύμωση παράγεται οπτικά καθαρό L - (+) - ή D - (-) - γαλακτικό οξύ, όταν επιλέγεται ο κατάλληλος μικροοργανισμός ως παραγωγός



γαλακτικού οξέος (Buyondo & Liu, 2011) (Abdel-Rahman, et al., 2013). Το οπτικά καθαρό γαλακτικό οξύ αποτελεί απαραίτητη προϋπόθεση για τη σύνθεση του εξαιρετικά κρυσταλλικού PLA, που είναι κατάλληλο για εμπορικές χρήσεις (Buyondo & Liu, 2011). Επί του παρόντος, σχεδόν όλο το γαλακτικό οξύ που παράγεται παγκοσμίως προέρχεται από μικροβιακές ζυμώσεις (Abdel-Rahman, et al., 2013).

### *Υποστρώματα που χρησιμοποιούνται για την παραγωγή γαλακτικού οξέος με ζύμωση*

Το γαλακτικό οξύ μπορεί να παραχθεί μέσω ζύμωσης σακχάρων από διάφορες πηγές, όπως ορός γάλακτος, καλλιέργειες αμύλου, καλλιέργειες ζάχαρης και λιγνοκυτταρινούχα υλικά. Οι τεχνολογίες που παράγουν γαλακτικό οξύ από σάκχαρα προερχόμενα από λιγνοκυτταρίνη είναι οι λιγότερο αναπτυγμένες, ενώ αυτές που περιλαμβάνουν χρήση σακχάρων από άμυλο, ζάχαρη και ορό γάλακτος είναι εμπορικά διαθέσιμες (Daful & Görgens, 2017). Σε βιομηχανική κλίμακα, γλυκόζη και άμυλο καλαμποκιού έχουν χρησιμοποιηθεί ευρέως ως υποστρώματα για τη βιολογική παραγωγή γαλακτικού οξέος. Ωστόσο, κάτι τέτοιο συνιστά οικονομικά δυσμενή λύση, διότι τα καθαρά σάκχαρα έχουν υψηλότερη οικονομική αξία από το παραγόμενο γαλακτικό οξύ (Buyondo & Liu, 2011). Προσπάθειες που έχουν επιτευχθεί σε εργαστηριακή κλίμακα από λιγνοκυτταρινούχο βιομάζα αφορούν την παραγωγή γαλακτικού οξέος από απορρίμματα μπανάνας, ζαχαροκάλαμου, μήλου, άχυρο σίτου, υπολείμματα καλαμποκιού, φύτες αλφάλφα, υπολείμματα κασάβας και ρυζιού, switchgrass και άλλα (Sreenath, et al., 2001; John, et al., 2006; Nakano, et al., 2012; Iyer & Lee, 1999; Chan-Blanco, et al., 2003; Gullon, et al., 2008; Garde, et al., 2002; Adsul, et al., 2007; Moldes, et al., 2006).

Τα τελευταία χρόνια η ζήτηση για το γαλακτικό οξύ έχει αυξηθεί λόγω της αύξησης του φάσματος των εφαρμογών, με ιδιαίτερη εστίαση στη χρήση φθηνών, μη εδωδιμων πρώτων υλών χαμηλού κόστους για την παραγωγή του. Από αυτή την άποψη, η λιγνοκυτταρινούχα βιομάζα είναι μια πολλά υποσχόμενη πρώτη ύλη για την παραγωγή γαλακτικού οξέος, λαμβάνοντας υπόψη τη διαθεσιμότητα, τη βιωσιμότητα και το χαμηλό κόστος σε σύγκριση με τα καθαρά σάκχαρα (γλυκόζη, σακχαρόζη κλπ) ή το άμυλο (Daful & Görgens, 2017) (Buyondo & Liu, 2011).



Εικόνα 1.6 Λιγνοκυτταρινούχα υποστρώματα που έχουν χρησιμοποιηθεί για την παραγωγή γαλακτικού οξέος.

### Μικροοργανισμοί

Το γαλακτικό οξύ μπορεί να παραχθεί από διάφορους μικροοργανισμούς, οι οποίοι ταξινομούνται σε βακτήρια, μύκητες, ζύμες, κυανοβακτήρια και μικροφύκη. Η επιλογή του στελέχους έχει μεγάλη σημασία, ιδιαίτερα όσον αφορά την υψηλή οπτική καθαρότητα του γαλακτικού οξέος και την υψηλή ικανότητα παραγωγής (Abdel-Rahman, et al., 2013).

Η παραγωγή γαλακτικού οξέος μέσω αναερόβιας ζύμωσης πραγματοποιείται επί του παρόντος από βακτήρια γαλακτικού οξέος (LAB), στελέχη *Bacillus* και μερικά γενετικά τροποποιημένα στελέχη, συμπεριλαμβανομένων των *Escherichia coli* και *Corynebacterium* (Abdel-Rahman & Sonomoto, 2016).

### Βακτήρια Γαλακτικού Οξέος (*Lactic Acid Bacteria*)

Τα βακτήρια γαλακτικού οξέος αποτελούν μια ποικιλόμορφη ομάδα θετικών κατά Gram μικροοργανισμών που συναντώνται σε φυτά, κρέας και γαλακτοκομικά προϊόντα και μπορούν να παράγουν γαλακτικό οξύ ως αναερόβιο προϊόν γλυκόλυσης με υψηλή απόδοση και υψηλή παραγωγικότητα (Abdel-Rahman, et al., 2013). Χαρακτηρίζονται από την ικανότητά τους να αναπτύσσονται αναερόβια με υψηλούς ρυθμούς ανάπτυξης σε χαμηλές τιμές pH (μπορούν να επιβιώσουν σε pH 5 και χαμηλότερα), γεγονός που προκαλείται από την παρουσία οργανικών οξέων (Mazzoli, et al., 2014) (Boguta, et al., 2014).

Μεταξύ αυτών, τα στελέχη *Lactobacillus* έχουν θεωρηθεί εμπορικά σημαντικά στελέχη λόγω της υψηλής αντοχής τους σε οξέα και της ικανότητάς τους να τροποποιούνται

γενετικά για την επιλεκτική παραγωγή D- ή L-γαλακτικού οξέος (Abdel-Rahman, et al., 2013). Επίσης, έχουν εμφανίσει υψηλή προσαρμοστικότητα στις συνθήκες των βιομηχανικών διεργασιών, παρουσιάζοντας μεγάλο εύρος βέλτιστης θερμοκρασίας ανάπτυξης (που κυμαίνεται από 20 έως 45 ° C, ανάλογα με το γένος και το στέλεχος). Τέλος, έχουν την ικανότητα να μεταβολίζουν μια ποικιλία μονοσακχαριτών (εξόζες και πεντόζες) καθώς και δισακχαριτών (Mazzoli, et al., 2014), καθιστώντας τους ενδιαφέροντες υποψήφιους για την παραγωγή προϊόντων προστιθέμενης αξίας, όπως γαλακτικό οξύ, χρησιμοποιώντας ως πρώτη ύλη λιγνοκυτταρινούχα υλικά (Boguta, et al., 2014). Κάποια από τα στελέχη *Lactobacillus* που έχουν μελετηθεί ως προς την ικανότητά αυτή είναι τα *Lactobacillus delbrueckii*, *Lactobacillus plantarum* και *Lactobacillus rhamnosus* σε μια ποικιλία λιγνοκυτταρινούχων και αγροβιομηχανικών υλικών με διεργασίες ταυτόχρονης σακχαροποίησης και ζύμωσης, παρουσιάζοντας ικανοποιητικά αποτελέσματα. Η μέθοδος SSF προσφέρει διάφορα πλεονεκτήματα έναντι της SHF, όσον αφορά στην παραγωγή γαλακτικού οξέος από αυτά τα στελέχη, τα οποία χρήζουν καταλληλότητας λόγω της αντοχής τους στις υψηλές θερμοκρασίες που επιβάλλει η υδρόλυση. Τέτοια πλεονεκτήματα είναι η χρήση ενός μόνο δοχείου αντίδρασης, ο ταχύτερος χρόνος διεργασίας, το μικρότερο ενζυμικό φορτίο, η μειωμένη παρεμπόδιση από το τελικό προϊόν της υδρόλυσης και η αυξημένη παραγωγικότητα (Abdel-Rahman, et al., 2013).

## **B. ΠΑΡΑΓΩΓΗ Ω-3 ΛΙΠΑΡΩΝ ΟΞΕΩΝ ΑΠΟ ΜΙΚΡΟΦΥΚΗ**

### *Ωμέγα-3 Λιπαρά Οξέα – Εφαρμογές*

Τα λίπη είναι μια ομάδα οργανικών ενώσεων που είναι αδιάλυτες στο νερό, αλλά διαλυτές σε οργανικούς διαλύτες. Αν και δεν υπάρχει ένας συγκεκριμένος δομικός ορισμός, πολλά λιπίδια, συγκεκριμένα εκείνα τα σαπωνοποιήσιμα, περιέχουν λιπαρά οξέα, δηλαδή υδρογονάνθρακες με μια καρβοξυλομάδα (-COOH) στο ένα άκρο και μία τερματική ομάδα μεθυλίου (-CH<sub>3</sub>) στο άλλο (άνθρακας n ή ω). Τα λιπαρά οξέα που βρίσκονται συνήθως σε βιολογικούς ιστούς αποτελούνται από αλυσίδες με άρτιο αριθμό ατόμων άνθρακα που κυμαίνεται από 12 έως 24, και 0 έως 6 διπλούς δεσμούς που διακόπτονται από μεθυλένιο ή ακορεστότητες. Τα πολυακόρεστα λιπαρά οξέα (PUFA) είναι λιπαρά οξέα που περιέχουν 18 έως 24 άτομα άνθρακα με δύο ή περισσότερες ακορεστότητες (Taberna, 2008). Τα πολυακόρεστα λιπαρά οξέα μακράς αλυσίδας (LCPUFA) είναι βασικές ενώσεις για τα ευκαρυωτικά κύτταρα. Διαδραματίζουν σημαντικό ρόλο στην ευκαμψία, ρευστότητα, και επιλεκτική διαπερατότητα των μεμβρανών, τη μεταφορά ηλεκτρολυτών, την ορμονική δραστηριότητα, ενώ συμβάλλουν, επίσης, στην ανοσολογική απόκριση (Rumiani, et al., 2018).

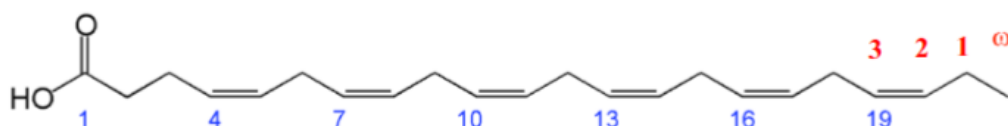
Τα λιπαρά ωμέγα-3 είναι πολυακόρεστα λίπη μακράς αλυσίδας που περιέχουν διαχωρισμένους από μεθυλένιο διπλούς δεσμούς, ξεκινώντας από το τρίτο άτομο άνθρακα που υπολογίζεται από την τερματική ομάδα του μεθυλίου. Η παρουσία μεθυλενικών ομάδων και όλων των διπλών δεσμών που βρίσκονται στην cis-

διαμόρφωση καθιστά αυτά τα μόρια επιρρεπή σε δομικές αλλαγές, ιδιαίτερα, οξείδωση, ισομερισμό και πολυμερισμό (Kralovec, et al., 2012). Αποτελούν μια ομάδα πολυακόρεστων λιπαρών οξέων (PUFA), γνωστών για τα οφέλη τους τόσο για την υγεία των ανθρώπων όσο και των ζώων (Chalima, et al., 2019). Κλινικές μελέτες έχουν δείξει ότι η κατανάλωση ωμέγα-3 είναι χρήσιμη για την θεραπεία και την πρόληψη μιας ποικιλίας χρόνιων ασθενειών, όπως αρτηριακή πίεση, αρτηριοσκλήρυνση, καρδιαγγειακές παθήσεις, θρόμβωση, ρευματοειδής αρθρίτιδα, ψωρίαση, φλεγμονώδεις νόσους και διάφορους τύπους καρκίνου, καθώς επίσης και ασθενειών γήρατος, όπως η νόσος του Αλτσχάιμερ και ο εκφυλισμός της ωχράς κηλίδας (Rumiani, et al., 2018; de Swaaf, et al., 1999; Vazhappilly & Chen, 1998).

Τα δύο πιο σημαντικά και ευρέως μελετημένα ωμέγα-3 λιπαρά οξέα είναι το το cis-5,8,11,15,17-εικοσαπενταενοϊκό οξύ (EPA, C20: 5) και το cis-4,7,10,13,16,19-εικοσιδυαεξαενοϊκό οξύ (DHA, C22: 6) (Chalima, et al., 2019; Kralovec, et al., 2012). Τα τελευταία χρόνια, το ενδιαφέρον για αυτά τα πολυακόρεστα λιπαρά οξέα μακράς αλυσίδας έχει αυξηθεί σημαντικά λόγω της αναγνώρισής τους ως ευεργετικών για την ανθρώπινη υγεία (de Swaaf, et al., 1999).

### DHA

Το DHA παράγεται στις μεμβράνες των ανθρώπινων νευρικών, οπτικών και αναπαραγωγικών ιστών και είναι, επίσης, το λιπαρό οξύ που βρίσκεται σε μεγαλύτερη αφθονία στη γκρίζα ύλη του εγκεφάλου (Mendes, et al., 2007). Είναι ένα σημαντικό PUFA που συναντάται φυσικά στο ανθρώπινο μητρικό γάλα (de Swaaf, et al., 1999). Συνιστά βασική θρεπτική ουσία για την ανάπτυξη του νευρικού, οπτικού συστήματος και του εγκεφάλου κατά τη βρεφική ηλικία και ως εκ τούτου, αποτελεί βασικό συστατικό των παρασκευασμάτων για βρέφη (Chalima, et al., 2019). Επιπλέον, αρκετές ιατρικές μελέτες έχουν αποδείξει ότι το DHA μπορεί να μειώσει το ιξώδες του αίματος και να αναστείλει την εμφάνιση θρόμβων, υπέρτασης και φλεγμονής (Pei, et al., 2017). Είναι αποτελεσματικό, επίσης, στη θεραπεία αρκετών ασθενειών, όπως ο καρκίνος, η στεφανιαία νόσος, η κατάθλιψη, ο σακχαρώδης διαβήτης τύπου 2 και η αθηροσκλήρωση. Το DHA χρησιμοποιείται ευρέως ως διαιτητικό φάρμακο στην αγορά των τροφίμων και ζωοτροφών (Nazir, et al., 2018). Ως εκ τούτου, η παραγωγή συμπληρωμάτων DHA αποτελεί έναν αναπτυσσόμενο βιομηχανικό τομέα (Chalima, et al., 2019).



Εικόνα 1.7. Χημική δομή του cis-4,7,10,13,16,19-εικοσιδυαεξαενοϊκού οξέος (DHA, C22: 6) (Taberna, 2008).

### *Πηγές ω-3 λιπαρών οξέων*

Πολλές πηγές τροφίμων είναι πλούσιες σε ωμέγα-3 λιπαρά οξέα, όπως καρύδια, έλαιο φύτρου σιταριού, λιναρόσπορος, έλαιο κράμβης, ανθρώπινο γάλα, κρέας προερχόμενο από όργανα, θαλασσινά, και ιδιαίτερα το ιχθυέλαιο (Rumiani, et al., 2018). Το ιχθυέλαιο μπορεί να περιέχει έως και 30% DHA και EPA, καθιστώντας το ως την πλουσιότερη πηγή ω-3 λιπαρών οξέων (Vazhappilly & Chen, 1998). Μικρές ποσότητες DHA ανιχνεύονται, επίσης, σε αυγά και γαλακτοκομικά προϊόντα (Ryan & Symington, 2015). Ως εκ τούτου, μέχρι και σήμερα, το ιχθυέλαιο αποτελεί την παραδοσιακή πηγή πρόσληψης DHA, το οποίο λαμβάνεται κυρίως από ψάρια του κρύου νερού όπως ο τόνος και ο σολομός (Nazir, et al., 2018). Τα θαλάσσια ψάρια λαμβάνουν το λιπαρό οξύ από τους πρωτογενείς παραγωγούς, τα μικροφύκη, μέσω της τροφικής αλυσίδας (Pei, et al., 2017; de Swaaf, et al., 1999).

### *Περιορισμοί που τίθενται από τις συμβατικές πηγές ω-3 λιπαρών οξέων*

Τα τελευταία χρόνια έχουν εγερθεί πολλές ανησυχίες σχετικά με τα ιχθυέλαια ως πηγή ω-3 λιπαρών οξέων. Τέτοιες αφορούν δυσαρέσκειες που σχετίζονται με τη χαρακτηριστική μυρωδιά του ψαριού, τη γεύση και την κακή οξειδωτική σταθερότητα. Επιπλέον, η παρουσία του EPA στο ιχθυέλαιο είναι ανεπιθύμητη για εφαρμογή σε παιδικές τροφές καθώς έχει συσχετιστεί με την καθυστερημένη ανάπτυξη των νεογνών (de Swaaf, et al., 1999; Pei, et al., 2017). Ακόμη, το ιχθυέλαιο είναι ένας περιορισμένος πόρος και η σύνθεση και η ποιότητά του εξαρτώνται από πολλούς παράγοντες όπως η εποχή και η τοποθεσία της αλιείας και ο βαθμός μόλυνσης της θάλασσας (Mendes, et al., 2007) (Chalima, et al., 2019). Αναφορές έχουν δείξει ότι ορισμένα ιχθυέλαια μπορεί να περιέχουν ρύπους όπως ο μεθυλυδράργυρος, οι πολυχλωριωμένες φαινόλες (PCB) και οι διοξίνες (Kralovec, et al., 2012). Επιπλέον, το απόθεμα ψαριών των ωκεανών δεν μπορεί να ικανοποιήσει την αυξανόμενη ζήτηση για ωμέγα-3. Μια προφανής λύση είναι η υδατοκαλλιέργεια, αλλά τα εκτρεφόμενα ψάρια απαιτούν ειδική διατροφή για να συνθέσουν και να συσσωρεύσουν κατάλληλα ποσά EPA και DHA (Chalima, et al., 2019). Επιπλέον, το ιχθυέλαιο περιέχει, μεταξύ άλλων, μεγάλες ποσότητες κορεσμένων και ω-6 λιπαρών οξέων, καθιστώντας τον καθαρισμό του χρονοβόρο και δαπανηρό (Mendes, et al., 2007).

Ένα άλλο σημαντικό κεφάλαιο αφορά την αδυναμία κάλυψης των αναγκών σε DHA συγκεκριμένου πληθυσμού ανθρώπων από τις συμβατικές πηγές ω-3 λιπαρών οξέων. Αναφορές δείχνουν ότι η συνιστώμενη ημερήσια πρόσληψη DHA είναι 120 mg ημερησίως για άνδρες και 100 mg για γυναίκες και ηλικιωμένους (Mendes, et al., 2009). Ωστόσο, αυτή καθίσταται δυσχερής για εκείνους του πληθυσμού που δεν καταναλώνουν πηγές ω-3 λιπαρών οξέων (ψάρια, αυγά, γαλακτοκομικά προϊόντα), όπως είναι οι χορτοφάγοι και vegans. Ως εκ τούτου, θρεπτικά συστατικά όπως DHA μπορεί να απουσιάζουν από την διατροφή τους. Η επικράτηση των χορτοφάγων και των vegans παγκοσμίως είναι γεγονός ότι αυξάνεται και ως εκ τούτου, η κατανόηση των ειδικών διατροφικών αναγκών για αυτού του τύπου δίαιτες κρίνεται πολύ

σημαντική. Ενώ μερικοί χορτοφάγοι μπορούν να τρώνε αυγά και γαλακτοκομικά, οι ποσότητες DHA που προσλαμβάνουν ενδέχεται να είναι μικρότερες από τις συνιστώμενες. Επιπλέον, αν δεν ακολουθήσουν δίαιτα εμπλουτισμένη ή συμπληρωμένη με DHA που προέρχεται από μικροφύκη, οι vegans δεν λαμβάνουν καθόλου DHA (Sanders, 2009). Τα επίπεδα των DHA των χορτοφάγων και των vegans είναι σημαντικά χαμηλότερα από εκείνων που καταναλώνουν κρέας και ψάρια (Sanders, 2009). Οι Weller, Shrestha, Lentjes, Wareham και Khaw (2010) διαπίστωσαν ότι κατά μέσο όρο οι καταναλωτές ψαριών λαμβάνουν ημερησίως 0,16 g DHA, οι χορτοφάγοι 0,0007 g DHA και οι vegans 0 g DHA (Ryan & Symington, 2015). Ως εκ τούτου, ιδιαίτερη μέριμνα πρέπει να δοθεί για αυτές τις κοινωνικές ομάδες με την εύρεση εναλλακτικών πηγών DHA για την παραγωγή αντίστοιχων συμπληρωμάτων διατροφής.

### *Εναλλακτικές πηγές παραγωγής ω-3 λιπαρών οξέων: Μικροφύκη*

Επειδή τα ψάρια λαμβάνουν ω-3 λιπαρά οξέα από το ζωοπλαγκτόν, τα οποία καταναλώνουν μικροφύκη, η έρευνα έχει επικεντρωθεί στην ανάπτυξη μιας εμπορικά εφικτής τεχνολογίας για την παραγωγή ω-3 λιπαρών οξέων απευθείας από μικροφύκη (Vazhappilly & Chen, 1998). Τα μικροφύκη είναι μια εξαιρετικά ποικίλη ομάδα ευκαρυωτικών μικροοργανισμών που βρίσκονται σε θαλάσσια οικοσυστήματα και οικοσυστήματα γλυκού νερού. Είναι ικανά να συσσωρεύουν λιπίδια που φτάνουν μέχρι και το 70% της ξηρής τους βιομάζας, κάτι που τα καθιστά ως πολλά υποσχόμενη πηγή ω-3, και ως εκ τούτου, DHA (Chalima, et al., 2019). Η βιομάζα μικροφύκων είναι ιδιαίτερα κατάλληλη για την εκχύλιση και τον καθαρισμό μεμονωμένων PUFA λόγω της σταθερής σύνθεσής της. Επιπλέον, τα PUFA από τα καλλιεργούμενα μικροφύκη είναι απαλλαγμένα από χοληστερόλη και ρύπους (π.χ. βαρέα μέταλλα, πολυχλωροδιφαινύλια (PCBs) και έχουν ωραία γεύση (Mendes, et al., 2009). Αυτά μπορούν να συντεθούν είτε από αυτότροφα είτε ετερότροφα συστήματα.

### *Αυτότροφα συστήματα*

Τα μικροφύκη είναι συνήθως φωτοαυτότροφα, δηλαδή χρησιμοποιούν το φως ως πηγή ενέργειας και το διοξείδιο του άνθρακα ως πηγή άνθρακα για να αναπτυχθούν (Chen, 1996). Ως εκ τούτου, ο φωτοαυτοτροφικός τρόπος ανάπτυξης αποτελεί την πιο συνηθισμένη τεχνική που χρησιμοποιείται για τις καλλιέργειες μικροφυκών (Chen, 1996). Η καλλιέργεια των φωτοσυνθετικών μικροφυκών μπορεί να γίνει είτε σε ανοιχτά είτε σε κλειστά συστήματα.

Τα ανοιχτά συστήματα περιλαμβάνουν τις ανοιχτές λεκάνες, που αποτελούν τα παλαιότερα και απλούστερα συστήματα καλλιέργειας φυκών. Σε αυτές, τα μικροφύκη καλλιεργούνται υπό συνθήκες ίδιες με αυτές του εξωτερικού περιβάλλοντος. Οι ανοιχτές λεκάνες προσφέρουν πληθώρα πλεονεκτημάτων όπως είναι το ελάχιστο κόστος κατασκευής και λειτουργίας, η αξιοποίηση ξηρών ή / και αλμυρών εδαφών, ακατάλληλων για γεωργία, και η δυνατότητα ενσωμάτωσης τους σε διαδικασίες

επεξεργασίας λυμάτων ή / και υδατοκαλλιέργειας. Τα συστήματα αυτά, ωστόσο, παρουσιάζουν επίσης προβλήματα: τη δυσκολία διατήρησης των μονοκαλλιιεργειών λόγω υψηλού κινδύνου επιμόλυνσης, τον έλεγχο των περιβαλλοντικών παραμέτρων (ιδίως της ηλιακής ακτινοβολίας και της θερμοκρασίας) και το υψηλό κόστος για την ανάκτηση κυττάρων λόγω της χαμηλής κυτταρικής πυκνότητας (τυπικά  $0,5 \text{ g L}^{-1}$ ).

Οι κλειστοί φωτοβιοαντιδραστήρες είναι πιο εξελιγμένοι αντιδραστήρες από τα συστήματα λεκανών. Διαθέτουν γενικά φωτισμό, προσθήκη  $\text{CO}_2$ , εγκαταστάσεις ανάδευσης και ψύξης. Οι φωτοβιοαντιδραστήρες προσφέρουν πολλά πλεονεκτήματα σε σχέση με τα συστήματα λεκανών, μεταξύ των οποίων: (1) καλύτερος έλεγχος του περιβάλλοντος καλλιέργειας, (2) μεγαλύτερη αναλογία επιφάνειας προς όγκο (3) καλύτερος έλεγχος της μεταφοράς αερίου (4) πρόληψη της εξάτμισης, (5) ένα καλύτερο θερμικό προφίλ (6) ευκολότερη εγκατάσταση σε οποιοδήποτε ανοικτό χώρο (7) καλύτερη προστασία από επιμόλυνση και (8) υψηλότερες παραγωγικότητες κυττάρων (Chen, 1996).

Έχουν γίνει προσπάθειες για την παραγωγή DHA φωτοαυτοτροφικά, με καλλιέργεια μικροφυκών σε φωτοβιοαντιδραστήρες, αλλά είναι δύσκολο να επιτευχθούν υψηλές συγκεντρώσεις βιομάζας και υψηλές παραγωγές DHA. Αυτό οφείλεται σε δύο ανεπίλυτα προβλήματα, που είναι ο περιορισμός του φωτός λόγω της αμοιβαίας σκίασης των κυττάρων και η συσσώρευση οξυγόνου στην καλλιέργεια (Mendes, et al., 2007; Vazhappilly & Chen, 1998). Επίσης, με την αύξηση του λόγου επιφάνειας προς τον όγκο της καλλιέργειας, η διείσδυση του φωτός και οι κυτταρικές πυκνότητες μπορούν να αυξηθούν ελαφρά, αλλά με τρόπο που δύσκολα επιδέχεται κλιμάκωση. Ως αποτέλεσμα, το συνολικό κόστος της βιομάζας μικροφυκών που παράγεται σε ανοικτά συστήματα, όπως οι ανοιχτές λεκάνες ( $\text{US } \$ 15\text{-}20 \text{ kg}^{-1}$ ) ή κλειστά συστήματα όπως οι φωτοβιοαντιδραστήρες (μεγαλύτερο από  $\text{US } \$ 50 \text{ kg}^{-1}$ ) δεν είναι ανταγωνιστικό με της βιομάζας που καλλιεργείται σε ζυμωτήρες (μικρότερο από  $\text{US } \$ 5 \text{ kg}^{-1}$ ) (Taberna, 2008).

Πολλά φωτοσυνθετικά είδη μικροφυκών όπως *Nannochloropsis*, *Monodus subterraneus*, *Phaeodactylum tricornutum*, *Odontella aurita* και *Porphyridium cruentum* έχουν την ικανότητα να συνθέτουν PUFA, ωστόσο, με υψηλά επίπεδα EPA και χαμηλότερα επίπεδα DHA, κάτι το οποίο αποτελεί επίσης περιοριστικό παράγοντα (Hamilton, et al., 2016).

### *Ετερότροφα συστήματα*

Πολλά πειράματα έχουν αποδείξει ότι τα μικροφύκη είναι πολύ πιο παραγωγικά όταν μπορούν να αναπτυχθούν σε ετερότροφες συνθήκες απ' ό,τι αυτότροφες (Taberna, 2008). Αυτό οφείλεται στο ότι η ετεροτροφική ανάπτυξη των μικροφυκών εξαλείφει την απαίτηση για φως, που μπορεί να είναι δαπανηρή, και μπορεί να οδηγήσει σε υψηλότερη παραγωγή βιομάζας και συσσώρευση υψηλότερων περιεκτικότητας λιπαρών στα κύτταρα (Hamilton, et al., 2016). Έτσι, καθίσταται δυνατή η

παραγωγικότητα σε μεγάλη κλίμακα (Mendes, et al., 2007). Η παραγωγή λιπαρών οξέων από μικροφύκη σε μεγάλη κλίμακα είναι εφικτή με χρήση παραδοσιακών συστημάτων ζύμωσης που παρέχουν σταθερή βιομάζα υπό εξαιρετικά ελεγχόμενες και παρακολουθούμενες συνθήκες οδηγώντας σε ένα προϊόν υψηλής ποιότητας. Η διάρκεια της ζύμωσης διαρκεί λίγες μέρες, επομένως η παραγωγή μπορεί να αυξηθεί ή να μειωθεί για να ανταποκριθεί στις απαιτήσεις της αγοράς. Επιπλέον, δεν υπάρχει κλιματική ή εποχική εξάρτηση. Ως εκ τούτου, η διαλογή μικροοργανισμών για ετεροτροφική παραγωγή DHA είναι μεγίστης σημασίας (Mendes, et al., 2009).

Οι ετεροτροφικοί μικροοργανισμοί λαμβάνουν την απαιτούμενη ενέργεια για το μεταβολισμό τους από την οξείδωση ενός οργανικού υποστρώματος (Taberna, 2008). Στις περισσότερες από τις εμπορικές καλλιεργητικές διεργασίες, η γλυκόζη χρησιμοποιείται ως πηγή άνθρακα και ενέργειας, καθώς αντιπροσωπεύει μια εύκολα προσβάσιμη πρώτη ύλη για πολλές βιομηχανικές διεργασίες ζύμωσης και συνήθως λαμβάνεται με τη μορφή σιροπιών γλυκόζης από την υδρόλυση (χημική ή ενζυμική) αμύλου αραβοσίτου (Mendes, et al., 2007). Δυνητική πηγή άνθρακα μπορεί να αποτελέσει, επομένως, και η γλυκόζη προερχόμενη από την ενζυμική υδρόλυση λυγνοκυτταρινούχου υλικού όπως ξύλο οξιάς, πεύκου κτλ. Η καλλιέργεια λαμβάνει χώρα σε στειρό περιβάλλον, ακόμα και στο σκοτάδι (αν είναι απαραίτητο) υπό ελεγχόμενες συνθήκες ανάπτυξης (θερμοκρασία, διαλυτοποίηση O<sub>2</sub>, ροή αέρα, ταχύτητα ανάδευσης, pH). Η σταθερότητα των συνθηκών καλλιέργειας ευνοεί την ταχεία ανάπτυξη του μικροοργανισμού και την συσσώρευση λιπιδίων με αναπαραγωγίσιμο τρόπο. Υπό τις βέλτιστες συνθήκες ανάπτυξης, και με επαρκή παροχή αέρα, μεγάλης κλίμακας ζυμωτήρες μπορούν να παράγουν πάνω από 100 g CDW L<sup>-1</sup>. Επίσης, οι υψηλές πυκνότητες των κυττάρων μειώνουν σημαντικά τον όγκο της καλλιέργειας που πρέπει να επεξεργαστεί κατά τη διάρκεια του σταδίου συγκομιδής το οποίο, διαφορετικά, μπορεί να συμβάλει και στο ένα τρίτο του κόστους παραγωγής (Taberna, 2008).

Ετερότροφα μικροφύκη που είναι εμπορικά διαθέσιμα και έχουν χαρακτηριστεί ως σημαντικοί παραγωγοί DHA περιλαμβάνουν είδη από την τάξη των *thraustochytrids* όπως *Aurantochytrium*, *Thraustochytrium*, *Schizochytrium* και το δινομαστιγωτό (dinoflagellate) *Cryptocodinium cohnii* (Rumiani, et al., 2018) (Hamilton, et al., 2016). Τα είδη αυτά είναι μη τοξικά και μη παθογόνα (Rumiani, et al., 2018).

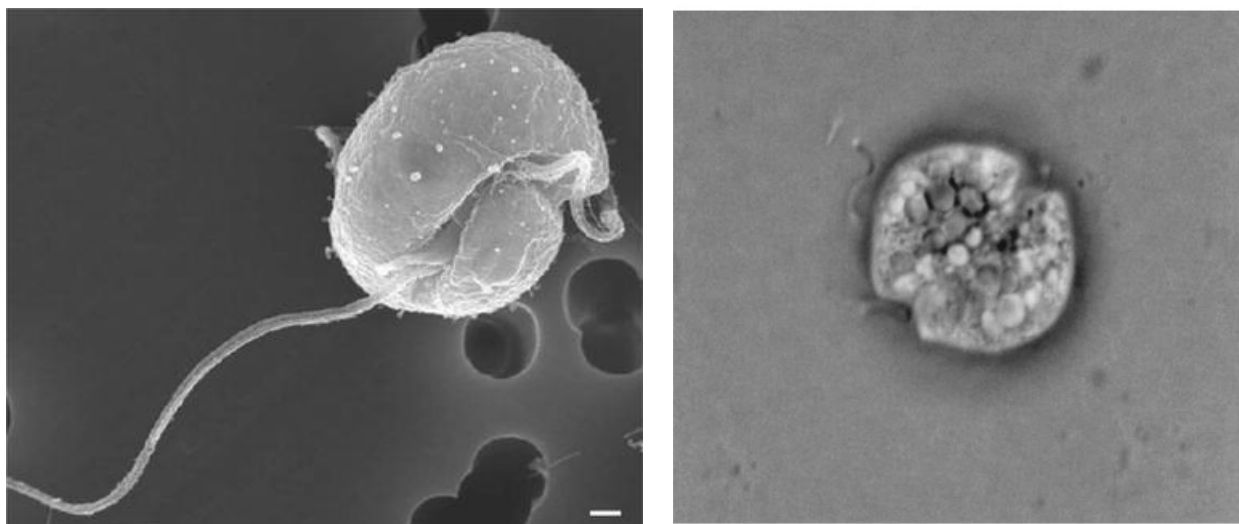
#### *Cryptocodinium cohnii*: ένας πολλά υποσχόμενος παραγωγός DHA

Το *Cryptocodinium cohnii*, γνωστό στο παρελθόν ως *Gyrodinium cohnii*, είναι ένα μη φωτοσυνθετικό, ετερότροφο, δινομαστιγωτό είδος θαλάσσιου μικροφύκου, που ανήκει στην κλάση των *Dinophyceae* και μπορεί να απομονωθεί από τη σήψη των θαλάσσιων φυκιών (Chalima, et al., 2019; Taberna, 2008). Αναφορές έχουν δείξει ότι διαθέτει δύο μορφές, αυτή του κολυμβητή και των κύστεων (Mendes, et al., 2009).



Είναι κυρίως γνωστό για την ικανότητά του να συσσωρεύει υψηλές ποσότητες DHA, το οποίο είναι το χαρακτηριστικό PUFA των θαλάσσιων δινομαστιγιωτών (Mendes, et al., 2007). Το συγκεκριμένο μικροφύκος μπορεί να παράγει υψηλές ποσότητες λιπαρών, που μπορούν να φτάσουν μέχρι και το 50% του ξηρού του βάρους (Taberna, 2008). Συνήθως, σχεδόν το 25-60% των περιεχόμενων λιπαρών οξέων είναι 22: 6 ( $\omega$ -3) λιπαρά οξέα, ενώ άλλα PUFAs δεν ξεπερνούν το 1%, καθιστώντας το διαχωρισμό του DHA εύκολο και φθηνό. Το χαρακτηριστικό αυτό καθιστά την παραγωγή DHA από αυτόν τον μικροοργανισμό πολύ ελκυστική, ιδιαίτερα για φαρμακευτικές εφαρμογές, αφού η συμπερίληψη ενός PUFA ως συστατικό φαρμάκου απαιτεί καθαρότητα πάνω από 95% (Mendes, et al., 2007). Ακόμη, σε κλινικές δοκιμές που έγιναν, τα λιπαρά του *C. cohnii* αναγνωρίστηκαν ως ασφαλή για κατανάλωση από τον άνθρωπο (Taberna, 2008).

Ωστόσο, το υψηλό κόστος της γλυκόζης, που είναι η κύρια πηγή άνθρακα που χρησιμοποιείται στα περισσότερα πειράματά που αναφέρονται στη βιβλιογραφία για την παραγωγή DHA, πρέπει να αντικατασταθεί από ένα φθηνότερο εναλλακτικό θρεπτικό υπόστρωμα. Μέχρι στιγμής, η έρευνα έχει δείξει ότι ο *C. cohnii* αναπτύσσεται καλά σε άλλα υποστρώματα, όπως η αιθανόλη, η γλυκερόλη και το οξικό οξύ, τα οποία, ωστόσο, με την καθαρή εμπορική τους μορφή είναι εξίσου δαπανηρά και δύσκολα διαχειρίσιμα (Chalima, et al., 2019). Στο πλαίσιο αυτό, σάκχαρα προερχόμενα από υδρόλυση λιγνοκυτταρινούχου υλικού, που αποτελεί φθηνή, μη εδώδιμη πηγή, μπορούν να αποτελέσουν δυνητική πηγή άνθρακα για την ανάπτυξη του μικροφύκου και την παραγωγή DHA σε μεγάλη κλίμακα.



Εικόνα 1.8. Ηλεκτρονική μικρογραφία ενός είδους *Crypthecodinium* (Mendes, et al., 2009) (αριστερά) και κύτταρο του *Crypthecodinium cohnii*, γεμάτο με σωματίδια λιπαρών πλούσια σε DHA (Wynn, et al., 2010) (δεξιά).

## 2 ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ

---

### 2.1 ΥΛΙΚΑ

#### 2.1.1 Συσκευές – Όργανα

Ο εξοπλισμός που χρησιμοποιήθηκε κατά την εκτέλεση της παρούσας διπλωματικής εργασίας στο εργαστήριο απαρτίζεται από τις παρακάτω συσκευές και όργανα:

- Αυτόκαυστο Labo Autoclave, SANYO (Η.Π.Α.)
- pH-μετρο 537, WTW (Γερμανία)
- Συσκευή ανάδευσης Orbit LS, Labnet (Μεγάλη Βρετανία)
- Θερμαινόμενος ανακινούμενος επωαστήρας Eppendorf Thermomixer Comfort, Eppendorf (Γερμανία)
- Θερμοστατούμενα υδατόλουτρα Kottermann και επωαστήρες
- Περιστρεφόμενοι επωαστήρες ZHWY-211C, ZHICHENG Analytical Instruments Manufacturing Co Ltd (Κίνα)
- Φωτόμετρο UV 2000, Hitachi (Η.Π.Α.)
- Σύστημα παραγωγής υπερκάθαρου νερού Direct-Q, Millipore (Η.Π.Α.)
- Φυγόκεντροι J2-21 και TJ-6 της Beckman Coulter (Η.Π.Α.), Sorval® RC28S, DuPont (Η.Π.Α.) και μικροφυγόκεντρος πάγκου Zentrifuge Eppendorf 3200 (Γερμανία)
- Φούρνος κενού Gallenkamp, Fistreem International Ltd (Ηνωμένο Βασίλειο)
- Συσκευή λυοφιλίωσης CHRIST APLHA 1-4 (B. Braun Biotech International)
- Θερμαινόμενες πλάκες με δυνατότητα μαγνητικής ανάδευσης Nuova II Stir Plate της Thermolyne και Stirrer Magnetic w Hotplate της Bioline scientific (Ελλάδα)
- Ηλεκτρονικοί ζυγοί Mark 2060, Mark 4065 (BEL Engineering) και Abs 120-4 (KERN & Sohn GmbH)
- Συσκευή φωτομέτρησης microplate reader Spectra Max 250 (Molecular Devices)
- Αντλία Econo Gradient (Biorad, Η.Π.Α.).
- Micro FTIR Biorad Excalibur FTS 3000MX με οπτικό μικροσκόπιο Inspect IR Plus
- Σύστημα Αέριας Χρωματογραφίας GC-17A, Shimadzu (Ιαπωνία)
- Σύστημα Υγρής Χρωματογραφίας υψηλής πίεσης, Shimadzu (Ιαπωνία)
- Πιπέτες DISCOVERY Comfort της PZ HTL SA (Πολωνία) και μικροπιπέτες BioPette™ Autoclavable της Labnet International

## 2.1.2 Μικροοργανισμοί και συνθήκες ανάπτυξης

### A. Παραγωγή γαλακτικού οξέος

Για την παραγωγή γαλακτικού οξέος χρησιμοποιήθηκε το θερμόφιλο γαλακτικό βακτηριακό στέλεχος *Lactobacillus delbrueckii ssp. bulgaricus* (ATCC® 11842™), γνωστό για την ομογαλακτική του ζύμωση και τη χρήση του στη βιομηχανική παραγωγή ζυμωμένων γαλακτοκομικών προϊόντων. Είναι ένας αναερόβιος μικροοργανισμός που δεν απαιτεί αυστηρούς όρους αναερόβιας ανάπτυξης και ανέχεται τη συγκέντρωση του O<sub>2</sub> στον αέρα (MARTY-TEYSSET, et al., 2000). Παρουσιάζει βέλτιστη ανάπτυξη σε θερμοκρασία 37 °C και ατμόσφαιρα 5% CO<sub>2</sub> (Collection, n.d.). Το στέλεχος λήφθηκε από την American Type Culture Collection (ATCC) και αρχικά, διατηρήθηκε σαν ψυχρή stock καλλιέργεια σε 50% (vol/vol) γλυκερόλη στους -80°C. Για πειραματική χρήση και δοκιμές με λιγνοκυτταρινούχα βιομάζα, κύτταρα λήφθηκαν από την αρχική stock καλλιέργεια και διατηρήθηκαν σε μέσον άγαρ MRS (De Man, Rogosa and Sharpe) σε τρυβλία, τα οποία φυλάχθηκαν στους 4 °C. Ανακαλλιέργεια του στελέχους έγινε κάθε 7-10 ημέρες. Για την ανακαλλιέργεια των τρυβλίων έγινε προσθήκη άγαρ 1,5% w/v.

**Θρεπτικό μέσο καλλιέργειας:** Για την ανάπτυξη του στελέχους *Lactobacillus delbrueckii* χρησιμοποιήθηκε θρεπτικό μέσο ATCC: 416 *Lactobacilli* MRS Agar/Broth. Η χρήση του MRS συνίσταται για την απομόνωση, απαρίθμηση και καλλιέργεια ειδών *Lactobacillus*. Βασίζονται στα σκευάσματα των de Man, Rogosa και Sharpe που ανέπτυξαν αρχικά το 1960. Η διατροφή των στελεχών παρέχεται από ένα μείγμα προσεκτικά επιλεγμένων πεπτονών, γλυκόζης, εχκυλισμάτων κρέατος και ζύμης, ενώ το Tween® 80, το θειικό μαγνήσιο και μαγγάνιο δρουν ως διεγερτικά της ανάπτυξης. Συστατικά του μέσου όπως κιτρικό αμμώνιο και οξικό νάτριο λειτουργούν ως παρεμποδιστές στην ανάπτυξη άλλων μικροοργανισμών, πέραν των *Lactobacilli*, όπως στρεπτόκοκκοι και μούχλα. Η σύσταση του μέσου παρουσιάζεται στον ακόλουθο πίνακα. Το θρεπτικό μέσο της καλλιέργειας παρασκευάστηκε με υπερκθαρο νερό και πριν τον εμβολιασμό του αποστειρώθηκε σε αυτόκαυστο στους 109 °C για 40 min. Η αρχική ρύθμιση του pH έγινε με χρήση οξικού οξέος προ αποστείρωσης, έτσι ώστε να αποφευχθεί ενδεχόμενη πτώση του εκτός των καθορισμένων ορίων 6.5±0.2.

Πίνακας 2.1. Σύσταση στερεού θρεπτικού υλικού ATCC: 416 *Lactobacilli* MRS. Το υγρό θρεπτικό υλικό (*Lactobacilli* MRS Broth) αποτελείται από τα ίδια συστατικά χωρίς το άγαρ

ΣΥΣΤΑΤΙΚΟ	ΠΟΣΟΤΗΤΑ
Proteose Peptone #3	10.0 g
Meat Extract	10.0 g
Yeast Extract	5.0 g
Dextrose	20.0 g
Sorbitan Monooleate (Tween® 80)	1.0 g

Ammonium Citrate	2.0 g
Sodium Acetate	5.0 g
MnSO <sub>4</sub> x H <sub>2</sub> O	0.05
Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	2.0 g
DI Water	1000 ml
MgSO <sub>4</sub> x 7H <sub>2</sub> O	0.2 g
Agar	15.0 g

**Προετοιμασία εμβολίου:** Κύτταρα *Lactobacillus delbrueckii* από τις stock καλλιέργειες μεταφέρθηκαν σε αποστειρωμένο μέσο ανάπτυξης (falckon με MRS άγαρ) και επώαστηκαν στους 37 ° C για 48 ώρες. Η διαλογή της καλλιέργειας που θα χρησιμοποιηθεί για τη ζύμωση έγινε με μέτρηση της κυτταρικής πυκνότητας σε φωτόμετρο UV2000, Hitachi στα 600 nm και αραιώση ×10 σε σωληνάκια Eppendorf. Επιλέχθηκε η καλλιέργεια που είχε απορρόφηση πλησιέστερη του 0.4. Στη συνέχεια, η καλλιέργεια εμβολιάστηκε σε θρεπτικό MRS σε κωνική φιάλη με πώμα, επώαστηκε για 48 ώρες στους 37 ° C σε στατικό επωαστήρα και χρησιμοποιήθηκε για τη διεργασία ζύμωσης. Η αρχική τιμή pH ρυθμίστηκε με οξικό οξύ στο 6.5±0.2 σε καθαρές καλλιέργειες και στο 5-5.5 σε SSF με λιγνοκυτταρινούχο βιομάζα, έτσι ώστε το ένζυμο να είναι δραστικό.



Εικόνα 2.1. Φωτόμετρο UV2000, Hitachi

### **B. Παραγωγή ω-3 λιπαρών οξέων**

Για την παραγωγή των ω-3 λιπαρών οξέων ως μικροοργανισμός επιλογής χρησιμοποιήθηκε το ετερότροφο θαλάσσιο μικροφύκος *Cryptocodinium cohnii*

ATCC® 30772™, με εύρος βέλτιστης θερμοκρασίας ανάπτυξης 20-25°C (Collection, n.d.). Το στέλεχος λήφθηκε από την American Type Collection Culture (ATCC) ενώ η καλλιέργεια και η διατήρησή του έγινε σύμφωνα με τα αντίστοιχα πρωτόκολλα.

**Θρεπτικό μέσο καλλιέργειας:** Για την ανάπτυξη του μικροφύκου *Cryptocodinium cohnii* ως θρεπτικό μέσο χρησιμοποιήθηκε ATCC 460 (A<sub>2</sub>E<sub>6</sub>), του οποίου η σύσταση δίνεται στο Παράρτημα (Πίνακας 6.1). Το θρεπτικό μέσο της καλλιέργειας παρασκευάστηκε με υπερκάθαρο νερό και πριν τον εμβολιασμό του αποστειρώθηκε σε αυτόκαυστο στους 121 °C για 20 min. Η ρύθμιση του pH έγινε με χρήση υδροχλωρικού οξέος προ αποστείρωσης στο 6.5.

**Συνθήκες καλλιέργειας σε φιάλες:** Παρασκευάστηκαν καλλιέργειες 50 mL ATCC 460 (A<sub>2</sub>E<sub>6</sub>) μέσου σε φιάλες Erlenmeyer και διατηρήθηκαν για 4 ημέρες στους 23 °C χωρίς ανάδευση. Οι stock καλλιέργειες περιελάμβαναν πάντοτε το μέσο ATCC 460 προκειμένου να αποφευχθεί οποιοσδήποτε εγκλιματισμός σε πλούσια σε θρεπτικά συστατικά μέσα που θα τροποποιούσαν τα βιολογικά χαρακτηριστικά των φυκών. Οι καλλιέργειες στη συνέχεια χρησιμοποιήθηκαν ως εμβόλιο για προ-καλλιέργειες. Οι προ-καλλιέργειες (50 mL) περιείχαν 9 g / L γλυκόζη, 25 g / L θαλασσινά άλατα και 2 g / L yeast extract. Το pH ρυθμίστηκε στο 6.5 με υδροχλωρικό οξύ πριν την αποστείρωσή του. Το εμβόλιο καταλάμβανε το 10% του τελικού όγκου καλλιέργειας (Chalima, et al., 2019).

### 2.1.3 Χημικά Αντιδραστήρια – Αναλώσιμα Υλικά

Τα χημικά αντιδραστήρια που χρησιμοποιήθηκαν στην παρούσα διπλωματική εργασία προμηθεύτηκαν από τις εταιρίες Sigma-Aldrich (Η.Π.Α.), LAB-SCAN (Ιρλανδία), AppliChem (Γερμανία), Fisher Chemical/Scientific (Ηνωμένο Βασίλειο) και Macherey-Nagel (Γερμανία) και η καθαρότητά τους ήταν αναλυτικού βαθμού. Τα πλαστικά και γυάλινα εργαστηριακά υλικά που χρησιμοποιήθηκαν ήταν των εταιρειών Greiner-Bio One (Γερμανία), Sterilin Limited (Ηνωμένο Βασίλειο), SCHOTT AG (Γερμανία), Eppendorf (Γερμανία), Whatman (Ηνωμένο Βασίλειο), Millipore (Η.Π.Α.), ROTH (Η.Π.Α.), Kavalier (Τσεχία), Hirschmann EM Techcolor (Γερμανία) και TGI (Γερμανία).

### 2.1.4 Διαλύτες

Οι διαλύτες που χρησιμοποιήθηκαν κατά την εκπόνηση της παρούσας εργασίας παρουσιάζονται παρακάτω:

- Υπερκάθαρο και απιονισμένο H<sub>2</sub>O
- H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, Fisher Scientific (Ηνωμένο Βασίλειο)
- Χλωροφόρμιο, Fisher Chemical (Ηνωμένο Βασίλειο)
- Μεθανόλη, Sigma-Aldrich (Η.Π.Α.)
- HCl (πυκνό), Fisher Scientific (Ηνωμένο Βασίλειο)
- n-Hexane, LAB-SCAN (Ιρλανδία)

## 2.1.5 Ρυθμιστικά Διαλύματα

Κατά την διεξαγωγή των πειραμάτων, χρησιμοποιηθήκαν τα παρακάτω ρυθμιστικά διαλύματα με τη σύσταση και τη λειτουργία που υποδεικνύουν οι πίνακες.

Πίνακας 2.2. Σύσταση και λειτουργία των ρυθμιστικών διαλυμάτων

<i>Ρυθμιστικό διάλυμα</i>	<i>pH</i>	<i>Συστατικά</i>	<i>Συγκέντρωση (M)</i>	<i>Ρόλος</i>
<i>Κιτρικού- φωσφορικού</i>	5.0	Citric acid (C <sub>6</sub> H <sub>8</sub> O <sub>7</sub> ) 100 mM Sodium phosphate dibasic (Na <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> ) 200 mM *Προσθήκη NaN <sub>3</sub> 0,02% για συντήρηση	0.1	Ρυθμιστικό διάλυμα σε υδρολύσεις βιομάζας και διεργασίες SSF
<i>MES</i>	5.5	2-(N-morpholino) ethanesulfonic acid (C <sub>6</sub> H <sub>13</sub> NO <sub>4</sub> S)	0.08	Ρυθμιστικό διάλυμα σε υδρολύσεις βιομάζας και διεργασίες SHF
<i>Tris Buffer</i>				Συστατικό του θρεπτικού μέσου ATCC 460 A2E6 για τις στερεές καλλιέργειες του <i>C.ohnii</i>

## 2.1.6 Εμπορικά ένζυμα

Τα εμπορικά ένζυμα που χρησιμοποιήθηκαν στην παρούσα εργασία είναι το μίγμα κυτταρινασών/ημικυτταρινασών Cellic®CTec2 της εταιρίας Novozymes A/S (Bagsværd, Δανία).

## 2.1.7 Βιομάζα

Οι λιγνοκυτταρινούχες βιομάζες, των οποίων τα σάκχαρα χρησιμοποιήθηκαν ως υπόστρωμα για την παραγωγή γαλακτικού οξέος από το *Lactobacillus delbrueckii* και ω-3 λιπαρά οξέα από το *Cryptocodinium cohnii*, είναι προκατεργασμένο ξύλο οξιάς Lignocel HBS 150/500 (beechwood) και πεύκου (pine). Οι πούλπες προμηθεύτηκαν από το Ινστιτούτο Χημικών Διεργασιών και Ενεργειακών Πόρων (Ι.Δ.Ε.Π.) του Εθνικού Κέντρου Έρευνας & Τεχνολογικής Ανάπτυξης της Θεσσαλονίκης στα πλαίσια του προγράμματος «No Waste BioTech: Νέες τεχνολογίες μετατροπής βιομάζας αποβλήτων σε πρόσθετα τροφίμων και εξευγενισμένα χημικά», όπου και προκατεργάστηκαν με τη μέθοδο της ήπιας οργανολυτικής οξείδωσης. Τα λιγνοκυτταρινούχα υποστρώματα που μελετήθηκαν είχαν υποστεί ήπια υδροθερμική κατεργασία με χρήση μίας ποικιλίας οργανικών διαλυτών (EtOH, ACO, THF), χρόνων αντίδρασης (60 και 120 min), αρχικών πιέσεων O<sub>2</sub> (0, 8, 12, 16 και 25 bar) και θερμοκρασιών (150, 160 και 175°C). Η μελέτη έγινε σε 11 υποστρώματα οξιάς και 7 υποστρώματα πεύκου, το καθένα με διαφορετικές συνθήκες προκατεργασίας και τελικές συστάσεις κυτταρίνης/ημικυτταρίνης/λιγνίνης μετά την προκατεργασία, όπως παρουσιάζονται σε Πίνακα που ακολουθεί. Για σύγκριση, λήφθηκαν και οι ακατέργαστες βιομάζες των λιγνοκυτταρινούχων υλικών, έτσι ώστε να αξιολογηθεί περαιτέρω η αποτελεσματικότητα της υδρόλυσης και η παραγωγή προϊόντων προστιθέμενης αξίας από αυτά.

*Πίνακας 2.3 Συνθήκες προκατεργασίας και σύσταση των λαμβανόμενων πουλπών οξιάς Lignocel HBS 150/500 (beech wood) και πεύκου (pine), μετά από την προκατεργασία τους με ήπια υγρή οργανολυτική οξείδωση στο Ινστιτούτο Χημικών Διεργασιών και Ενεργειακών Πόρων (Ι.Δ.Ε.Π.) του Εθνικού Κέντρου Έρευνας & Τεχνολογικής Ανάπτυξης της Θεσσαλονίκης. Για κάθε είδος βιομάζας παρουσιάζεται και η σύσταση του δείγματος που δεν έχει υποστεί προκατεργασία.*

	Δείγμα (#)	Διαλύτες	Αναλογία διαλυτών	Αρχική πίεση O <sub>2</sub> (bar)	Θερμοκρασία αντίδρασης (°C)	Χρόνος αντίδρασης (min)	Κυτταρίνη (%)	Ημικυτταρίνη (%)	Λιγνίνη (%)
Lignocel HBS 150/500 (beechwood)	1	H <sub>2</sub> O/EtOH	(50/50) %	16	175	120	82,58	14,46	2,13
	2	H <sub>2</sub> O/THF	(50/50) %	16	175	120	85,16	10,62	2,64
	3	H <sub>2</sub> O/EtOH	(50/50) %	8	175	120	75,63	16,38	3,85
	4	H <sub>2</sub> O/THF	(50/50) %	8	175	120	76,36	13,58	6,47
	5	H <sub>2</sub> O/ACO	(50/50) %	12	175	120	79,5	13,2	1,46
	6	H <sub>2</sub> O/EtOH	(50/50) %	12	175	120	80,14	14,36	2,86
	7	H <sub>2</sub> O/THF	(50/50) %	12	175	120	80,11	11,39	5,77
	8	H <sub>2</sub> O/ACO	(50/50) %	25	175	120	80,28	12,26	1,58
	9	H <sub>2</sub> O/ACO	(50/50) %	12	175	60	73,82	16,31	3,86
	10	H <sub>2</sub> O/EtOH	(50/50) %	12	175	60	71,6	17,98	6,36
	11	H <sub>2</sub> O/THF	(50/50) %	12	175	60	73,5	14,64	7,95
21	Ακατέργαστο (Untreated)						39,4	20,3	22,65
Pine	12	H <sub>2</sub> O/EtOH	(50/50) %	16	175	60	77,6	13,23	7,18
	13	H <sub>2</sub> O/ACO	(50/50) %	16	175	60	82,75	10,13	4,23
	14	H <sub>2</sub> O/THF	(50/50) %	16	175	60	60,8	6,69	26,82
	15	H <sub>2</sub> O/THF	(50/50) %	16	175	120	71,31	6,78	17,59
	16	H <sub>2</sub> O/EtOH	(50/50) %	16	175	120	79,57	9,74	6,38
	17	H <sub>2</sub> O/THF	(50/50) %	16	150	120	62,26	11,98	23,94
	18	H <sub>2</sub> O/THF	(50/50) %	16	160	120	60,61	8,61	30,46
22	Ακατέργαστο (Untreated)						40,00	18,4	29,51

## 2.2 ΜΕΘΟΔΟΙ

### 2.2.1 Υδρολύσεις Βιομαζών

Η υδρόλυση της προκατεργασμένης λιγνοκυτταρινούχας βιομάζας έγινε ενζυμικά με τη χρήση εμπορικού σκευάσματος κυτταρινασών/ημικυτταρινασών Cellic®CTec2 (Novozymes), συγκέντρωσης 95.6 mg/mL. Η υδρόλυση έλαβε χώρα σε Erlenmeyer κωνικές φιάλες των 100 ή 50 mL και ο όγκος της αντίδρασης ως προς τον όγκο της φιάλης ορίστηκε σε λόγο ίσο με 1:10. Για κάθε λιγνοκυτταρινούχα βιομάζα, χρησιμοποιήθηκαν διπλά δείγματα, για μεγαλύτερη αξιοπιστία του αποτελέσματος. Όλες οι δοκιμές ενζυμικής υδρόλυσης διεξήχθησαν στις ακόλουθες συνθήκες λειτουργίας, οι οποίες είναι:

- 9% w/v φορτίο λιγνοκυτταρινούχου υλικού (Dry Matter, DM)
- 9% ενζυμικό φορτίο (mg ενζύμου/g υποστρώματος)
- pH=5.0
- 50°C
- 160 rpm

Ως ρυθμιστικό διάλυμα για την διεξαγωγή της υδρόλυσης χρησιμοποιήθηκε διάλυμα κιτρικού-φωσφορικού συγκέντρωσης 0.1 M και pH 5.0. Οι κωνικές φιάλες ασφαλίστηκαν με πώμα και επώαστηκαν για 72 ώρες (χρόνος υδρόλυσης) σε περιστρεφόμενο επωαστήρα υπό τις αναφερθείσες συνθήκες. Δειγματοληψία έγινε στις 8, 24, 48 και 72 ώρες για την αξιολόγηση της υδρόλυσης.



### 2.2.1.1 Αξιολόγηση της υδρόλυσης

Η αξιολόγηση της υδρόλυσης έγινε με τη μέθοδο DNS για τη μέτρηση των συνολικών απελευθερωμένων αναγωγικών σακχάρων (TRS) και τη μέθοδο GOD/PAP (glucotest) για τη μέτρηση της γλυκόζης. Η προετοιμασία των δειγμάτων για την ανάλυση με τις παραπάνω μεθόδους περιλαμβάνει τα εξής βήματα:

1. Δειγματοληψία 1 mL με χρήση πιπέτας 100-1000mL και φύλαξη δείγματος σε Eppendorf χωρητικότητας 1.5 mL. Για τις 72 h ώρες έγινε περισυλλογή σε falkon των 50 mL.
2. Βύθιση των Eppendorf, ή αντίστοιχα falkon, σε υδατόλουτρο (100°C) και παραμονή για 5 λεπτά
3. Φυγοκέντρηση των δειγμάτων για 10-15 λεπτά μέχρι 10.000 rpm
4. Συλλογή του υπερκείμενου υγρού
5. Αραίωση με τον κατάλληλο συντελεστή και αξιολόγηση των απελευθερωμένων σακχάρων με μέτρηση των αναγωγικών σακχάρων (μέθοδος DNS) και γλυκόζης (glucotest). Οι συντελεστές αραίωσης δίνονται στον παρακάτω πίνακα, βάσει του χρόνου δειγματοληψίας και της μεθόδου αξιολόγησης της υδρόλυσης. Για τις αραιώσεις χρησιμοποιήθηκε πάντα υπερκάθαρο H<sub>2</sub>O.

Πίνακας 2.4. Ενδεικτικοί συντελεστές αραίωσης βάσει του χρόνου δειγματοληψίας υδρολύματος από λιγνοκυτταρινούχα βιομάζα.

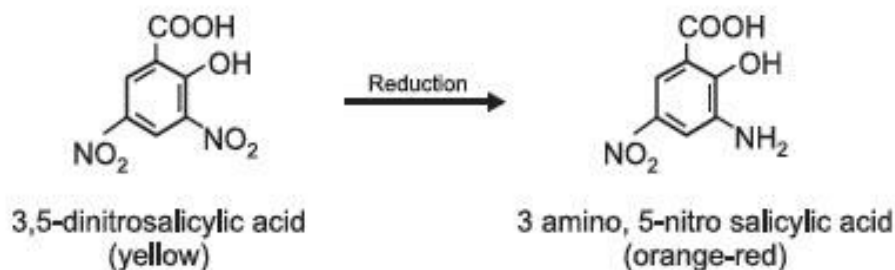
Χρόνος Υδρόλυσης (h)	Συντελεστής Αραίωσης	
	Μέθοδος DNS	Glucotest
8	50	50
24	100	100
48	100	200
72	200	200

#### 2.2.1.1.1 Εκτίμηση των συνολικών αναγωγικών σακχάρων με τη μέθοδο του δινιτροσαλικυλικού οξέος (DNS)

Η μέθοδος του 3,5-δινιτροσαλικυλικού οξέος (DNS) παρέχει μια ταχεία και απλή εκτίμηση του βαθμού σακχαροποίησης μετρώντας τη συνολική ποσότητα των αναγωγικών σακχάρων στο υδρόλυμα (Marsden, et al., 1982). Το 1921, ο Sumner εισήγαγε τη μέθοδο δινιτροσαλικυλικού οξέος (DNS) για την ανίχνευση αναγωγικών σακχάρων σε ούρα φυσιολογικά και προερχόμενα από ανθρώπους με διαβήτη.

**Αρχή της μεθόδου:** Η μέθοδος βασίζεται στο ότι το DNS αντιδρά με αναγωγικά σάκχαρα και άλλα αναγωγικά μόρια (που περιέχουν ελεύθερη ομάδα καρβονυλίου), σε αλκαλικό διάλυμα σχηματίζοντας 3-αμινο-5-νιτροσαλικυλικό οξύ, μια αρωματική ένωση που απορροφά έντονα το φως στα 540 nm, επιτρέποντας, έτσι, μια ποσοτική φασματοφωτομετρική μέτρηση της ποσότητας των υπαρχόντων αναγωγικών

σακχάρων (Gonc,alves, et al., 2010). Το χρώμα του αντιδραστηρίου αλλάζει από κίτρινο σε πορτοκαλί ή κόκκινο, ανάλογα με τη συγκέντρωση του υπάρχοντος αναγωγικού σακχάρου. Η μέθοδος DNS μπορεί να ανιχνεύσει συγκεντρώσεις γλυκόζης μεταξύ 0,5 mM (0,09% γλυκόζη w/v) και 40 mM (0,72% γλυκόζη w/v).



Εικόνα 2.2. Η αντίδραση αναγωγής του 3,5-δινιτροσαλικυλικού οξέος σε 3-αμινο-5-νιτροσαλικυλικό οξύ σε αλκαλικό περιβάλλον και θέρμανση, που συνοδεύεται από αλλαγή χρώματος του δείγματος από κίτρινο σε πορτοκαλί-κόκκινο. (Biocyclopedia, n.d.)

- **Παρασκευή διαλύματος 3,5-δινιτροσαλικυλικού οξέος:** Το αντιδραστήριο DNS παρασκευάζεται με διάλυση 5 g άνυδρου δινιτροσαλικυλικού οξέος σε 250 mL απεσταγμένου νερού στους 80 ° C. Όταν το διάλυμα φθάσει σε θερμοκρασία δωματίου, προστίθενται 100 mL διαλύματος NaOH, 2 N (2 N NaOH περιέχουν 0,80 g NaOH σε 100 mL διαλύματος) και 201.35 g potassium sodium tartarate και ο όγκος συμπληρώνεται με απεσταγμένο νερό έως 500 mL.
- **Μέθοδος:** 250 μL αντιδραστηρίου δινιτροσαλικυλικού οξέος και 250 μL δείγματος ή αποσταγμένου νερού (τυφλό) προστίθενται στους δοκιμαστικούς σωλήνες. Οι σωλήνες βυθίζονται σε υδατόλουτρο (100 ° C), για 5 λεπτά και στη συνέχεια αφήνονται να ψυχθούν σε θερμοκρασία δωματίου, ενώ σε κάθε σωλήνα προστίθενται 2 mL υπερκάθαρου νερού, με αποτέλεσμα το τελικό μίγμα αντίδρασης. Ακολουθεί ανάδευσή τους με Vortex.
- **Μέτρηση:** Όταν οι σωλήνες φθάσουν σε θερμοκρασία δωματίου και αναδευτούν καλά, 250 μL του προκύπτοντος μίγματος αντίδρασης του εκάστοτε δοκιμαστικού σωλήνα μεταφέρονται σε κάθε κελί σε πλακάκι microplate. Στη συνέχεια, η απορρόφηση διαβάζεται σε συσκευή φωτομέτρησης microplate reader Spectra Max 250 (Molecular Devices) σε μήκος κύματος 540 nm.
- **Κατασκευή καμπύλης αναφοράς DNS:** Η πρότυπη καμπύλη κατασκευάζεται με εμπορικό σάκχαρο D-γλυκόζη (Sigma-Aldrich, Η.Π.Α.). Η γλυκόζη διαλύεται σε απιονισμένο νερό σε συγκέντρωση 2.0 mg/mL και έπειτα από κατάλληλες αραιώσεις ετοιμάζονται διαλύματα συγκέντρωσης γλυκόζης 0.2, 0.6, 1.0, 1.4, 1.8, mg/mL. Πραγματοποιείται η μέθοδος όπως περιγράφεται παραπάνω και για τις γνωστές τιμές συγκέντρωσης γλυκόζης λαμβάνονται τιμές απορρόφησης. Η καμπύλη αναφοράς κατασκευάζεται με τη μέθοδο ελαχίστων τετραγώνων. Ως τυφλό διάλυμα χρησιμοποιείται απιονισμένο νερό.

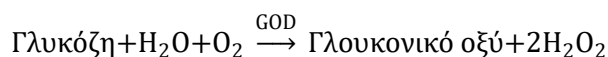


Εικόνα 2.3. Η συσκευή φωτομέτρησης microplate reader Spectra Max 250 (Molecular Devices)

#### 2.2.1.1.2 Εκτίμηση της γλυκόζης με τη μέθοδο GOD/PAP (glucotest)

Η μέτρηση της γλυκόζης στα αραιωμένα δείγματα των υδρολυμάτων έγινε με τη μέθοδο GOD/PAP. Ως εμπορικό αντιδραστήριο χρησιμοποιήθηκε το σάκχαρο GOD/PAP της εταιρίας biosis (Βιοτεχνολογικές Εφαρμογές Ε.Π.Ε, Ελλάδα).

**Αρχή της μεθόδου:** Παρουσία του ενζύμου οξειδάση της γλυκόζης (GOD) η γλυκόζη οξειδώνεται και παράγει  $H_2O_2$ . Η αντίδραση του  $H_2O_2$  με φαινολικό παράγωγο και 4-αμινοφαιναζόνη καταλύεται από το ένζυμο υπεροξειδάση (POD) και παράγει έγχρωμο προϊόν ερυθρού χρώματος, σύμφωνα με τις παρακάτω αντιδράσεις:



Η αύξηση της απορρόφησης στα 510 nm είναι ανάλογη της συγκέντρωσης της γλυκόζης στο δείγμα (biosis, n.d.).

- **Μέθοδος:** Τοποθετούνται 240  $\mu\text{L}$  εμπορικού σκευάσματος σακχάρου GOD/PAP σε κάθε κελί πλακακίου microplate και προστίθενται 10  $\mu\text{L}$  από κάθε δείγμα γλυκόζης ή απιονισμένο νερό (τυφλό). Ακολουθεί επώαση του προκύπτοντος μείγματος στους 37  $^{\circ}\text{C}$  για 15 λεπτά και η απορρόφηση διαβάζεται σε συσκευή φωτομέτρησης microplate Spectra Max 250 (MolecularDevices) SPECTROstar Nano Microplate Reader (BMG Labtech) σε μήκος κύματος 510 nm.
- **Κατασκευή καμπύλης αναφοράς DNS:** Η πρότυπη καμπύλη κατασκευάζεται με εμπορικό σάκχαρο D-γλυκόζη (Sigma-Aldrich, Η.Π.Α.). Η γλυκόζη διαλύεται σε απιονισμένο νερό σε συγκέντρωση 2.0 mg/mL και έπειτα από κατάλληλες αραιώσεις ετοιμάζονται διαλύματα συγκέντρωσης γλυκόζης 0.1,

0.2, 0.4, 1.0, 1.4, mg/mL. Πραγματοποιείται η μέθοδος όπως περιγράφεται παραπάνω και για τις γνωστές τιμές συγκέντρωσης γλυκόζης λαμβάνονται τιμές απορρόφησης. Η καμπύλη αναφοράς κατασκευάζεται με τη μέθοδο ελαχίστων τετραγώνων. Ως τυφλό διάλυμα χρησιμοποιείται απιονισμένο νερό.

### 2.2.1.1.3 Γενική ανίχνευση προϊόντων υδρόλυσης

Ο ποιοτικός και ποσοτικός προσδιορισμός των σακχάρων που απελευθερώθηκαν από την δράση των κυτταρινασών/ημικυτταρινασών στις μελετώμενες βιομάζες έγινε με Υγρή Χρωματογραφία Υψηλής Πίεσης (HPLC), για υψηλότερη ακρίβεια και καλύτερη αξιολόγηση της υδρόλυσης. Για το σκοπό αυτό, χρησιμοποιήθηκε σύστημα Υγρής Χρωματογραφίας Υψηλής Πίεσης από την εταιρία Shimadzu (H.P.A).

**Αρχή της μεθόδου:** Η αρχή διαχωρισμού της HPLC βασίζεται στην κατανομή του αναλύτη (δείγματος) μεταξύ μιας κινητής φάσης (εκλούτης) και μίας σταθερής φάσης (υλικό συσκευασίας της στήλης). Ανάλογα με τη χημική δομή της αναλυόμενης ουσίας, τα μόρια καθυστερούν κατά τη διάρκεια της στατικής φάσης. Οι ειδικές ενδομοριακές αλληλεπιδράσεις μεταξύ των μορίων ενός δείγματος και του υλικού συσκευασίας καθορίζουν τον χρόνο τους "επί στήλης". Ως εκ τούτου, τα διαφορετικά συστατικά ενός δείγματος εκλούνται σε διαφορετικούς χρόνους. Έτσι επιτυγχάνεται ο διαχωρισμός των συστατικών του δείγματος. Γενικά, ένα σύστημα HPLC απαρτίζεται από τις εξής μονάδες: δεξαμενή διαλύτη, αντλία, βαλβίδα ένεσης, στήλη, μονάδα ανιχνευτή και μονάδα επεξεργασίας δεδομένων.

- **Μέθοδος:** Μία μονάδα ανίχνευσης (π.χ. ανιχνευτής UV) αναγνωρίζει τους αναλύτες μετά την διέλευση από τη στήλη. Τα σήματα μετατρέπονται και καταγράφονται από ένα σύστημα διαχείρισης δεδομένων (λογισμικό υπολογιστή) και στη συνέχεια εμφανίζονται σε ένα χρωματογράφημα. Αφού περάσει τη μονάδα ανιχνευτή, η κινητή φάση μπορεί να υποβληθεί σε πρόσθετες μονάδες ανιχνευτή, μονάδα συλλογής κλάσματος ή στα απόβλητα. Στην παρούσα εργασία, η ανάλυση των δειγμάτων διεξήχθη στους 50 °C χρησιμοποιώντας 103 μL H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> σε 1 L υπερκάθαρου H<sub>2</sub>O ως κινητή φάση και σταθερό ρυθμό ροής 0,6 mL ανά λεπτό. Ο χρόνος ανάλυσης του δείγματος ήταν 40 λεπτά ενώ ο όγκος δειγματοληψίας από την βαλβίδα ένεσης ήταν 5 μL. Η θερμοκρασία της στήλης διατηρήθηκε σταθερή χρησιμοποιώντας θερμοαντήρα στήλης (Merck Millipore, Darmstadt, Γερμανία).
- **Προετοιμασία δειγμάτων:** Λαμβάνεται μικρή ποσότητα (περίπου 300-500 μL) από κάθε μη αραιωμένο δείγμα υδρόλυσης και ακολουθεί φιλτράρισμα τους με χρήση φίλτρων 0.2 μm. Το φιλτραρισμένο δείγμα εναποτίθεται σε vial, σφραγίζεται και τοποθετείται στην θέση υποδοχής στο σύστημα HPLC.
- **Ποσοτικός και ποιοτικός προσδιορισμός:** Για την επεξεργασία των αποτελεσμάτων που λήφθηκαν από το σύστημα HPLC χρησιμοποιήθηκε λογισμικό LC-Solution. Από τα λαμβανόμενα χρωματογραφήματα γίνεται ολοκλήρωση των κορυφών αυτόματα ή χειροκίνητα (όπου χρειάζεται). Ο ποιοτικός προσδιορισμός των σακχάρων γίνεται βάσει του χρόνου έκλυσης

(retention time, RT) και τα εμβαδά μετατρέπονται σε συγκεντρώσεις συστατικών, βάσει πρότυπων καμπύλων αναφοράς για κάθε σάκχαρο.

- **Κατασκευή καμπύλης αναφοράς σακχάρων και λοιπών παραπροϊόντων υδρόλυσης:** Για τις πρότυπες καμπύλες χρησιμοποιούνται εμπορικά σάκχαρα γλυκόζη, γαλακτόζη, μαννόζη, αραβινόζη, ξυλόζη, κελλοβιόζη και ουσίες που αποτελούν παραπροϊόντα της υδρόλυσης όπως φορμικό οξύ, οξικό οξύ, αιθανόλη και HMF. Κάθε ουσία διαλύεται σε απιονισμένο νερό σε συγκέντρωση 2.0 mg/mL και έπειτα από κατάλληλες αραιώσεις ετοιμάζονται διαλύματα γνωστών συγκεντρώσεων. Τα δείγματα αναλύονται σε σύστημα HPLC, όπου λαμβάνονται εμβαδά κορυφών για κάθε γνωστή συγκέντρωση. Βάσει αυτών για κάθε συστατικό κατασκευάζεται η καμπύλη συσχέτισης εμβαδού-συγκέντρωσης με τη μέθοδο ελαχίστων τετραγώνων, και εξάγεται ένας συντελεστής μετατροπής (κλίση καμπύλης αναφοράς). Ως τυφλό διάλυμα χρησιμοποιείται απιονισμένο νερό. Βάσει του χρόνου στον οποίο εμφανίζεται κάθε κορυφή για κάθε συστατικό, προσδιορίστηκε ο χρόνος έκλουσης.

Πίνακας 2.5. Χρόνοι έκλουσης και συντελεστές μετατροπής, όπως διεξήχθησαν από ανάλυση πρότυπων διαλυμάτων με Υγρή Χρηματογραφία Υψηλής Πίεσης (HPLC)

Συστατικό	RT	Συντελεστής
Γλυκόζη	9,545	0,0000208
Ξυλόζη	10,239	0,0000138
Γαλακτόζη	10,403	0,0000195
Μαννόζη	10,431	0,0000195
Αραβινόζη	11,539	0,0000266
Φορμικό οξύ	13,898	0,0000011
Οξικό οξύ	15,052	0,0000006
Αιθανόλη	19,408	0,0000018
HMF	24,551	0,0000095

### 2.2.1.2 Επιλογή βιομαζών για την παραγωγή προϊόντων προστιθέμενης αξίας

Ύστερα από την αξιολόγηση της ενζυμικής υδρόλυσης στα διάφορα λιγνοκυτταρινούχα υλικά, έγινε επιλογή των βιομαζών που θα χρησιμοποιηθούν ως υποστρώματα για την παραγωγή γαλακτικού οξέος από γαλακτικά βακτήρια και ω-3 λιπαρών οξέων από μικροφύκη. Κριτήριο για την επιλογή αυτή, αποτέλεσε η μετατροπή της κυτταρίνης σε μονομερή σάκχαρα (γλυκόζη), η οποία προσδιορίστηκε μέσω της σχέσης:

$$\%Cellulose\ conversion = \frac{Glc \times 100 \times 100}{90 \times 1.111 \times \%Cellulose}$$

Όπου:

- Glc: συγκέντρωση γλυκόζης (mg/mL), όπως αυτή προσδιορίζεται από τη μέθοδο GOD/PAP ή HPLC

- 90: Το φορτίο του λιγνοκυτταρινούχου υλικού (Dry Matter) που εφαρμόστηκε σε όλες τις υδρολύσεις σε g, ανηγμένα στο 1 L
- 1.111: ο συντελεστής μετατροπής της κυτταρίνης σε γλυκόζη
- % Cellulose: Σύσταση του προκατεργασμένου ή μη λιγνοκυτταρινούχου υλικού σε κυτταρίνη (βλ. Πίνακας 2.3)

## 2.2.2 Παραγωγή γαλακτικού οξέος από *Lactobacillus delbrueckii*

Η διεργασία ζύμωσης που εφαρμόστηκε για την παραγωγή γαλακτικού οξέος από γαλακτικά βακτήρια είναι η SSF (ταυτόχρονη σακχαροποίηση και ζύμωση). Κριτήριο για την επιλογή της διεργασίας αποτέλεσε η αντοχή και υψηλή προσαρμοστικότητα του στελέχους *Lactobacillus delbrueckii* στις συνθήκες που λαμβάνει χώρα η υδρόλυση. Ως θερμοκρασία διεργασίας επιλέχθηκαν οι 44°C, όπου ο μικροοργανισμός και η υδρόλυση μπορούν να λειτουργήσουν αποτελεσματικά, σε pH=5.0 που προϋποθέτει η υδρόλυση.

### 2.2.2.1 Καλλιέργειες για παραγωγή γαλακτικού οξέος

Από το σύνολο των βιομαζών επιλέχθηκαν οι «καλύτερες» λιγνοκυτταρινούχες βιομάζες ως υπόστρωμα για την ενζυμική υδρόλυση και ζύμωση, υπό τη μορφή πούλπας. Το control δείγμα περιείχε απροκατέργαστο λιγνοκυτταρινούχο υλικό ως υπόστρωμα. Για κάθε βιομάζα πραγματοποιήθηκαν διπλές καλλιέργειες, για μεγαλύτερη αξιοπιστία του αποτελέσματος. Η διεργασία SSF πραγματοποιήθηκε σε vials, τα οποία σφραγίστηκαν με μεταλλικό καπάκι, έτσι ώστε να εξασφαλισθούν οι αναερόβιες συνθήκες που απαιτεί η ανάπτυξη του μικροοργανισμού, με ρύθμιση των παρακάτω παραμέτρων:

- Προσθήκη 9% DM (φορτίο στερεού υποστρώματος)
- Προσθήκη 4,5% CaCO<sub>3</sub>
- Όγκος καλλιέργειας: 20 mL
- pH=5.0 (ρύθμιση με acetic acid ή NaOH)
- Προσθήκη 9 mg ενζύμου Cellic@CTec2 ανά g υποστρώματος (ενζυμικό φορτίο)
- Επώαση στους 44°C, σε 160 rpm

**Προσθήκη CaCO<sub>3</sub>:** Η προσθήκη CaCO<sub>3</sub> κρίνεται απαραίτητη κατά την SSF διεργασία παραγωγής γαλακτικού οξέος καθώς κατά τη διάρκεια της βιομετατροπής, η συσσώρευση γαλακτικού οξέος οξινίζει τον ζωμό ζύμωσης, προκαλώντας αναστολή του μεταβολισμού των βακτηρίων και περιορίζοντας έτσι την αποτελεσματικότητα της μεθόδου και την απόδοση. Η προσθήκη CaCO<sub>3</sub> μπορεί να ανακουφίσει αποτελεσματικά τις δυσμενείς επιπτώσεις του χαμηλού pH και να ενισχύσει την παραγωγή γαλακτικού οξέος. Αυτή προστίθεται πάντα στη μισή ποσότητα του στερεού υποστρώματος.

Οι καλλιέργειες επωάστηκαν για 168 ώρες σε περιστρεφόμενο επωαστήρα, με δειγματοληψία κάθε 24 ώρες. Για την ανίχνευση του γαλακτικού οξέος και των εναπομεινάντων σακχάρων στην καλλιέργεια, ακολουθήθηκε η εξής διαδικασία:

1. Δειγματοληψία 300-500  $\mu\text{L}$  με χρήση σύριγγας και φύλαξη δείγματος σε Eppendorf χωρητικότητας 1.5 mL.
2. Βύθιση των Eppendorf σε υδατόλουτρο ( $100^{\circ}\text{C}$ ) και παραμονή για 5 λεπτά
3. Διαχωρισμός του υγρού της καλλιέργειας με φυγοκέντρηση των δειγμάτων για 35 λεπτά μέχρι 10.000 rpm
4. Συλλογή του υπερκείμενου υγρού

#### 2.2.2.1.1 Μέθοδοι ανίχνευσης γαλακτικού οξέος

Η ανίχνευση του γαλακτικού οξέος μπορεί να γίνει είτε στιγμιαία φασματοφωτομετρικά με τη χρήση διαλύματος  $\text{FeCl}_3$  είτε με πιο εξειδικευμένες μεθόδους ενόργανης ανάλυσης όπως HPLC, που αναφέρθηκε στην Παράγραφο 2.2.1.1.3. Για τον ποσοτικό προσδιορισμό του γαλακτικού οξέος στο εν λόγω πείραμα, εφαρμόστηκε αρχικά η φασματοφωτομετρική μέθοδος, ως αρχική ένδειξη, και περαιτέρω HPLC για μεγαλύτερη ακρίβεια και αξιοπιστία του αποτελέσματος.

##### 2.2.2.1.1.1 Φασματοφωτομετρική μέθοδος προσδιορισμού του γαλακτικού οξέος

Η μέθοδος αυτή αποτελεί μία απλή, φθηνή και ταχεία μέθοδο για τον προσδιορισμό L- και D-ισομερών του γαλακτικού οξέος, κατάλληλη, ιδιαίτερα, για τη μικροβιολογική βιομηχανία στον προσδιορισμό του γαλακτικού οξέος σε υγρά καλλιέργειών.

**Αρχή της μεθόδου:** Η αντίδραση του χλωριούχου σιδήρου (III) με γαλακτικό οξύ σε ένα υδατικό διάλυμα έχει ως αποτέλεσμα το σχηματισμό κιτρινο-πράσινου γαλακτικού σιδήρου (III) στο διάλυμα, ο οποίος εμφανίζει μέγιστο απορρόφησης στα 390 nm (Borshchevskaya, et al., 2016).

- **Παρασκευή αντιδραστήριου:** Παρασκευάζεται διάλυμα χλωριούχου σιδήρου (III) περιεκτικότητας 0.03% w/v. Σε 50 mL υπερκάθαρου  $\text{H}_2\text{O}$  προστείνονται 0.025 g  $\text{FeCl}_3$  άνυδρου (Fisher Chemical, Γερμανία). Ακολουθεί ανάδευση μέχρι πλήρους διάλυσης του στερεού. Το διάλυμα πρέπει να έχει θερμοκρασία δωματίου  $25 \pm 5^{\circ}\text{C}$ .
- **Μέθοδος:** Το υπερκείμενο υγρό αραιώνεται 50 φορές με απιονισμένο νερό. Για τις 0 ώρες δεν πραγματοποιείται αραιώση. Λαμβάνονται 20  $\mu\text{L}$  από κάθε δείγμα και προστίθενται σε 200  $\mu\text{L}$  διαλύματος χλωριούχου σιδήρου (III) 0,03% w/v εντός κελιού microplate. Ακολουθεί ανάδευση, και στιγμιαία μέτρηση της απορρόφησης στα 390 nm εντός συσκευής φωτομέτρησης microplate reader Spectra Max 250 (Molecular Devices) Ως τυφλό διάλυμα χρησιμοποιείται απιονισμένο νερό. Η αντίδραση και οι μετρήσεις διεξήχθησαν στους  $25 \pm 5^{\circ}\text{C}$ . Το χρώμα του διαλύματος ήταν σταθερό για 15 λεπτά.
- **Κατασκευή καμπύλης αναφοράς:** Η πρότυπη καμπύλη κατασκευάζεται με εμπορικό σκεύασμα γαλακτικού οξέος (Sigma-Aldrich, Η.Π.Α.). Το γαλακτικό

οξύ διαλύεται σε απιονισμένο νερό σε συγκέντρωση 2.0 mg/mL και έπειτα από κατάλληλες αραιώσεις ετοιμάζονται διαλύματα συγκέντρωσης γαλακτικού οξέος 0.1, 0.2, 0.4, 1.0, 1.4, mg/mL. Πραγματοποιείται η μέθοδος όπως περιγράφεται παραπάνω και για τις γνωστές τιμές συγκέντρωσης γαλακτικού οξέος λαμβάνονται τιμές απορρόφησης. Η καμπύλη αναφοράς κατασκευάζεται με τη μέθοδο ελαχίστων τετραγώνων. Ως τυφλό διάλυμα χρησιμοποιείται απιονισμένο νερό. Ενδεικτικά, αναφέρεται ότι η απορρόφηση του διαλύματος γαλακτικού σιδήρου (III) είναι ανάλογη της συγκέντρωσης γαλακτικού οξέος στην περιοχή από 0,5 έως 11 g / L.

### 2.2.2.1.2 Μέθοδοι ανίχνευσης γλυκόζης

Ο ποσοτικός προσδιορισμός της γλυκόζης στα δείγματα, που αποτελεί ένα μέτρο για την ικανότητα ανάπτυξης του μικροοργανισμού υπό τις πειραματικές συνθήκες, πραγματοποιήθηκε ενζυμικά με glucotest (μέθοδος GOD/PAP που περιεγράφηκε στην παράγραφο 2.2.2.1.2) και περαιτέρω με HPLC, για μεγαλύτερη ακρίβεια και αξιοπιστία του αποτελέσματος, όπως περιεγράφηκε στην Παράγραφο 2.2.1.1.3.

### 2.2.2.1.3 Αξιολόγηση της διεργασίας

Η διεργασία SSF αξιολογήθηκε με βάση την απόδοση του γαλακτικού οξέος. Αυτή ορίζεται ως:

$$\% \text{Απόδοση} = \frac{\text{Πειραματική συγκέντρωση γαλακτικού οξέος}}{\text{Θεωρητικά παραγόμενη συγέντρωση γαλακτικού οξέος}}$$

Όπου η θεωρητικά παραγόμενη συγκέντρωση προκύπτει ως η μετατροπή όλης της περιεχόμενης γλυκόζης της βιομάζας σε γαλακτικό οξύ, βάσει της ομογαλακτικής ζύμωσης που ακολουθεί ο μικροοργανισμός:



Η ομογαλακτική ζύμωση θεωρητικά αποδίδει 2 γραμμομόρια γαλακτικού οξέος ανά γραμμομόριο καταναλισκόμενης γλυκόζης με θεωρητική απόδοση 1 g προϊόντος ανά γραμμάριο υποστρώματος (Martinez, et al., 2013).

Έτσι, ως απόδοση γαλακτικού οξέος ορίζεται:

$$\% \text{Απόδοση} = \frac{\text{Πειραματική συγκέντρωση γαλακτικού οξέος}}{1,111 * (\% \text{Κυτταρίνη} + \% \text{Γαλακτόζη} + \% \text{Μαννόζη}) * DM}$$

Όπου:

- 1,111: ο συντελεστής μετατροπής όλων των εξοζών σε γλυκόζη
- %Κυτταρίνη, %Γαλακτόζη, % Μαννόζη: τα ποσοστά περιεχόμενης κυτταρίνης, γαλακτόζης και μαννόζης στη βιομάζα
- DM: η συγκέντρωση των στερεών στην καλλιέργεια (g/L)



## 2.2.3 Παραγωγή ω-3 λιπαρών οξέων από *Cryptocodinium cohnii*

Ως διεργασία ζύμωσης για την παραγωγή ω-3 λιπαρών οξέων από το μικροφύκος *Cryptocodinium cohnii* επιλέχθηκε η SHF (ξεχωριστή υδρόλυση και ζύμωση). Καθώς ο μικροοργανισμός αναπτύσσεται βέλτιστα σε θερμοκρασίες 20-25 °C και pH παραπλήσιο με της θάλασσας αδυνατεί να ανταπεξέλθει στις υψηλές θερμοκρασίες και το χαμηλό pH που επιβάλλει η δράση των κυτταρινασών. Έτσι, η διεργασία περιλαμβάνει τα παρακάτω διακριτά στάδια για την παραγωγή και απομόνωση των λιπαρών οξέων.

### 2.2.3.1 Προϋδρόλυση λιγνοκυτταρινούχου βιομάζας

Αποτελεί το πρώτο στάδιο της διεργασίας, κατά το οποίο επιλέχθηκαν οι «καλύτερες» βιομάζες και σε επόμενο στάδιο, υδrolύθηκαν για 72 ώρες υπό τη δράση εμπορικών κυτταρινασών/ημικυτταρινασών Cellic®CTec2 (Novozymes). Η προϋδρόλυση έλαβε χώρα σε Erlenmeyer κωνικές φιάλες των 250 mL και ο όγκος της αντίδρασης ορίστηκε ως το 10% (v/v). Επιλέχθηκαν φορτίο υποστρώματος 9% (w/v) DM και ενζυμικό φορτίο 15 mg/g υποστρώματος. Ως περιβάλλον υδρόλυσης χρησιμοποιήθηκε το ρυθμιστικό διάλυμα MES, συγκέντρωσης 80 mM με pH 5.5. Ως control δείγμα χρησιμοποιήθηκε το avicel. Οι κωνικές φιάλες τοποθετήθηκαν σε περιστρεφόμενο επωαστήρα σε θερμοκρασία 50 °C και 160 rpm. Μετά το πέρας των 72 ωρών, ο όγκος της καλλιέργειας συλλέχθηκε σε falckon των 50 mL και ακολουθήθηκε η όλη διαδικασία απομόνωσης των απελευθερόντων σακχάρων που περιεγράφηκε στην Παράγραφο 2.2.1.1. Εν συνεχεία, το καθαρό υδρόλυμα χρησιμοποιήθηκε ως τροφοδοσία για τις καλλιέργειες του *C. cohnii*.

### 2.2.3.2 Καλλιέργεια για παραγωγή ω-3 λιπαρών οξέων

Η ζύμωση έλαβε χώρα σε Erlenmeyer κωνικές φιάλες, με όγκο καλλιέργειας 30 mL και όγκο εμβολίου 10% (v/v) (3 mL). Ως πηγές άνθρακα χρησιμοποιήθηκαν σάκχαρα προερχόμενα από υδρόλυση λιγνοκυτταρινούχου υλικού και καθαρά σάκχαρα. Ως πηγή αζώτου χρησιμοποιήθηκε yeast extract σε συγκέντρωση 2 g/l. Λοιπά ανόργανα άλατα (sea salts) περιέχονταν στο υγρό της καλλιέργειας σε συγκέντρωση 30 g/L. Για κάθε πηγή άνθρακα πραγματοποιήθηκαν διπλές καλλιέργειες. Οι κωνικές φιάλες τοποθετούνται σε περιστρεφόμενο επωαστήρα ZHWY-211C και επωάζονται σε θερμοκρασία 23°C, 160 rpm για 120 ώρες.

#### 2.2.3.2.1 Προετοιμασία καλλιεργείων

**A) Καλλιέργειες με λιγνοκυτταρινούχα βιομάζα:** 27 mL υδrolύματος προστίθενται σε falckon μαζί με 1.5 g sea salts και 0.12 g yeast extract και το μίγμα αναδεύεται καλά μέχρι πλήρους διάλυσης των στερεών. Το μίγμα εμποτίζεται σε κωνική φιάλη των 250 mL και ακολουθεί ρύθμιση του pH στο 6.5 με χρήση NaOH ή HCl. Αποστειρώνεται στους 109°C για 40 min. Ακολουθεί προσθήκη του εμβολίου (3 mL) σε αποστειρωμένο περιβάλλον.

**B) Καλλιέργειες με καθαρά σάκχαρα:** Ζυγίζονται, αρχικά, τα σάκχαρα ξεχωριστά σε κωνικές φιάλες και αποστειρώνονται στους 109 °C για 40 min. Παράλληλα, παρασκευάζεται υγρό θρεπτικό με yeast extract και sea salts για όλες τις καλλιέργειες. Σε μπουκάλι αποστείρωσης προστίθενται λίγα mL υπερκάθαρου H<sub>2</sub>O και κατόπιν τα στερεά. Το μίγμα τοποθετείται σε συσκευή μαγνητικής ανάδευσης μέχρι πλήρους διάλυσης των στερεών και συμπληρώνεται με την απαιτούμενη ποσότητα miLLi-Q. Αποστειρώνεται στους 109°C για 40 λεπτά, και ακολουθεί προσθήκη 27 mL σε κάθε κωνική φιάλη με τα αποστειρωμένα σάκχαρα. Τέλος, προστίθεται το εμβόλιο σε αποστειρωμένο περιβάλλον.

#### 2.2.3.2.2 Μέτρηση συγκέντρωσης κυττάρων με θολοσιμετρία

Η κυτταρική συγκέντρωση προσδιορίζεται σε ημερήσια βάση, προκειμένου να παρακολουθείται η ανάπτυξη του μικροφύκου. Το δείγμα καλλιέργειας αραιώνεται με απιονισμένο νερό 4,5,10 ή 20 φορές (ανάλογα με το στάδιο της ανάπτυξης) σε τελικό όγκο 1 mL. Η μέτρηση της οπτικής πυκνότητας O.D 685 nm πραγματοποιήθηκε με φωτόμετρο UV2000, Hitachi ενώ ως μηδενική απορρόφηση θεωρείται η απορρόφηση του απιονισμένου νερού.

Η τιμή της κυτταρικής συγκέντρωσης προκύπτει ως γινόμενο της απορρόφησης του αραιωμένου δείγματος επί την εκάστοτε αραιώση.

#### 2.2.3.2.3 Μέτρηση των καταναλωθέντων σακχάρων/γλυκόζης

Η συγκέντρωση των ολικών αναγωγικών σακχάρων (TRS) του υγρού της καλλιέργειας προσδιορίζεται με τη μέθοδο DNS. Ο ποιοτικός και ποσοτικός προσδιορισμός των επιμέρους αναγωγικών σακχάρων (γλυκόζη, ξυλόζη κ.ά) γίνεται με ανάλυση σε HPLC με τη μέθοδο H-Column.

Για την ανάλυσή τους, κρίνεται απαραίτητη η συλλογή του υγρού της καλλιέργειας και ο διαχωρισμός του από τα κύτταρα. Η διαδικασία που ακολουθείται είναι η εξής:

1. Δειγματοληψία 1 mL από κάθε καλλιέργεια και συλλογή σε σωληνάκι Eppendorf
2. Φυγοκέντρηση για 10-12 λεπτά σε 10.000 rpm σε ψυχόμενη φυγόκεντρο
3. Συλλογή υπερκείμενου υγρού

Για την ανάλυση με DNS, τα δείγματα αραιώνονται με τους κατάλληλους συντελεστές αραιώσης, που εξαρτώνται από τον χρόνο ζύμωσης. Αυτοί παρουσιάζονται παρακάτω.

Πίνακας 2.6 Ενδεικτικοί συντελεστές αραιώσης βάσει του χρόνου δειγματοληψίας από καλλιέργεια *C. cohnii* με ανάπτυξη σε σάκχαρα λιγνοκυτταρινούχου βιομάζας.

Χρόνος επώασης (h)	Συντελεστής αραιώσης
0	100
24	50
48	50
72	50
96	20
120	20

#### 2.2.3.2.4 Συλλογή Βιομάζας

Μετά το πέρας της ζύμωσης (120 ώρες) το υγρό της καλλιέργειας συλλέγεται σε προζυγισμένα falcon των 50 mL και φυγοκεντρείται στα 10.000 rpm για 7-8 λεπτά. Το υπερκείμενο υγρό απορρίπτεται και τα κύτταρα ξεπλένονται με απιονισμένο (DI) νερό, που περιέχει ίση συγκέντρωση θαλάσσιων αλάτων για να αποφευχθεί οποιαδήποτε καταστροφή μεμβράνης των κυττάρων λόγω οσμωτικών φαινομένων. Ακολουθεί φυγοκέντρηση των κυττάρων και αποθήκευσή τους στους 4 °C. Αφού ψυχθούν, οδηγούνται σε συσκευή λυοφιλίωσης προκειμένου να ξηρανθούν υπό κατάψυξη. Στη συνέχεια, τα ξηρά δείγματα ζυγίζονται και προσδιορίζεται η βιομάζα των κυττάρων βαρομετρικά. Η κυτταρική πυκνότητα υπολογίζεται με αναγωγή της βιομάζας στον τελικό όγκο της καλλιέργειας μετά την πρώτη φυγοκέντρηση.

#### 2.2.3.2.5 Απομόνωση λιπαρών

Για την εκχύλιση των λιπαρών από την ξηρή βιομάζα, αναπτύχθηκε μια τροποποιημένη μέθοδος Folch. Ξηραμένα κύτταρα (25-50 mg) από κάθε δείγμα αναμίχθηκαν με μίγμα χλωροφορμίου: MeOH 2: 1 και αφέθηκαν όλη τη νύχτα σε περιστρεφόμενο επωαστήρα σε θερμοκρασία 25-30 °C υπό ανάδευση. Για κάθε βιομάζα κυττάρων 25 mg, προστέθηκαν 10 mL του μίγματος χλωροφορμίου: MeOH 2: 1 και παρέμειναν όλη τη νύχτα. Όταν τα λιπαρά εκχυλίστηκαν στην υγρή φάση, προστέθηκε υπερκάθαρο νερό σε όγκο ίσο με το 20% του οργανικού μίγματος. Ακολούθησε φυγοκέντρωσή τους για 7-8 λεπτά. Στη συνέχεια, η πάνω υδατική φάση απορρίφθηκε και η κάτω φάση πλύθηκε δύο φορές με 3 mL ενός μείγματος MeOH: H<sub>2</sub>O 1: 1. Το τελικό εκχύλισμα συλλέχθηκε σε προζυγισμένους γυάλινους δοκιμαστικούς σωλήνες, οι οποίοι οδηγήθηκαν προς ξήρανση σε φούρνο κενού στους 40°C για 14-16 ώρες. Μετά την εξάτμιση του διαλύτη, οι ξηροί σωλήνες ζυγίστηκαν και μετρήθηκαν τα εναπομείναντα στερεά.

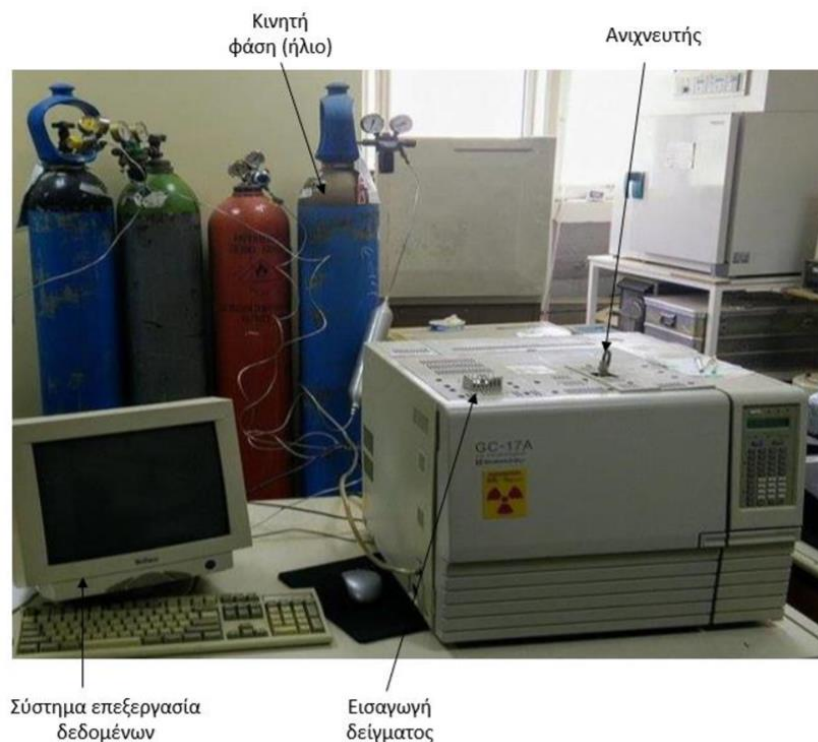
#### 2.2.3.2.6 Ποιοτική και ποσοτική ανάλυση των λιπαρών οξέων με αέρια χρωματογραφία (GC)

Η ποιοτική και ποσοτική ανάλυση των λιπαρών οξέων, και συνεπώς, η εύρεση του περιεχόμενου DHA σε αυτά, γίνεται με αέρια χρωματογραφία (GC).

**Αρχή της μεθόδου:** Ο διαχωρισμός στην αέρια χρωματογραφία συμβαίνει στην αέρια φάση, συνεπώς τα στερεά και υγρά δείγματα πρέπει πρώτα να αεριοποιηθούν. Οι ενώσεις που αναλύονται με GC πρέπει να είναι θερμικά σταθερές και με ικανοποιητική πτητικότητα. Συνήθως χρησιμοποιούνται υγρές στατικές φάσεις ενώ η κινητή φάση είναι ένα αδρανές αέριο (ήλιο, άζωτο, υδρογόνο). Σε αντίθεση με την υγρή χρωματογραφία, η κινητή φάση δεν αλληλεπιδρά με τα μόρια του αναλυτή. Ο μόνος ρόλος της κινητής φάσης είναι η διακίνηση του αναλύτη κατά μήκος της στήλης. Τα βασικά τμήματα ενός GC είναι:

- ✓ σύστημα παροχής κινητής φάσης (φέρων αέριο)
- ✓ σύστημα εισαγωγής δείγματος
- ✓ στήλη
- ✓ ανιχνευτής
- ✓ σύστημα επεξεργασίας δειγμάτων

- **Προετοιμασία δειγμάτων προς ανάλυση GC:** Καθώς τα λιπαρά οξέα αποτελούν υγρές ενώσεις θα πρέπει να μετατραπούν σε πτητικές ενώσεις προκειμένου να αναλυθούν σε σύστημα GC. Αυτό προϋποθέτει, την μετατροπή τους σε μεθυλεστέρες λιπαρών οξέων (FAME) που αποτελούν πτητικές ουσίες (αντίδραση όξινης μετεστεροποίησης). Για την παρασκευή μεθυλεστέρων λιπαρών οξέων (FAME), τα ξηραμένα λιπαρά αραιώθηκαν σε 1 mL χλωροφορμίου (βαθμού HPLC) και αναμίχθηκαν με 2,5 mL MeOH: HCl 92: 8. Οι σωλήνες επωάστηκαν στους 60 ° C για 15 λεπτά σε θερμοστατούμενο υδατόλουτρο και εν συνεχεία, προστέθηκαν 2,5 mL CaCl<sub>2</sub> 5% (w /v). Οι μεθυλεστέρες εκχυλίστηκαν από το μίγμα με 1 mL εξανίου (βαθμός HPLC). Το στάδιο εκχύλισης επαναλήφθηκε 4 φορές.
- **Μέθοδος:** Η ταυτοποίηση των FAME διεξήχθη χρησιμοποιώντας σύστημα GC-MS με στήλη Agilent J & W HP-5 Intuno GC. Η θερμοκρασία έγχυσης ρυθμίστηκε στους 270 ° C. Η κινητή φάση ήταν αέριο ήλιο με ρυθμό ροής 1 mL/min. Η θερμοκρασία στήλης αυξήθηκε από τους 125 ° C στους 240 ° C με ρυθμό 5 ° C / min, όπου παρέμεινε σταθερός για 9 λεπτά πριν από το τέλος της ανάλυσης. Δείγματα εγχύθηκαν στη στήλη με αναλογία διαχωρισμού 50: 1. Η ποσοτικοποίηση FAME και η ανάλυση της σύνθεσης πραγματοποιήθηκαν αναλόγως, χρησιμοποιώντας το ίδιο πρωτόκολλο ανάλυσης σε σύστημα GC-FID με στήλη Equity 5 Τριχοειδούς GC. Το συστατικό Supelco 37 FAME Mix με ποικίλες συγκεντρώσεις σε διχλωρομεθάνιο χρησιμοποιήθηκε ως πρότυπο.



Εικόνα 2.4. Σύστημα Αέριας Χρωματογραφίας (GC) που χρησιμοποιήθηκε για τον ποιοτικό και ποσοτικό προσδιορισμό των FAME

## 3 ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

---

### 3.1 ΥΔΡΟΛΥΣΕΙΣ ΒΙΟΜΑΖΩΝ

Οι υδρολύσεις των προκατεργασμένων λιγνοκυτταρινούχων υλικών πραγματοποιήθηκαν ενζυμικά, με τον τρόπο που περιεγράφηκε στην παράγραφο 2.2.1 του κεφαλαίου Υλικά και Μέθοδοι. Για την αξιολόγηση της υδρόλυσης μετρήθηκαν τα επίπεδα γλυκόζης και ολικών αναγωγικών σακχάρων σε κάθε δείγμα με τις μεθόδους GOD/PAP και DNS, με τον τρόπο που περιεγράφηκαν στις Παραγράφους 2.2.1.1.2 και 2.2.1.1.1, αντίστοιχα. Από τα εξαγόμενα αποτελέσματα προέκυψαν συμπεράσματα για την επίδραση των διαφόρων παραμέτρων κατά την προκατεργασία (επιλογή διαλύτη, χρόνος, πίεση, θερμοκρασία) στο τελικό αποτέλεσμα της υδρόλυσης. Με βάση την ικανότητα απελευθέρωσης σακχάρων και την μετατροπή της κυτταρίνης (σχέση 2.2.1.2) αξιολογούνται οι διάφοροι μέθοδοι προκατεργασίας για κάθε τύπο βιομάζας, και τέλος γίνεται επιλογή των υποστρωμάτων που θα χρησιμοποιηθούν ως δυνητικές πηγές άνθρακα για τις διεργασίες SSF και SHF.

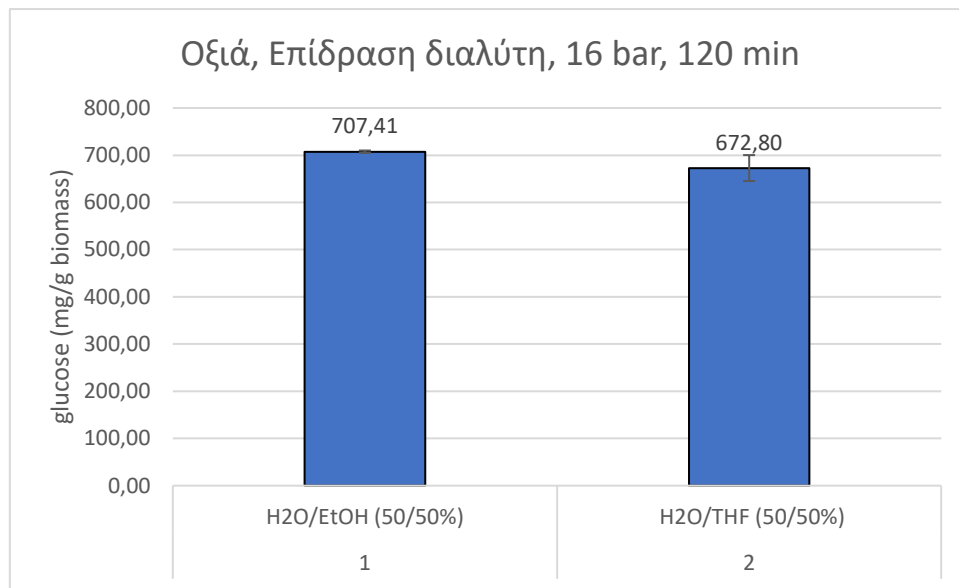
#### 3.1.1 Αξιολόγηση των διαφορετικών παραμέτρων προκατεργασίας

Στο σημείο αυτό, παρουσιάζονται τα αποτελέσματα που προέκυψαν από την ενζυμική υδρόλυση των προκατεργασμένων λιγνοκυτταρινούχων βιομαζών, οξιάς και πεύκου σε 9% DM, 9 mg/g ενζυμικό φορτίο, μετά από 72 ώρες.

##### 3.1.1.1 Επίδραση διαλύτη

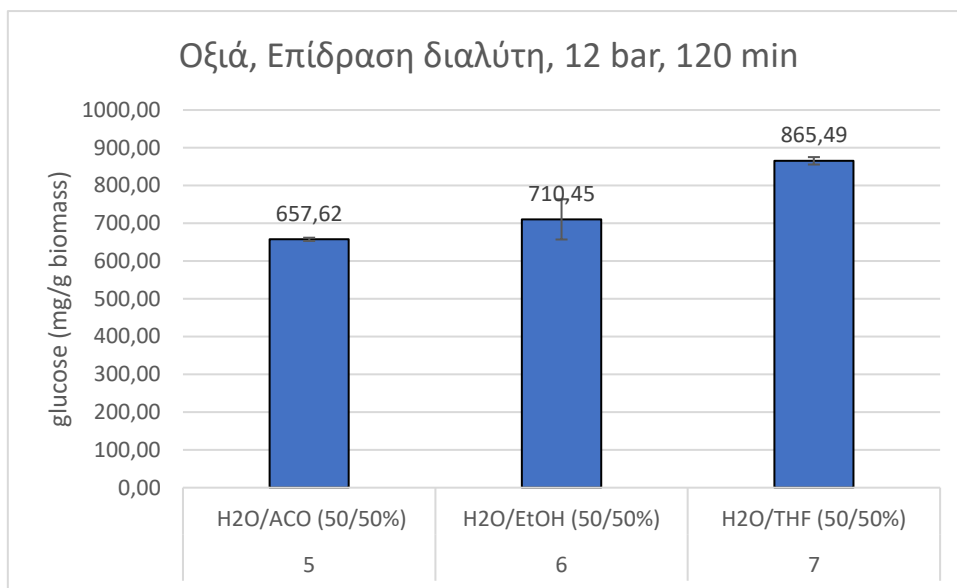
Για την σύγκριση της επίδρασης των διαφόρων διαλυτών σε ξύλο οξιάς και πεύκου κατά την υδρόλυση μελετώνται δείγματα που έχουν προκατεργαστεί υπό την ίδια πίεση και τον ίδιο χρόνο αντίδρασης, έτσι ώστε η σύγκριση να ευδοκιμεί. Το τελικό αποτέλεσμα εκφράζεται σε mg γλυκόζης που απελευθερώνονται από 1 g λιγνοκυτταρινούχου βιομάζας, που αποτελεί το «δυναμικό» της ενζυμικής υδρόλυσης. Η αναλογία των διαλυτών που χρησιμοποιείται σε κάθε περίπτωση προκατεργασίας είναι 50:50.

##### 3.1.1.1.1 Οξιά



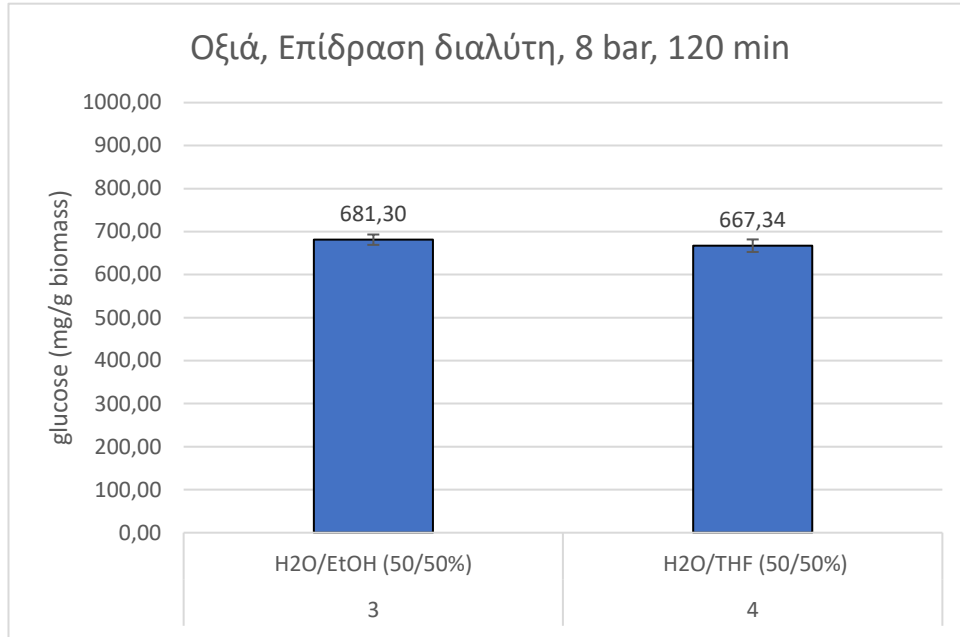
Εικόνα 3.1. Επίδραση του διαλύτη ως προς την ικανότητα απελευθέρωσης γλυκόζης (mg απελευθερωμένης γλυκόζης ανά g προκατεργασμένης βιομάζας) από προκατεργασμένα δείγματα οξιάς, υπό συνθήκες 16 bar, 120 min και 175°C, μετά από 72 ώρες ενζυμικής υδρόλυσης.

Το παραπάνω διάγραμμα απεικονίζει τον τρόπο με τον οποίο επιδρά στην υδρόλυση η EtOH και το THF ως διαλύτες προκατεργασίας λιγνοκυτταρινούχου βιομάζας οξιάς. Από την Εικόνα 3.1 γίνεται αντιληπτό ότι το αποτέλεσμα ως προς την απόδοση της σακχαροποίησης δεν είναι το ίδιο με τη χρήση των δύο διαφορετικών οργανικών διαλυτών για τις ίδιες συνθήκες προκατεργασίας της πούλπας. Στην εν λόγω περίπτωση, για πίεση 16 bar και χρόνο προκατεργασίας 120 min, η χρήση της EtOH φαίνεται να οδηγεί σε ελαφρώς υψηλότερα επίπεδα απελευθερωμένης γλυκόζης (δείγμα 1), από αυτήν του THF (δείγμα 2). Για το δείγμα 1, που έχει προκατεργαστεί με EtOH, η σύσταση πριν την υδρόλυση είναι 82,58% κυτταρίνη, 14,46% ημικυτταρίνη και 2,13% λιγνίνη. Για το δείγμα 2, που έχει προκατεργαστεί με THF και παρατηρείται ελαφρώς χαμηλότερη απελευθέρωση γλυκόζης, η σύσταση είναι 85,16% κυτταρίνη, 10,62% ημικυτταρίνη και 2,64% λιγνίνη. Μπορεί να παρατηρηθεί ότι στο δείγμα 2 που εντοπίζονται υψηλότερα επίπεδα λιγνίνης μετά την προκατεργασία, παρατηρείται και χαμηλότερη παραγωγή γλυκόζης. Ωστόσο, λαμβάνοντας υπόψιν τα πειραματικά σφάλματα, δεν υπάρχει στατιστικά σημαντική διαφορά ανάμεσα στα αποτελέσματα που προκαλούν οι δύο οργανικοί διαλύτες ως προς την υδρόλυση.



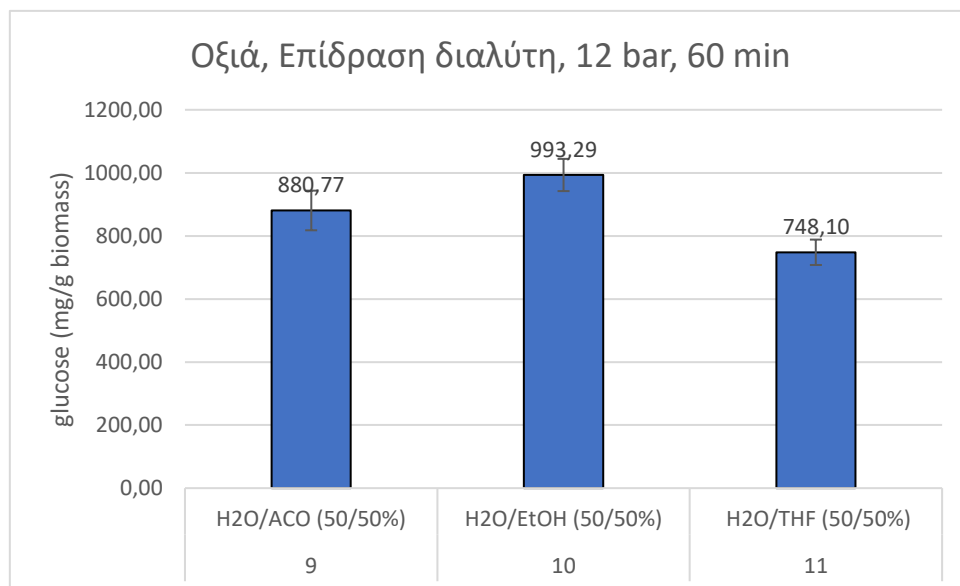
*Εικόνα 3.2. Επίδραση του διαλύτη ως προς την ικανότητα απελευθέρωσης γλυκόζης (mg απελευθερωμένης γλυκόζης ανά g προκατεργασμένης βιομάζας) από προκατεργασμένα δείγματα οξιάς, υπό συνθήκες 12 bar, 120 min και 175°C, μετά από 72 ώρες ενζυμικής υδρόλυσης.*

Στο παραπάνω διάγραμμα, απεικονίζεται η επίδραση που έχει η χρήση τριών διαφορετικών οργανικών διαλυτών, ACO, EtOH και THF κατά την προκατεργασία ξύλου οξιάς υπό συνθήκες 12 bar, 120 min και 175°C, στο τελικό αποτέλεσμα της υδρόλυσης. Εύκολα μπορεί να παρατηρηθεί η υπεροχή του THF ως διαλύτη προκατεργασίας στις δεδομένες συνθήκες, όπου κατά την υδρόλυση του αντίστοιχου δείγματος (7) απελευθερώνονται πάνω από 800 mg γλυκόζης/ g βιομάζας. Η σύσταση του δείγματος 7 πριν την υδρόλυση είναι 80,11% κυτταρίνη, 11,39% ημικυτταρίνη και 5,77% λιγνίνη. Ακολουθεί το δείγμα (6), με διαλύτη προκατεργασίας EtOH και σύσταση 80,14% κυτταρίνη, 14,36% ημικυτταρίνη και 2,86% λιγνίνη. Η ποσότητα γλυκόζης που απελευθερώνεται από το δείγμα 6 είναι ελαφρώς υψηλότερη από τα 700 mg ανά g βιομάζας, και είναι αρκετά κοντινή σε αυτή που παράγεται κατά την υδρόλυση του δείγματος 5, όπου έχει χρησιμοποιηθεί διαλύτης προκατεργασίας ACO. Η σύσταση για το δείγμα 5 είναι 79,5% κυτταρίνη, 13,2% ημικυτταρίνη και 1,46% λιγνίνη. Υπό αυτές τις συνθήκες φαίνεται πως η ύπαρξη μεγάλου κλάσματος λιγνίνης στη λιγνοκυτταρινούχα βιομάζα δεν επηρεάζει σημαντικά την απελευθέρωση γλυκόζης κατά την υδρόλυση, καθώς, παρόλο που το δείγμα 7 διαθέτει τη μεγαλύτερη περιεκτικότητα σε λιγνίνη και παρεμφερή ποσοστά κυτταρίνης-ημικυτταρίνης σε σχέση με τα άλλα δύο δείγματα, σημειώνει τους μεγαλύτερους τίτλους γλυκόζης.



Εικόνα 3.3. Επίδραση του διαλύτη ως προς την ικανότητα απελευθέρωσης γλυκόζης (mg απελευθερωμένης γλυκόζης ανά g προκατεργασμένης βιομάζας) από προκατεργασμένα δείγματα οξιάς, υπό συνθήκες 8 bar, 120 min και 175°C, μετά από 72 ώρες ενζυμικής υδρόλυσης.

Στο παραπάνω διάγραμμα, απεικονίζεται η επίδραση που έχει η χρήση δύο διαφορετικών οργανικών διαλυτών EtOH και THF κατά την προκατεργασία ξύλου οξιάς υπό συνθήκες 8 bar, 120 min και 175°C, στο τελικό αποτέλεσμα της υδρόλυσης. Παρατηρείται ότι υπό τις συγκεκριμένες συνθήκες και οι δύο διαλύτες έχουν παρόμοιο αποτέλεσμα ως προς την τελική ποσότητα γλυκόζης που απελευθερώνεται ανά g βιομάζας κατά την ενζυμική υδρόλυση. Τα ποσοστά περιεχόμενης κυτταρίνης που επιτυγχάνονται μετά την προκατεργασία για τα δύο υποστρώματα είναι κοντινά: 75,63% για το δείγμα 3 που αντιστοιχεί στην προκατεργασία με EtOH και 76,36% για το δείγμα 4 που αντιστοιχεί στην προκατεργασία με THF.

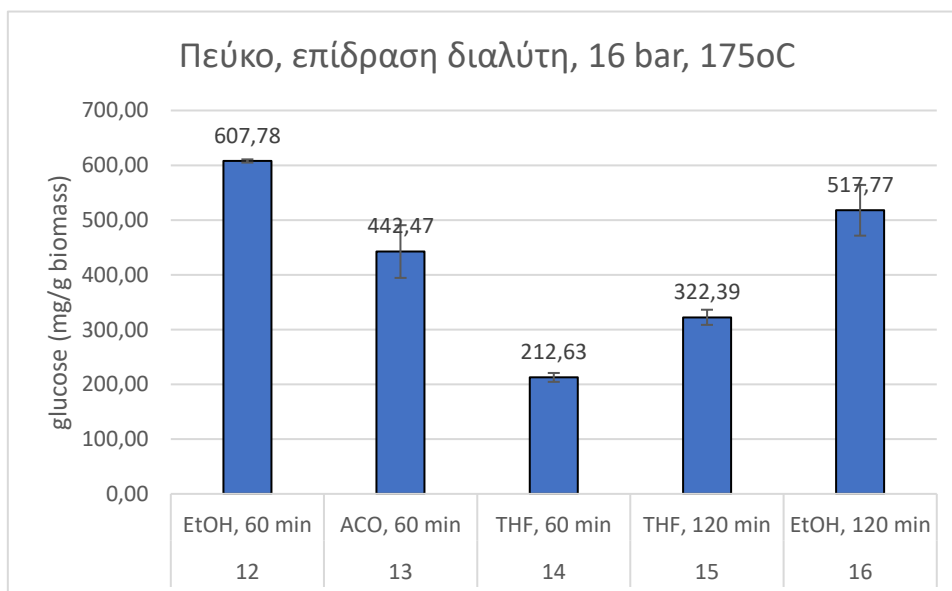




Εικόνα 3.4. Επίδραση του διαλύτη ως προς την ικανότητα απελευθέρωσης γλυκόζης (mg απελευθερωμένης γλυκόζης ανά g προκατεργασμένης βιομάζας) από προκατεργασμένα δείγματα οξιάς, υπό συνθήκες 12 bar, 60 min και 175°C, μετά από 72 ώρες ενζυμικής υδρόλυσης.

Στο παραπάνω διάγραμμα, απεικονίζεται η επίδραση που έχει η χρήση τριών διαφορετικών οργανικών διαλυτών προκατεργασίας, ACO, EtOH και THF, σε συνθήκες προκατεργασίας οξιάς 12 bar, 60 min και 175°C, στο τελικό αποτέλεσμα της υδρόλυσης. Ως ο πιο ικανός διαλύτης υπό τις εφαρμόζουσες συνθήκες κρίνεται η EtOH (δείγμα 10), ακολουθούμενη από την ACO (δείγμα 9) με μικρή διαφορά στην απόδοση της γλυκόζης. Ως λιγότερο συμβατός διαλύτης θεωρείται ο THF (δείγμα 11), με επίπεδα απελευθερωμένης γλυκόζης σαφώς μικρότερα από των δύο προηγούμενων. Αξίζει να σημειωθεί, επίσης, ότι με τη χρήση EtOH υπό τις εν λόγω συνθήκες προκατεργασίας, επιτυγχάνονται οι υψηλότερες αποδόσεις σε γλυκόζη από όλα τα εξεταζόμενα δείγματα συνολικά, που προσεγγίζουν το 1 g/g βιομάζας. Η υδρόλυση υπό αυτές τις συνθήκες φαίνεται να δείχνει προτίμηση σε υποστρώματα όχι τόσο πλούσια σε κυτταρίνη αλλά σε ημικυτταρίνη, όπως είναι το δείγμα 10 και 9, για τα οποία μέσω της προκατεργασίας επιτυγχάνονται ποσοστά ημικυτταρίνης πάνω από 15% (17,98% για το 10 και 16,31% για το 9). Ωστόσο, για το δείγμα 11, παρόλο που η προκατεργασία με THF οδηγεί σε παρόμοιο κλάσμα κυτταρίνης (73,5%) και ημικυτταρίνης (14,64%) με τα άλλα δύο, μεγάλο μέρος της λιγνίνης δεν απομακρύνεται, με αποτέλεσμα να σημειώνει τη μεγαλύτερη περιεκτικότητα σε λιγνίνη (7,95% για το 11, σε σχέση με τα 3,86% για το 9 και 6,36% για το 10). Κάτι τέτοιο πιθανότατα δικαιολογεί και την αδυναμία του στην παραγωγή γλυκόζης σε σχέση με τα άλλα δύο.

### 3.1.1.1.2 Πεύκο



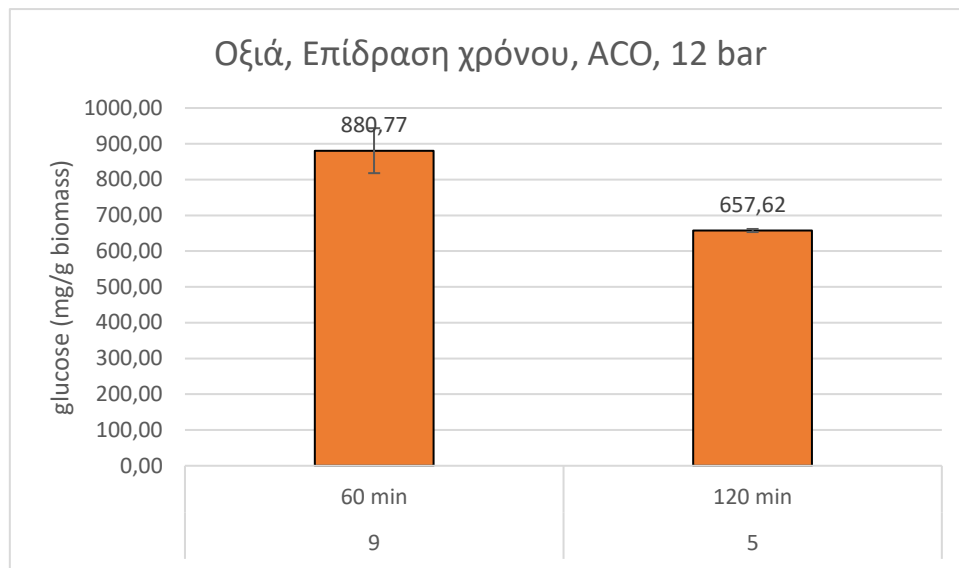
Εικόνα 3.5. Επίδραση του διαλύτη στην ενζυμική υδρόλυση διαφόρων δειγμάτων πεύκου μετά από 72 ώρες, με συνθήκες προκατεργασίας 16 bar, 60 και 120 min και 175°C.

Στο παραπάνω διάγραμμα, απεικονίζεται η επίδραση που έχει η χρήση τριών διαφορετικών οργανικών διαλυτών προκατεργασίας, ACO, EtOH και THF στο τελικό αποτέλεσμα της υδρόλυσης, όταν οι συνθήκες προκατεργασίας του πεύκου είναι 16 bar, 60 και 120 min και 175°C. Από τα λαμβανόμενα αποτελέσματα, κρίνεται ότι η EtOH φαίνεται να ευνοεί την απελευθέρωση γλυκόζης στο πεύκο περισσότερο από τους άλλους διαλύτες, με αποδόσεις που είναι υψηλές και για τους δύο χρόνους μελέτης (60 και 120 min). Μεγαλύτερη απελευθέρωση σημειώνεται στον μικρότερο χρόνο προκατεργασίας (δείγμα 12), όπου για το εν λόγω δείγμα τα ποσοστά κυτταρίνης και ημικυτταρίνης είναι 77,6% και 13,23% αντίστοιχα. Ακολουθεί η προκατεργασία στα 120 min (δείγμα 16) όπου το υδρολύομενο υπόστρωμα περιλαμβάνει 79,57% κυτταρίνη και 9,74% ημικυτταρίνη. Αξιόλογο αποτέλεσμα στην απελευθέρωση σακχάρων έχει, επίσης, και η προκατεργασία με διαλύτη ACO, όπου σημειώνονται αποδόσεις ελαφρώς χαμηλότερες από αυτές του EtOH στα 120 min (δείγμα 13, 82,75% κυτταρίνη και 10,13% ημικυτταρίνη). Το THF φαίνεται να αποτελεί τον λιγότερο αποτελεσματικό διαλύτη προκατεργασίας για το πεύκο αφού και για τους δύο χρόνους προκατεργασίας σημειώνονται οι χαμηλότερες αποδόσεις σε γλυκόζη. Αυτό οφείλεται στο ότι η προκατεργασία με THF αφήνει αδιάλυτο μεγάλο ποσοστό της λιγνίνης (βλέπε Πίνακα 3.3), με αποτέλεσμα να δρα παρεμποδιστικά στο στάδιο της ενζυμικής υδρόλυσης. Αξίζει να σημειωθεί ότι τα δύο δείγματα παρουσιάζουν την υψηλότερη περιεκτικότητα σε λιγνίνη σε σχέση με τα άλλα μελετώμενα, με επίπεδα που φτάνουν το 26,82% για το δείγμα 14 και 17,59% για το δείγμα 15. Το γεγονός αυτό δικαιολογεί και την μειωμένη αποδοτικότητα σε σάκχαρα.

### **3.1.1.2 Επίδραση χρόνου προκατεργασίας**

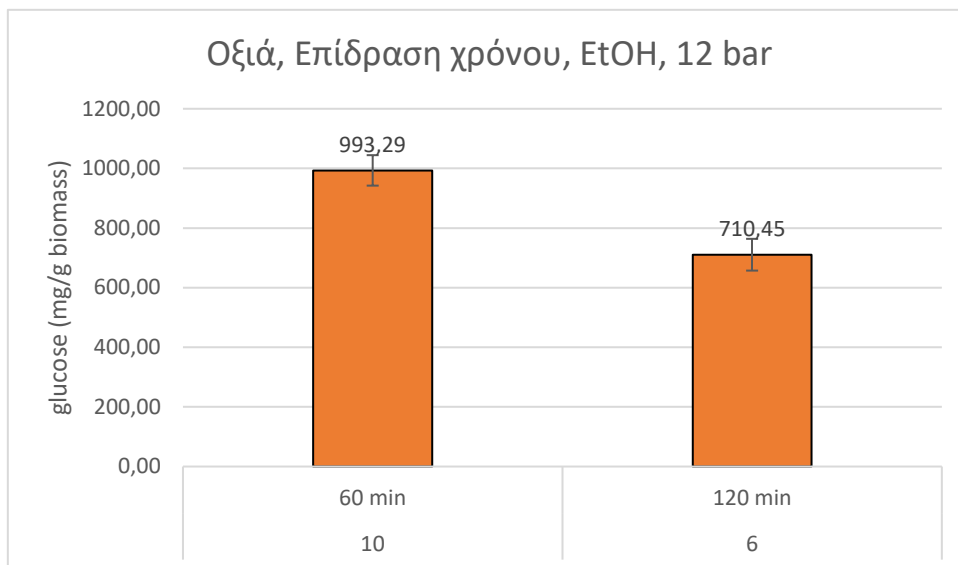
#### **3.1.1.2.1 Οξιά**

Για τη μελέτη της επίδρασης του χρόνου προκατεργασίας στην συνολική απόδοση της υδρόλυσης εξετάστηκαν δείγματα οξιάς που είχαν προκατεργαστεί με τον ίδιο διαλύτη (ACO, EtOH ή THF) και υπό τις ίδιες συνθήκες πίεσης. Στην εν λόγω μελέτη, τα δείγματα συγκρίθηκαν υπό πίεση 12 bar, καθώς δεν υπήρχε επαρκής αριθμός δειγμάτων για τη σύγκριση σε άλλες πιέσεις. Η θερμοκρασία είναι η ίδια, 175°C, σε κάθε εφαρμοζόμενη προκατεργασία.



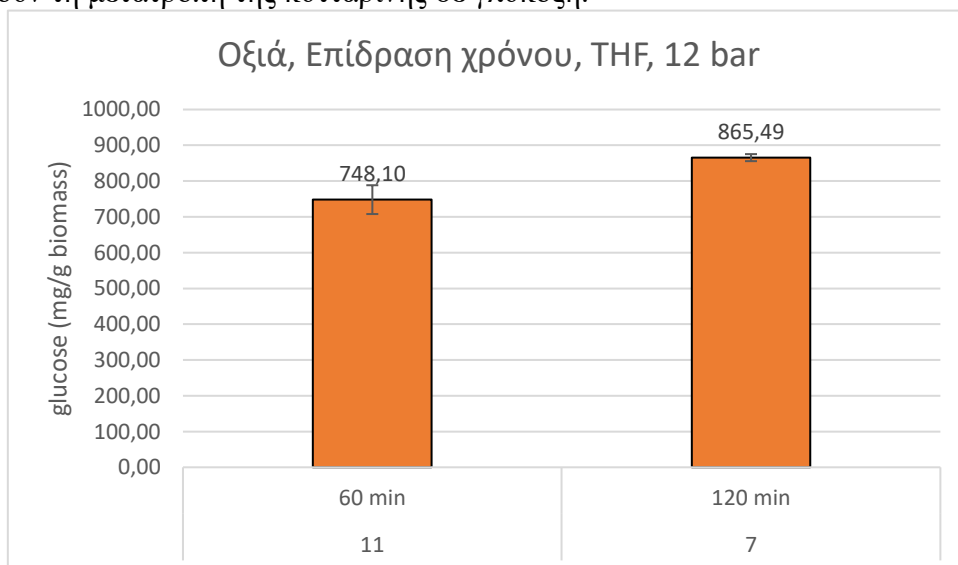
Εικόνα 3.6. Επίδραση του χρόνου προκατεργασίας στην απόδοση της υδρόλυσης (εκφρασμένη σε mg γλυκόζης/ g βιομάζας) λιγνοκυτταρινούχων δειγμάτων οξιάς, που έχουν προκατεργαστεί με διαλύτη ACO, σε πίεση 12 bar και θερμοκρασία 175°C. Το αποτέλεσμα αφορά τις 72 ώρες από την έναρξη της υδρόλυσης.

Στην εικόνα 3.6 εξετάζεται η ικανότητα απελευθέρωσης γλυκόζης από δείγματα οξιάς που έχουν υποστεί ήπια υδροθερμική προκατεργασία με οργανικό διαλύτη ACO, πίεση 12 bar και θερμοκρασία 175 °C, σε διαφορετικούς χρόνους. Για το σκοπό αυτό, απεικονίζονται οι αποδόσεις σε γλυκόζη από δείγματα που έχουν προκατεργαστεί για 60 λεπτά (δείγμα 9) και 120 λεπτά (δείγμα 5). Είναι φανερό ότι όταν το δείγμα έχει προκατεργαστεί υπό τις αναφερθείσες συνθήκες πίεσης, θερμοκρασίας και διαλύτη για μικρότερο χρονικό διάστημα (δείγμα 9) η απόδοση σε σάκχαρα είναι σαφώς υψηλότερη από αυτήν για μεγαλύτερο χρόνο προκατεργασίας (δείγμα 5). Συνεπώς, η προκατεργασία με υψηλούς χρόνους παραμονής συνιστά επίπονη διαδικασία για το εν λόγω λιγνοκυτταρινούχο υλικό σε υψηλή πίεση, όταν χρησιμοποιείται διαλύτης ACO. Η μειωμένη απόδοση γλυκόζης στους υψηλούς χρόνους μπορεί να οφείλεται σε αυξημένη αποικοδόμηση της κυτταρίνης και παραγωγή παραπροϊόντων ή παρεμποδιστών κατά την προκατεργασία, που αναστέλλουν τη δράση των υδρολυτικών ενζύμων ή που δεν μπορούν να μετατραπούν περαιτέρω σε ζυμώσιμα σάκχαρα από τα υπάρχοντα υδρολυτικά ένζυμα.



Εικόνα 3.7. Επίδραση του χρόνου προκατεργασίας στην απόδοση της υδρόλυσης (εκφρασμένη σε mg γλυκόζης/ g βιομάζας) λιγνοκυτταρινούχων δειγμάτων οξιάς, που έχουν προκατεργαστεί με διαλύτη EtOH, σε πίεση 12 bar και θερμοκρασία 175°C. Το αποτέλεσμα αφορά τις 72 ώρες από την έναρξη της υδρόλυσης

Στην εικόνα 3.7 εξετάζεται η ικανότητα απελευθέρωσης γλυκόζης από δείγματα οξιάς που έχουν υποστεί ήπια υδροθερμική προκατεργασία με οργανικό διαλύτη EtOH, πίεση 12 bar και θερμοκρασία 175°C, σε διαφορετικούς χρόνους. Για το σκοπό αυτό, απεικονίζονται οι αποδόσεις σε γλυκόζη από δείγματα που έχουν προκατεργαστεί για 60 λεπτά (δείγμα 10) και 120 λεπτά (δείγμα 6). Είναι φανερό ότι όταν το δείγμα έχει προκατεργαστεί για μικρότερο χρονικό διάστημα υπό τις αναφερθείσες συνθήκες πίεσης, θερμοκρασίας και διαλύτη (δείγμα 10), η απόδοση σε σάκχαρα είναι σαφώς υψηλότερη από αυτήν για μεγαλύτερο χρόνο προκατεργασίας (δείγμα 6). Συνεπώς, ούτε σε αυτήν την περίπτωση οι υψηλοί χρόνοι αντίδρασης κατά την προκατεργασία ευνοούν τη μετατροπή της κυτταρίνης σε γλυκόζη.

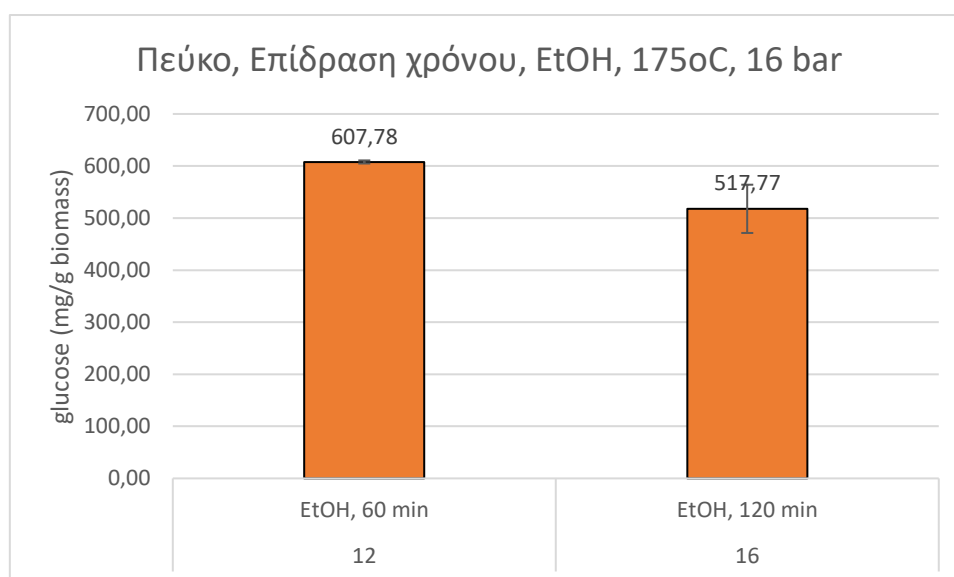


Εικόνα 3.8. Επίδραση του χρόνου προκατεργασίας στην απόδοση της υδρόλυσης (εκφρασμένη σε mg γλυκόζης/ g βιομάζας) λιγνοκυτταρινούχων δειγμάτων οξιάς, που έχουν προκατεργαστεί με διαλύτη THF, σε πίεση 12 bar και θερμοκρασία 175°C. Το αποτέλεσμα αφορά τις 72 ώρες από την έναρξη της υδρόλυσης

Στην εικόνα 3.8 εξετάζεται η ικανότητα απελευθέρωσης γλυκόζης από δείγματα οξιάς που έχουν υποστεί ήπια υδροθερμική προκατεργασία με οργανικό διαλύτη THF, πίεση 12 bar και θερμοκρασία 175 °C, σε διαφορετικούς χρόνους. Για το σκοπό αυτό, απεικονίζονται οι αποδόσεις σε γλυκόζη από δείγματα που έχουν προκατεργαστεί για 60 λεπτά (δείγμα 11) και 120 λεπτά (δείγμα 7). Σε αντίθεση με τις προηγούμενες περιπτώσεις ACO και EtOH, εδώ φαίνεται ότι οι μεγαλύτεροι χρόνοι προκατεργασίας οδηγούν σε υψηλότερη απελευθέρωση σακχάρων όταν χρησιμοποιείται ως οργανικός διαλύτης THF. Βέβαια, το προβάδισμα αυτό δεν είναι κατά πολύ υψηλότερο από αυτό των χαμηλότερων χρόνων αντίδρασης, εάν ληφθούν υπόψη τα πειραματικά σφάλματα.

### 3.1.1.2.2 Πεύκο

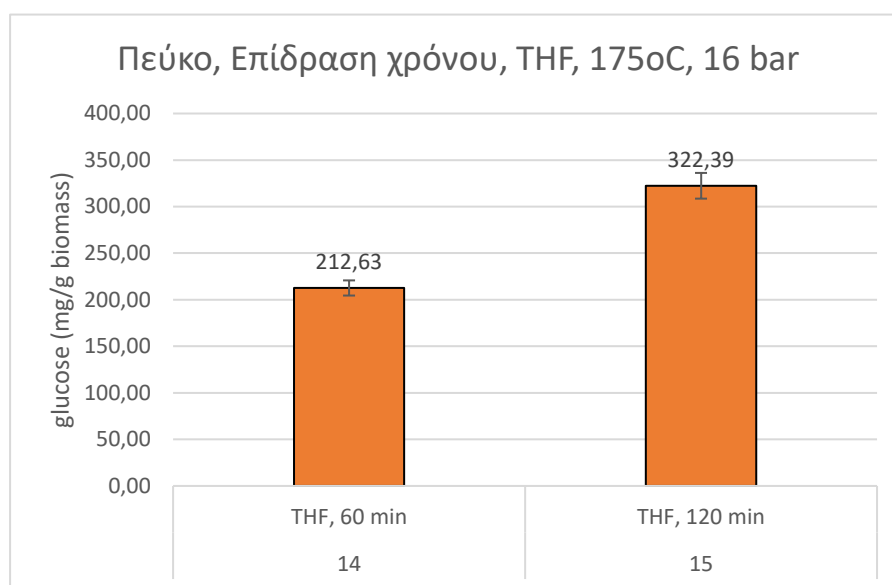
Για τη μελέτη της επίδρασης του χρόνου προκατεργασίας στην συνολική απόδοση της υδρόλυσης πεύκου εξετάστηκαν δείγματα που είχαν προκατεργαστεί με τον ίδιο διαλύτη, EtOH ή THF στην ίδια θερμοκρασία. Στην εν λόγω μελέτη, τα δείγματα συγκρίθηκαν ως προς τη θερμοκρασία των 175°C, καθώς δεν διατίθεται το απαιτούμενο πλήθος δειγμάτων για τη σύγκριση σε άλλες θερμοκρασίες (150 και 160°C). Η πίεση είναι η ίδια, 16 bar °C, σε κάθε εφαρμοζόμενη προκατεργασία. Η μελέτη αυτή δεν αφορά την προκατεργασία με διαλύτη ACO καθώς δεν υπάρχουν άλλα δείγματα που έχουν προκατεργαστεί με τον εν λόγω διαλύτη σε διαφορετικούς χρόνους.



Εικόνα 3.9. Επίδραση του χρόνου προκατεργασίας στην απόδοση της υδρόλυσης (εκφρασμένη σε mg γλυκόζης/ g βιομάζας) λιγνοκυτταρινούχων δειγμάτων πεύκου, που έχουν προκατεργαστεί με διαλύτη EtOH, σε πίεση 16 bar και θερμοκρασία 175°C. Το αποτέλεσμα αφορά τις 72 ώρες από την έναρξη της υδρόλυσης

Στην εικόνα 3.9 εξετάζεται η ικανότητα απελευθέρωσης γλυκόζης από δείγματα πεύκου που έχουν υποστεί ήπια υδροθερμική προκατεργασία με οργανικό διαλύτη EtOH, πίεση 16 bar και θερμοκρασία 175°C, σε διαφορετικούς χρόνους. Για το σκοπό αυτό, απεικονίζονται οι αποδόσεις σε γλυκόζη από δείγματα που έχουν προκατεργαστεί για 60 λεπτά (δείγμα 12) και 120 λεπτά (δείγμα 16). Παρατηρείται ότι

η προκατεργασία με χρήση EtOH σε μικρότερους χρόνους, οδηγεί σε απελευθέρωση μεγαλύτερης ποσότητας γλυκόζης ανά g πεύκου. Το δείγμα 12, για οποίο παρατηρείται το φαινόμενο αυτό, συνίσταται από 77,6% κυτταρίνη και 13,23% ημικυτταρίνη σε αντίθεση με το δείγμα 16 που τα ποσοστά κυτταρίνης είναι υψηλότερα (79,57%) και της ημικυτταρίνης χαμηλότερα (9,74%). Το ποσοστό λιγνίνης για τα δύο προκατεργασμένα υποστρώματα είναι παραπλήσιο, με 7,18% για το δείγμα 12 και 6,38% για το δείγμα 16.



Εικόνα 3.10. Επίδραση του χρόνου προκατεργασίας στην απόδοση της υδρόλυσης (εκφρασμένη σε mg γλυκόζης/ g βιομάζας) λιγνοκυτταρινούχων δειγμάτων πεύκου, που έχουν προκατεργαστεί με διαλύτη THF, σε πίεση 16 bar και θερμοκρασία 175°C. Το αποτέλεσμα αφορά τις 72 ώρες από την έναρξη της υδρόλυσης

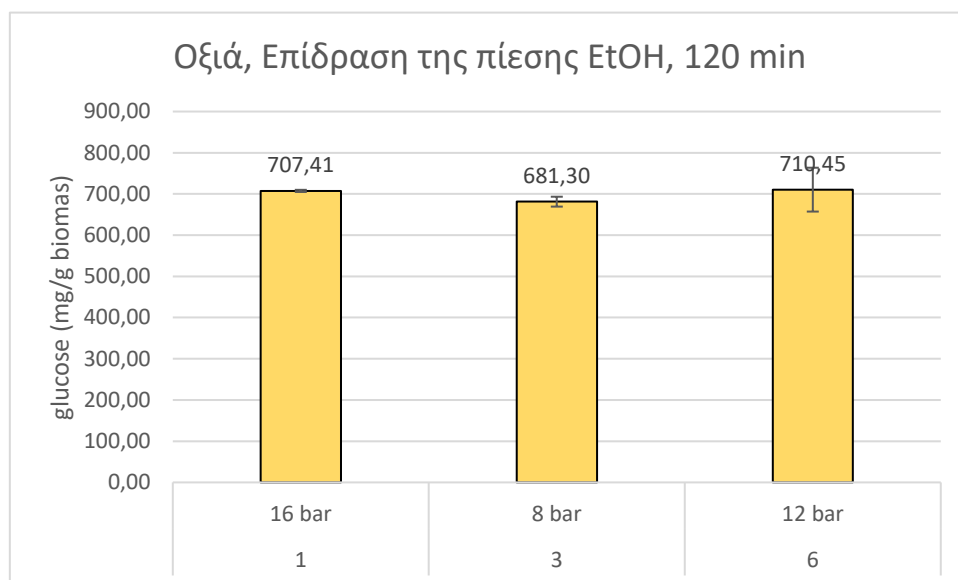
Στην εικόνα 3.10 εξετάζεται η ικανότητα απελευθέρωσης γλυκόζης από δείγματα πεύκου που έχουν υποστεί ήπια υδροθερμική προκατεργασία με οργανικό διαλύτη THF, πίεση 16 bar και θερμοκρασία 175°C, σε διαφορετικούς χρόνους. Για το σκοπό αυτό, απεικονίζονται οι αποδόσεις σε γλυκόζη από δείγματα που έχουν προκατεργαστεί για 60 λεπτά (δείγμα 14) και 120 λεπτά (δείγμα 15). Όμοια με την περίπτωση της υδρόλυσης οξιάς, παρατηρείται ότι η προκατεργασία με χρήση THF σε μεγαλύτερους χρόνους, οδηγεί σε απελευθέρωση μεγαλύτερης ποσότητας γλυκόζης ανά g πεύκου. Το δείγμα 15, για οποίο παρατηρείται το φαινόμενο αυτό, συνίσταται από 71,31% κυτταρίνη και 17,59% λιγνίνη ενώ το δείγμα 14, για το οποίο παρουσιάζεται μειωμένη παραγωγή γλυκόζης, συνίσταται από πολύ χαμηλότερη ποσότητα κυτταρίνης (60,8%) και αρκετά υψηλότερη λιγνίνης (26,82%). Κατά συνέπεια, οι μικρότεροι χρόνοι παραμονής υπό την παρουσία διαλύτη THF οδηγούν σε αναποτελεσματικότερη απομάκρυνση λιγνίνης από το υλικό, με αποτέλεσμα αυτό να λειτουργεί σαν φραγμός για τα υδρολυτικά ένζυμα και κατά συνέπεια, σε μικρότερη παραγωγή γλυκόζης. Η ημικυτταρίνη είναι παραπλήσια στα δύο δείγματα (6,69% στο 14 και 6,78% στο 15).

### 3.1.1.3 Επίδραση της πίεσης

Η μελέτη της επίδρασης της πίεσης στην υδρόλυση λιγνοκυτταρινούχου βιομάζας πραγματοποιείται μόνο για προκατεργασμένα υποστρώματα οξιάς, καθώς, όπως αναφέρθηκε, η πίεση προκατεργασίας είναι κοινή για κάθε υπόστρωμα πεύκου (16 bar) και κατά συνέπεια η σύγκριση δεν υφίσταται.

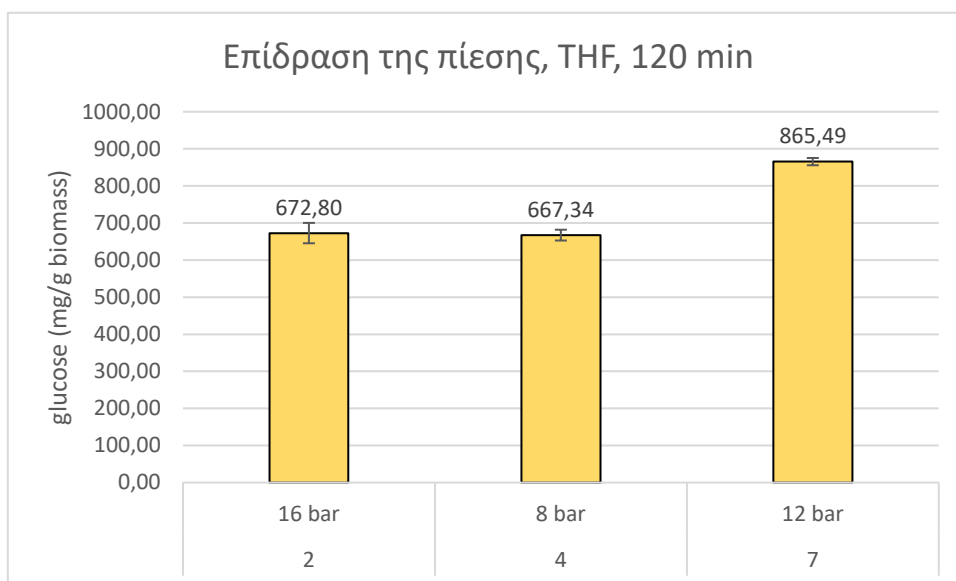
#### 3.1.1.3.1 Οξιά

Για τη μελέτη της επίδρασης της πίεσης στην συνολική απόδοση της υδρόλυσης εξετάστηκαν δείγματα οξιάς που είχαν προκατεργαστεί με τον ίδιο διαλύτη (ACO, EtOH ή THF) σε χρόνο 120 min. Η θερμοκρασία της προκατεργασίας είναι κοινή για όλα τα δείγματα, στους 175°C.



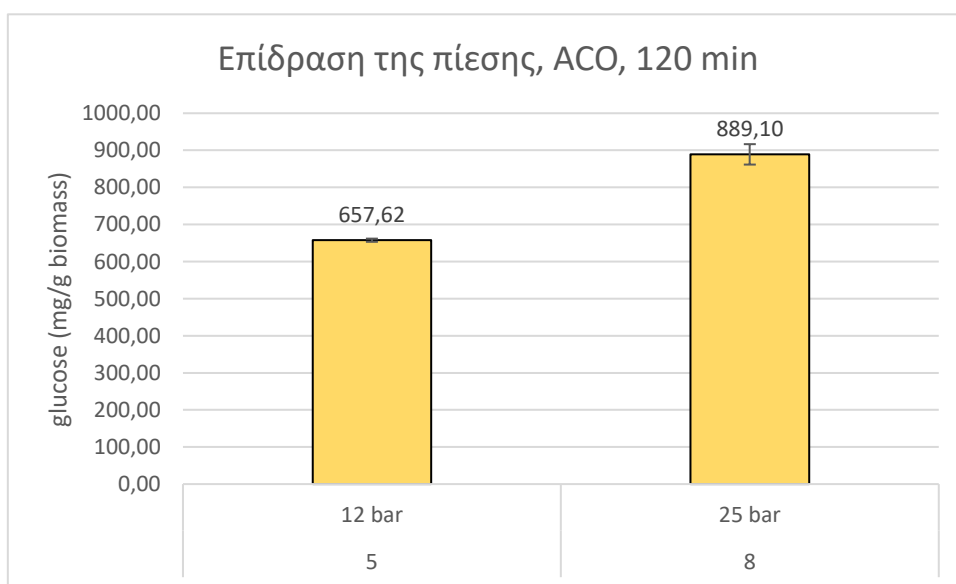
Εικόνα 3.11. Επίδραση της πίεσης στην απόδοση της υδρόλυσης (εκφρασμένη σε mg γλυκόζης/ g βιομάζας) λιγνοκυτταρινούχων δειγμάτων οξιάς, που έχουν προκατεργαστεί με διαλύτη EtOH, σε χρόνο 120 min και θερμοκρασία 175°C. Το αποτέλεσμα αφορά τις 72 ώρες από την έναρξη της υδρόλυσης.

Στην εικόνα 3.11 εξετάζεται η ικανότητα απελευθέρωσης γλυκόζης από δείγματα οξιάς που έχουν υποστεί ήπια υδροθερμική προκατεργασία με οργανικό διαλύτη EtOH, σε χρόνο 120 λεπτά, θερμοκρασία 175 °C και διαφορετικές πιέσεις (8,12,16 bar που αντιστοιχούν στα δείγματα 3,1,6). Μπορεί να παρατηρηθεί ότι η πίεση δεν διαδραματίζει ιδιαίτερο ρόλο στην απόδοση της υδρόλυσης, αφού επιφέρει ίδια αποτελέσματα για κάθε εξεταζόμενη βιομάζα.



Εικόνα 3.12. Επίδραση του χρόνου προκατεργασίας στην απόδοση της υδρόλυσης (εκφρασμένη σε mg γλυκόζης/ g βιομάζας) λιγνοκυτταρινούχων δειγμάτων οξιάς, που έχουν προκατεργαστεί με διαλύτη THF, σε χρόνο 120 min και θερμοκρασία 175°C. Το αποτέλεσμα αφορά τις 72 ώρες από την έναρξη της υδρόλυσης

Στην εικόνα 3.12 εξετάζεται η ικανότητα απελευθέρωσης γλυκόζης από δείγματα οξιάς που έχουν υποστεί ήπια υδροθερμική προκατεργασία με οργανικό διαλύτη THF, σε χρόνο 120 λεπτά, θερμοκρασία 175°C και διαφορετικές πιέσεις (8, 12, 16 bar που αντιστοιχούν στα δείγματα 4, 7, 2). Είναι φανερό ότι υπό τον δεδομένο διαλύτη και χρόνο προκατεργασίας η πίεση των 12 bar επιφέρει τα καλύτερα αποτελέσματα κατά την υδρόλυση (δείγμα 7). Για τις πιέσεις των 8 και 16 bar (δείγμα 4 και 2 αντίστοιχα) το αποτέλεσμα είναι παραπλήσιο και σαφώς κατώτερο των 12 bar.



Εικόνα 3.13. Επίδραση του χρόνου προκατεργασίας στην απόδοση της υδρόλυσης (εκφρασμένη σε mg γλυκόζης/ g βιομάζας) λιγνοκυτταρινούχων δειγμάτων οξιάς, που έχουν προκατεργαστεί με διαλύτη ACO, σε χρόνο 120 min και θερμοκρασία 175°C. Το αποτέλεσμα αφορά τις 72 ώρες από την έναρξη της υδρόλυσης.



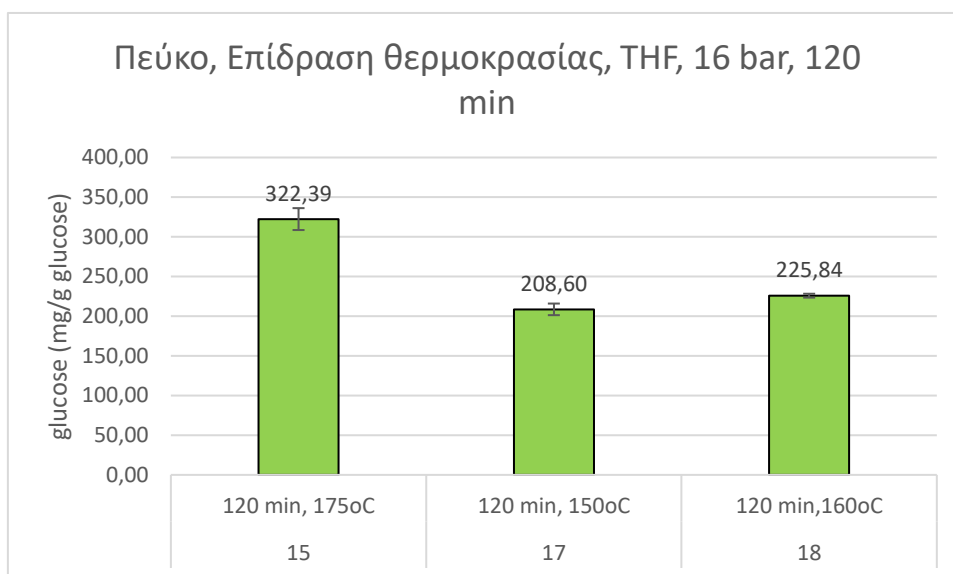
Στην εικόνα 3.13 εξετάζεται η ικανότητα απελευθέρωσης γλυκόζης από δείγματα οξιάς που έχουν υποστεί ήπια υδροθερμική προκατεργασία με οργανικό διαλύτη ACO, σε χρόνο 120 λεπτά, θερμοκρασία 175°C και διαφορετικές πιέσεις, 12 bar και 25 bar που αντιστοιχούν στα δείγματα 5 και 8. Είναι φανερό ότι υπό τον δεδομένο διαλύτη και χρόνο προκατεργασίας η εφαρμογή μεγαλύτερης πίεσης επιφέρει μακράν καλύτερα αποτελέσματα κατά την υδρόλυση (δείγμα 8). Συγκεκριμένα, με εφαρμογή υπερδιπλάσια πίεσης η παραγωγή γλυκόζης ανά g βιομάζας αυξάνεται κατά 35%. Αυτό ίσως οφείλεται στην ελαφρώς μεγαλύτερη περιεκτικότητα κυτταρίνης που επιφέρει η προκατεργασία με υψηλή πίεση (80,28% για το δείγμα 8, 79,5% για το δείγμα 5). Συνεπώς, για μεγάλους χρόνους και διαλύτη ACO, η πίεση επιδρά σημαντικά στην αποτελεσματικότητα της υδρόλυσης.

### **3.1.1.4 Επίδραση της θερμοκρασίας**

Η μελέτη της επίδρασης της θερμοκρασίας στην υδρόλυση λιγνοκυτταρινούχου βιομάζας πραγματοποιείται μόνο για προκατεργασμένα υποστρώματα πεύκου, καθώς, όπως αναφέρθηκε, η θερμοκρασία προκατεργασίας είναι κοινή για κάθε υπόστρωμα οξιάς (175°C) και κατά συνέπεια η σύγκριση δεν υφίσταται.

#### **3.1.1.4.1 Πεύκο**

Για τη μελέτη της επίδρασης της πίεσης στην συνολική απόδοση της υδρόλυσης εξετάστηκαν δείγματα πεύκου που είχαν προκατεργαστεί με τον διαλύτη THF σε χρόνο 120 min. Η θερμοκρασία της προκατεργασίας είναι κοινή για όλα τα δείγματα, στους 175°C. Μελέτη ως προς τους διαλύτες EtOH και ACO, καθώς και για τον χρόνο των 60 λεπτών δεν πραγματοποιήθηκε καθώς δεν υπήρχε επαρκής αριθμός δειγμάτων για τη σύγκριση.

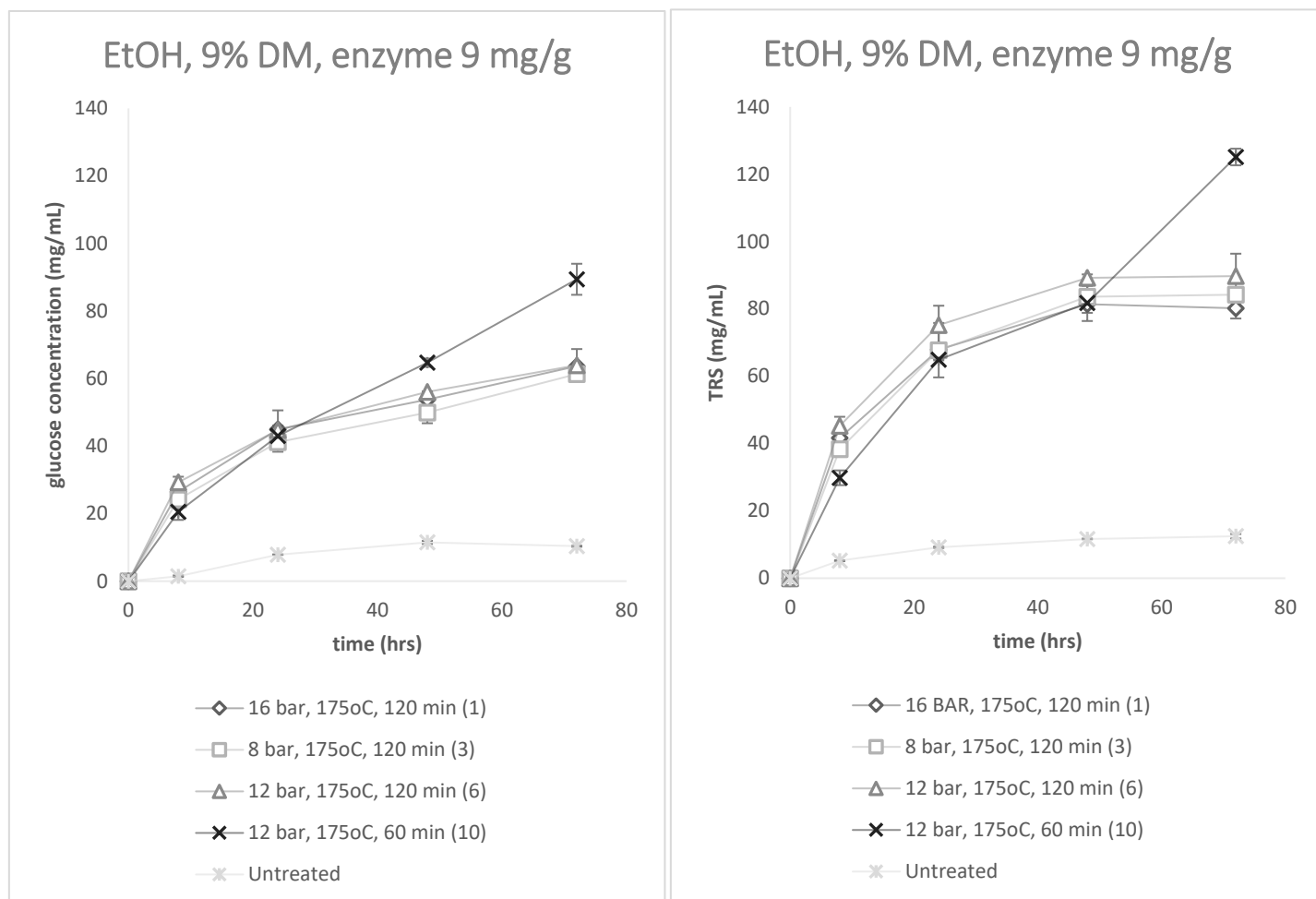


*Εικόνα 3.14. Επίδραση της θερμοκρασίας προκατεργασίας στην απόδοση της υδρόλυσης (εκφρασμένη σε mg γλυκόζης/ g βιομάζας) λιγνοκυτταρινούχων δειγμάτων πεύκου, που έχουν προκατεργαστεί με διαλύτη THF, σε χρόνο 120 min και θερμοκρασία 175°C. Το αποτέλεσμα αφορά τις 72 ώρες από την έναρξη της υδρόλυσης.*

Στην εικόνα 3.14 εξετάζεται η ικανότητα απελευθέρωσης γλυκόζης από δείγματα πεύκου που έχουν υποστεί ήπια υδροθερμική προκατεργασία με οργανικό διαλύτη THF, σε πίεση 16 bar, χρόνο 120 λεπτά, και διαφορετικές θερμοκρασίες (150, 160, 175°C, που αντιστοιχούν στα δείγματα 17,18 και 15 κατά σειρά). Από τα παραπάνω αποτελέσματα παρατηρείται ότι όσο υψηλότερη είναι η θερμοκρασία που εφαρμόζεται κατά το στάδιο της προκατεργασίας του πεύκου, τόσο καλύτερη είναι η απόδοση σε σάκχαρα. Συγκεκριμένα, οι μέγιστες απελευθερώσεις γλυκόζης παρουσιάζονται για το δείγμα πεύκου που έχει προκατεργαστεί στη μέγιστη θερμοκρασία από τις τρεις προαναφερθείσες (δείγμα 15), με σημαντική διαφορά από τις άλλες δύο. Ακολουθεί το δείγμα 18 (θερμοκρασία 160°C), που ωστόσο δεν παρουσιάζει πολύ υψηλότερες παραγωγές γλυκόζης από αυτές του δείγματος 17 (150°C). Αξίζει να σημειωθεί ότι η προκατεργασία σε υψηλότερες θερμοκρασίες για τη δεδομένη βιομάζα, διαλύτη και χρόνο, έχουν ως αποτέλεσμα τη λήψη κλάσματος πλούσιο σε κυτταρίνη (71,31% για 175°C), κάτι που δικαιολογεί την υψηλή απόδοση σε γλυκόζη. Η προκατεργασία σε 160 και 150°C οδηγεί σε παρόμοια κλάσματα κυτταρίνης, ελαφρώς υψηλότερα από το 60% (60,61% για τους 160°C, 62,26% για τους 150°C), για αυτό και οι απελευθερώσεις γλυκόζης στα δείγματα 17 και 18 είναι παρόμοιες.

### 3.1.1.5 Εξέλιξη της υδρόλυσης για τους διάφορους διαλύτες προκατεργασίας

#### 3.1.1.5.1 Οξιά



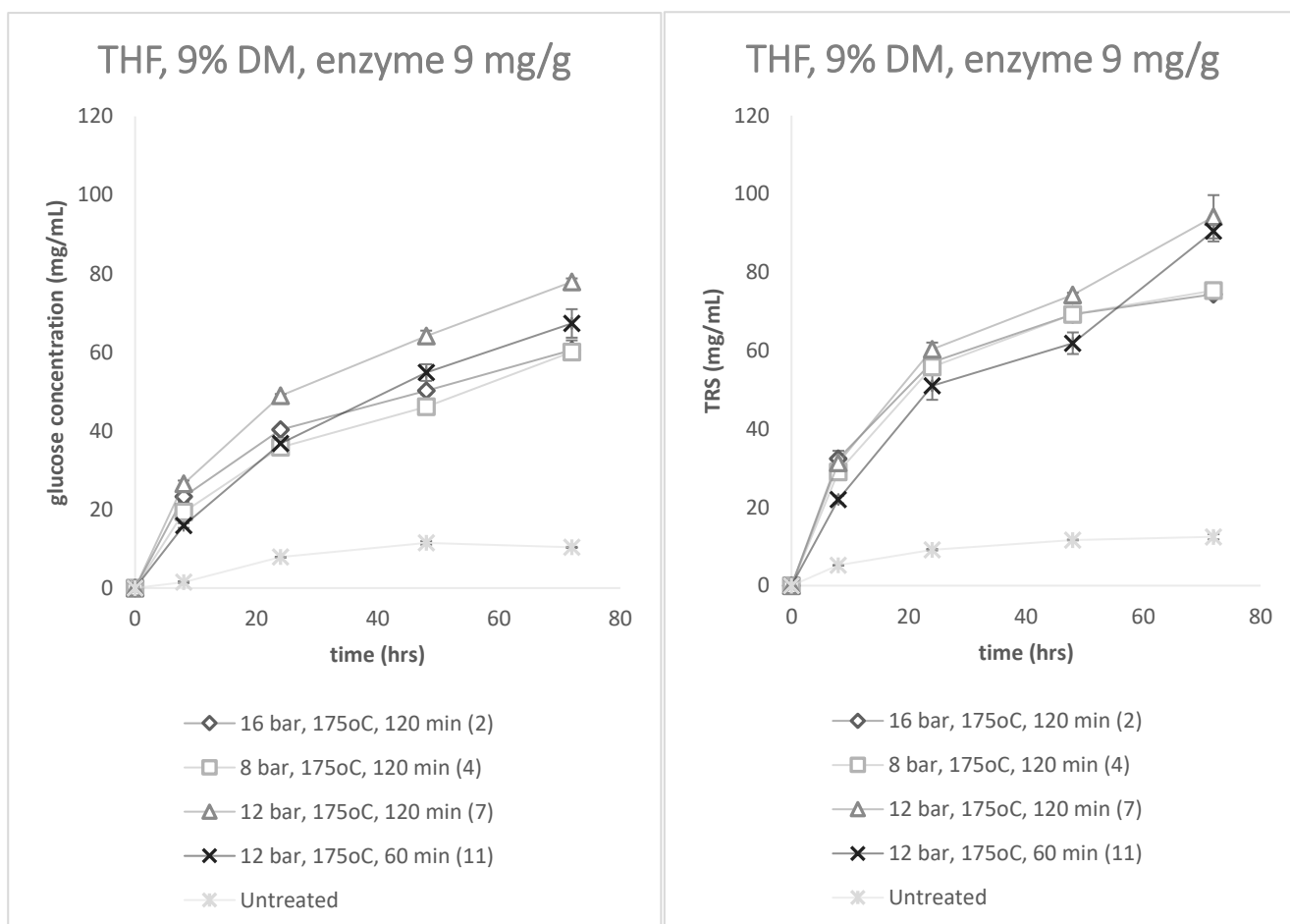
Εικόνα 3.15. Συγκέντρωση απελευθερωμένης γλυκόζης (αριστερά) και ολικών αναγωγικών σακχάρων (TRS) (δεξιά) κατά τη διάρκεια της ενζυμικής υδρόλυσης προκατεργασμένων με EtOH δειγμάτων οξιάς σε συγκέντρωση στερεών 9% DM, 50 ° C, 100 mM ρυθμιστικού διαλύματος κιτρικού-φωσφορικού άλατος pH=5.0 και ενζυμικό φορτίο 9 mg/g. Αυτά είναι, κατά αύξουσα αριθμητική σειρά: 1 (γκρι ρόμβος, συνθήκες προκατεργασίας: 16 bar, 175°C, 120 min), 3 (γκρι τετράγωνο, συνθήκες προκατεργασίας: 8 bar, 175°C, 120 min), 6 (γκρι τρίγωνο, συνθήκες προκατεργασίας: 12 bar, 175°C, 120 min) και 12 (μαύρο χι, συνθήκες προκατεργασίας: 12 bar, 175°C, 60 min). Για σύγκριση, παρατίθεται και το ακατέργαστο δείγμα οξιάς (untreated, γκρι αστερίσκος).

Στις παραπάνω εικόνες παρουσιάζεται η εξέλιξη της υδρόλυσης προκατεργασμένων με διαλύτη EtOH δειγμάτων οξιάς, σε διάρκεια 72 ωρών, υπό την δράση κυτταρινασών/ημικυτταρινασών. Από τα παραπάνω διαγράμματα είναι εμφανές ότι η συγκέντρωση της γλυκόζης και των ολικών αναγωγικών σακχάρων αυξάνεται με την πάροδο του χρόνου υδρόλυσης. Κάτι τέτοιο είναι αναμενόμενο αφού όσο προχωράει η δράση των υδρολυτικών ενζύμων στο κυτταρινούχο υλικό, όλο και περισσότερα μονομερή σάκχαρα θα απελευθερώνονται. Μάλιστα, η αύξηση των απελευθερωμένων σακχάρων γίνεται μέγιστη για το πρώτο 24ωρο, όπου μετά και για τις 4 βιομάζες (1,3,6,10) αυξάνεται με μικρότερο ρυθμό. Ακόμη, αξίζει να παρατηρηθεί ότι η συγκέντρωση των ολικών σακχάρων είναι σαφώς υψηλότερη από της γλυκόζης κάθε χρονική στιγμή της υδρόλυσης. Αυτό οφείλεται στο γεγονός ότι κατά τη μέθοδο DNS

προσδιορίζονται και άλλα σάκχαρα που έχουν απελευθερωθεί κατά την ενζυμική υδρόλυση πέραν της γλυκόζης, όπως ξυλόζη, μαννόζη, αραβινόζη, και άλλα.

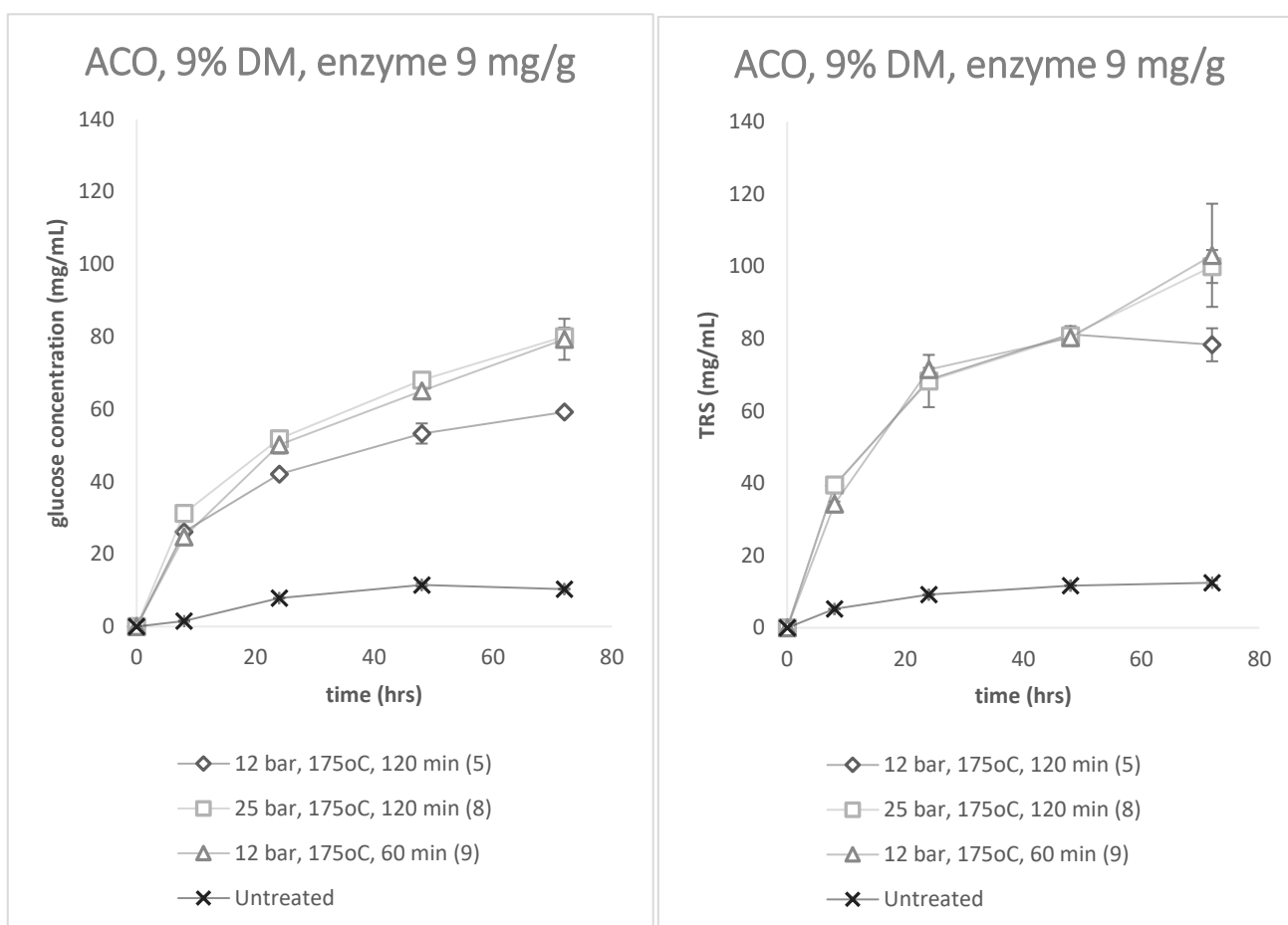
Από το διάγραμμα συγκέντρωσης της γλυκόζης, γίνεται περισσότερο ξεκάθαρο ως προς ποιες συνθήκες προκατεργασίας μεγιστοποιείται η απελευθέρωση γλυκόζης, όταν η αιθανόλη χρησιμοποιείται ως οργανικός διαλύτης. Αυτές είναι για πίεση 12 bar και χρόνο προκατεργασίας 60 λεπτά (δείγμα 3). Οι λοιπές συνθήκες προκατεργασίας (πίεση 16,12 και 8 bar με χρόνο προκατεργασίας 120 min που αντιστοιχούν στα δείγματα 1,6,10) έχουν παραπλήσιο αποτέλεσμα στην απελευθέρωση γλυκόζης κατά την ενζυμική υδρόλυση, το οποίο είναι σαφώς κατώτερο από αυτό των 12 bar και 60 λεπτών.

Αξιοσημείωτη είναι, επίσης, η συμβολή της προκατεργασίας στην απελευθέρωση των σακχάρων, καθώς από το διάγραμμα μπορεί να παρατηρηθεί ότι η υδρόλυση της απροκατέργαστης βιομάζας οδηγεί αφενός σε μικρότερες συγκεντρώσεις γλυκόζης και ολικών σακχάρων, αφετέρου διεξάγεται με πολύ πιο αργό ρυθμό σε σχέση με αυτόν των προκατεργασμένων βιομαζών.



Εικόνα 3.16. Συγκέντρωση απελευθερωμένης γλυκόζης (αριστερά) και ολικών αναγωγικών σακχάρων (TRS) (δεξιά) κατά τη διάρκεια της ενζυμικής υδρόλυσης προκατεργασμένων με THF δειγμάτων οξιάς, σε συγκέντρωση στερεών 9% DM, 50 °C, 100 mM ρυθμιστικού διαλύματος κιτρικού-φωσφορικού άλατος pH=5.0 και ενζυμικό φορτίο 9 mg/g. Αυτά είναι, κατά αύξουσα αριθμητική σειρά: 2 (γκρι ρόμβος, συνθήκες προκατεργασίας: 16 bar, 175°C, 120 min), 4 (γκρι τετράγωνο, συνθήκες προκατεργασίας: 8 bar, 175°C, 120 min), 7 (γκρι τρίγωνο, συνθήκες προκατεργασίας: 12 bar, 175°C, 120 min) και 11 (μαύρο χι, συνθήκες προκατεργασίας: 12 bar, 175°C, 60 min) Για σύγκριση, παρατίθεται και το ακατέργαστο δείγμα οξιάς (untreated, γκρι αστερίσκος).

Όμοια με πριν, η συγκέντρωση της γλυκόζης και των ολικών αναγωγικών σακχάρων αυξάνεται με την πάροδο του χρόνου υδρόλυσης. Εδώ, η συγκέντρωση των απαλευθερωμένων σακχάρων αυξάνεται με πολύ πιο γρήγορο ρυθμό, ο οποίος είναι όμοιος για τα δείγματα 2-4 και 7-11, κατά ζεύγη, όσον αφορά τη γλυκόζη. Όσον αφορά τα ολικά σάκχαρα, ο ρυθμός είναι παραπλήσιος για όλες τις βιομάζες (εξαιρουμένου της απροκατέργαστης) για τις πρώτες 48 ώρες, ενώ στο τελευταίο 24ωρο αυξάνεται απότομα στις βιομάζες 7 και 11. Από τα δύο διαγράμματα φαίνεται πως οι δύο καλύτερες προκατεργασίες, όταν χρησιμοποιείται διαλύτης THF, είναι σε 12 bar και χρόνους 120 min (δείγμα 7) και 60 min (δείγμα 11), αντίστοιχα. Όμοια με πριν, μπορεί να παρατηρηθεί η συμβολή της όλης διαδικασίας της προκατεργασίας στην απελευθέρωση σακχάρων από κυτταρίνη, αφού το απροκατέργαστο υλικό έχει αμελητέα ικανότητα απελευθέρωσης σακχάρων.

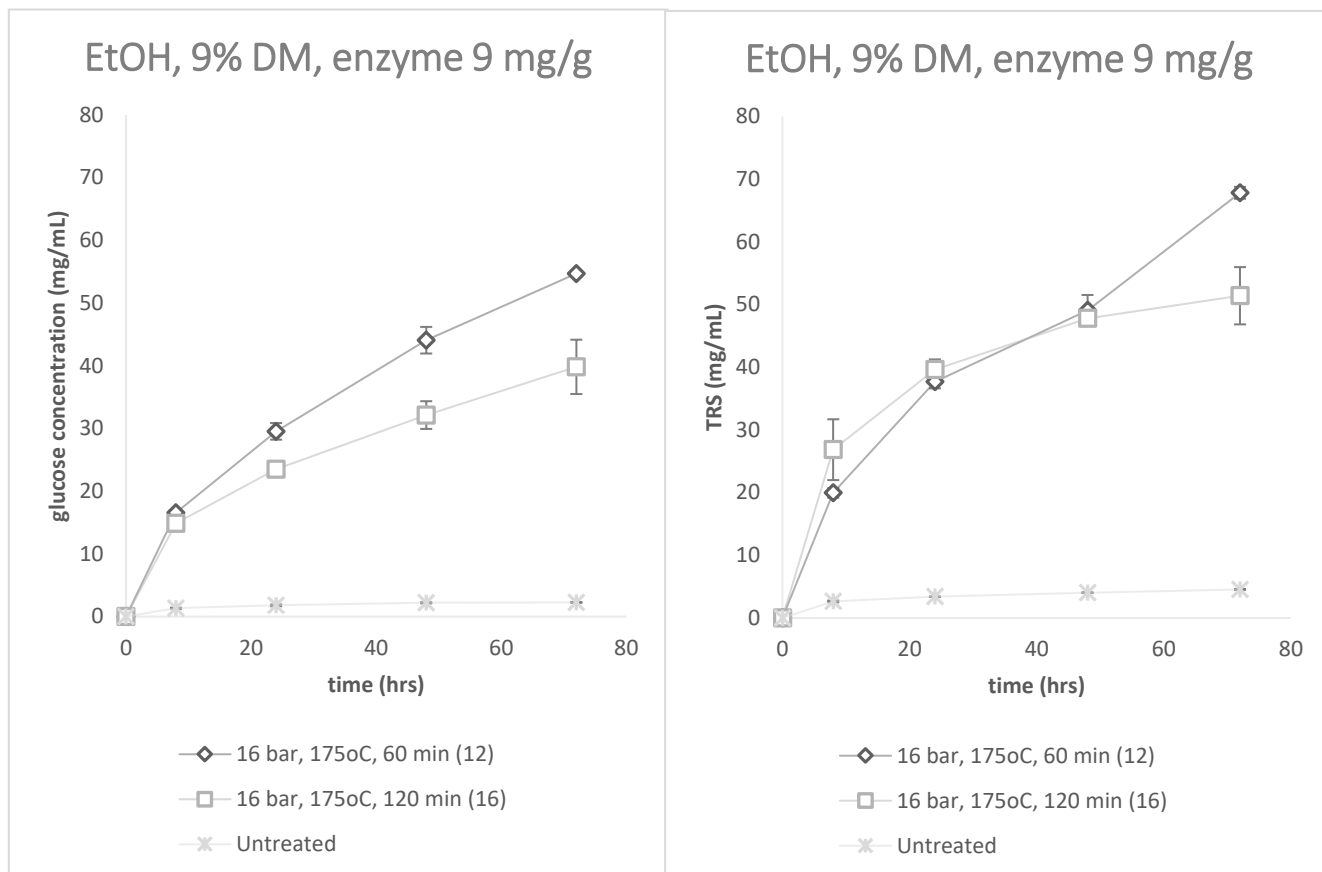


Εικόνα 3.17. Συγκέντρωση απελευθερωμένης γλυκόζης (αριστερά) και ολικών αναγωγικών σακχάρων (TRS) (δεξιά) κατά τη διάρκεια της ενζυμικής υδρόλυσης προκατεργασμένων με ACO δειγμάτων οξιάς, σε συγκέντρωση στερεών 9% DM, 50 ° C, 100 mM ρυθμιστικού διαλύματος κητρικού-φωσφορικού άλατος pH=5.0 και ενζυμικό φορτίο 9 mg/g. Αυτά είναι, κατά αύξουσα αριθμητική σειρά: 5 (γκρι ρόμβος, συνθήκες προκατεργασίας: 12 bar, 175°C, 120 min), 8 (γκρι τετράγωνο, συνθήκες προκατεργασίας: 25 bar, 175°C, 120 min), και 9 (γκρι τρίγωνο, συνθήκες προκατεργασίας: 12 bar, 175°C, 60 min). Για σύγκριση, παρατίθεται και το απροκατέργαστο δείγμα οξιάς (untreated, μαύρο χι).

Όταν ως διαλύτης χρησιμοποιείται ACO, οι συνθήκες προκατεργασίας που ευνοούν την υδρόλυση οξιάς είναι 25 bar με χρόνο προκατεργασίας 120 λεπτά (δείγμα 8) καθώς και 12 bar με χρόνο προκατεργασίας 60 λεπτά (δείγμα 9). Οι συνθήκες των 12 bar και 120 min (δείγμα 5) ευνοούν την απελευθέρωση σακχάρων για τις πρώτες 48 ώρες, με

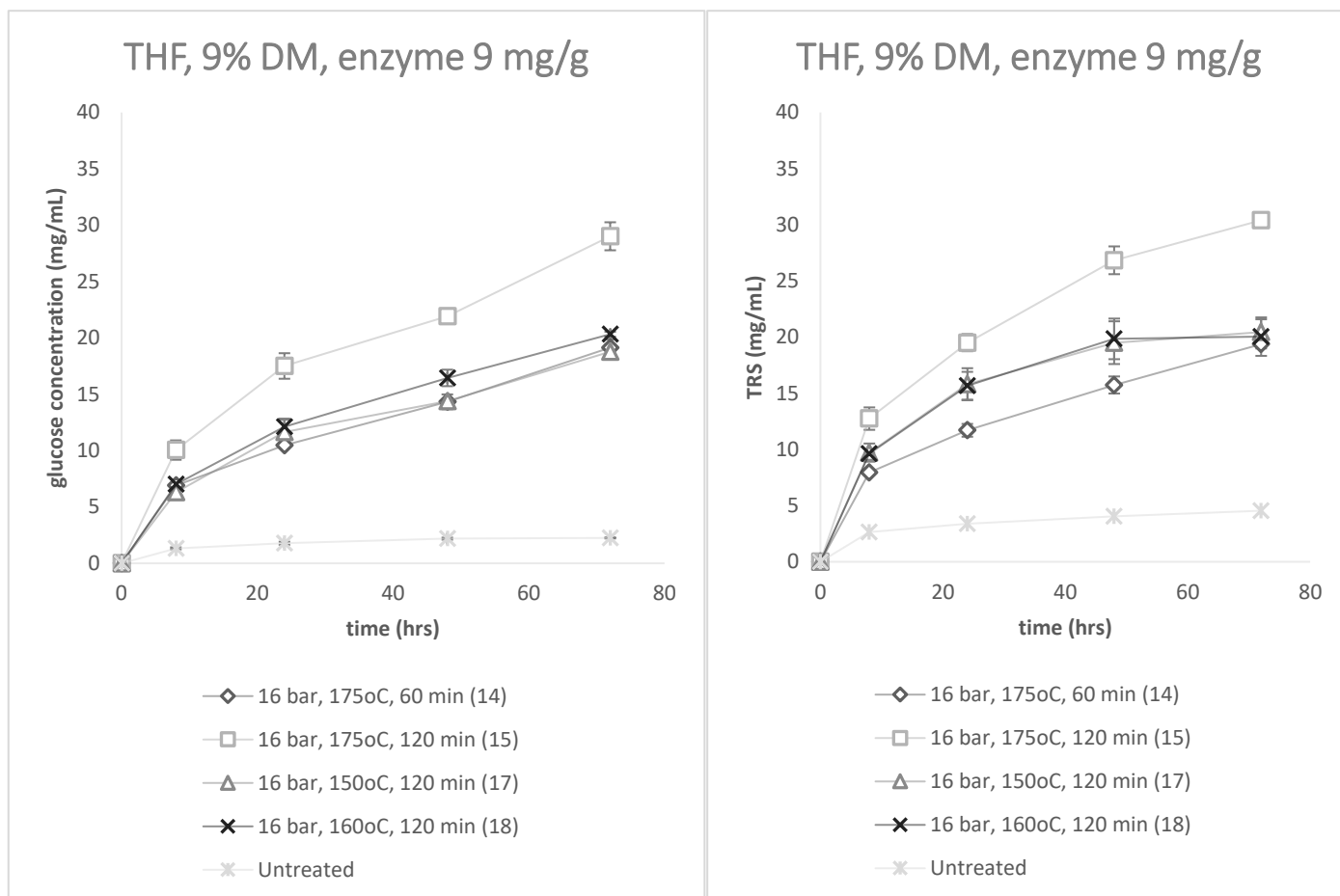
συγκεντρώσεις πολύ κοντινές σε αυτές που κατορθώνουν τα κατεξοχήν δείγματα, που όμως, μένουν σταθερές μέχρι το πέρας της υδρόλυσης στις 72 ώρες.

### 3.1.1.5.2 Πεύκο



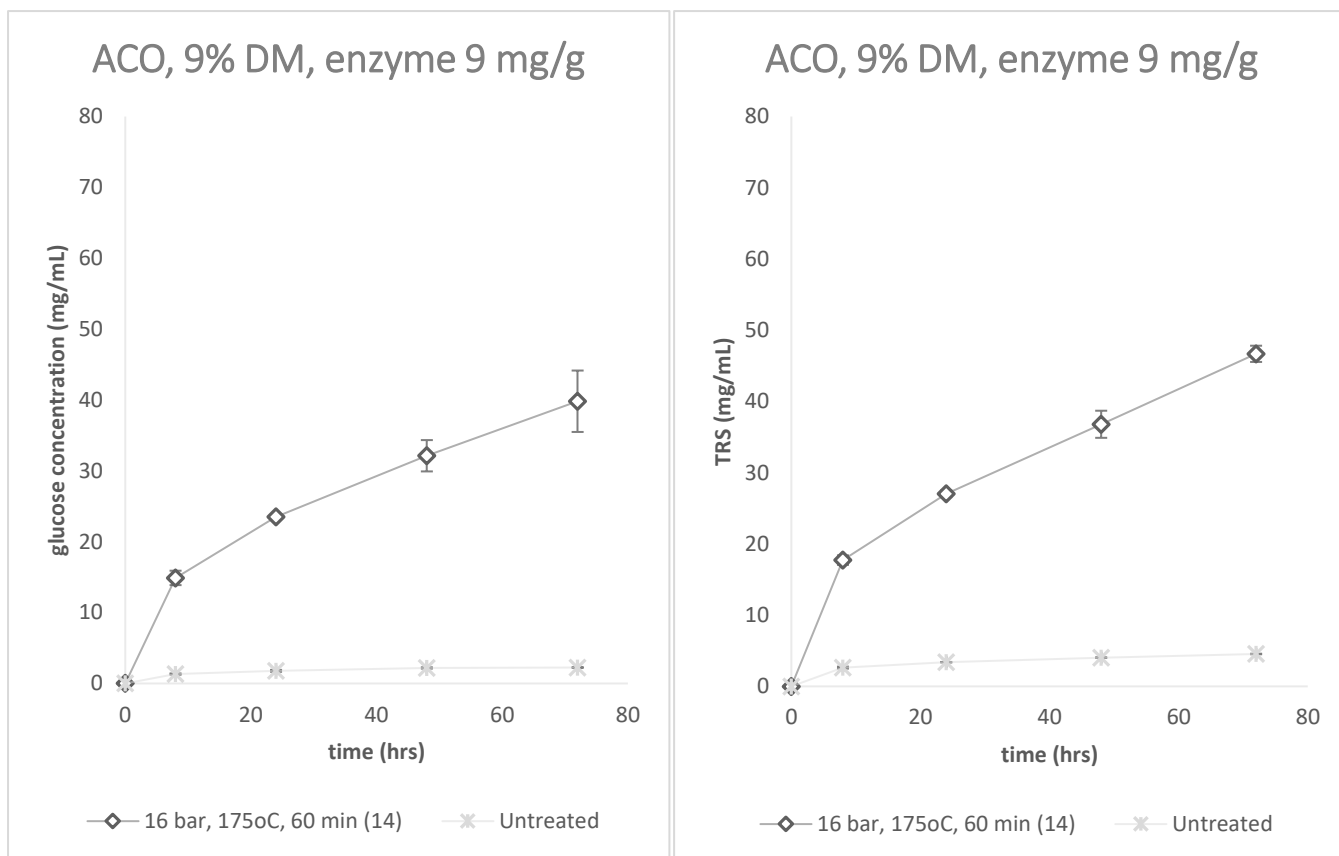
Εικόνα 3.18. Συγκέντρωση απελευθερωμένης γλυκόζης (αριστερά) και ολικών αναγωγικών σακχάρων (TRS) (δεξιά) κατά τη διάρκεια της ενζυμικής υδρόλυσης προκατεργασμένων με EtOH δειγμάτων πεύκου σε συγκέντρωση στερεών 9% DM, 50 °C, 100 mM ρυθμιστικού διαλύματος κιτρικού-φωσφορικού άλατος pH=5.0 και ενζυμικό φορτίο 9 mg/g. Αυτά είναι, κατά αύξουσα αριθμητική σειρά: 12 (γκρι ρόμβος, συνθήκες προκατεργασίας: 16 bar, 175°C, 60 min), 16 (γκρι τετράγωνο, συνθήκες προκατεργασίας: 16 bar, 175°C, 120 min). Για σύγκριση, παρατίθεται και το ακατέργαστο δείγμα πεύκου (untreated, γκρι αστερίσκος).

Στις παραπάνω εικόνες παρουσιάζεται η εξέλιξη της υδρόλυσης που λαμβάνει χώρα για 72 ώρες, σε συγκέντρωση στερεών 9%, ενζυμικό φορτίο 9 mg/g σε υποστρώματα πεύκου που έχουν προκατεργαστεί με διαλύτη EtOH. Όπως είναι αντιληπτό, όταν η EtOH χρησιμοποιείται σαν διαλύτης οι συνθήκες που ευνοούν την υδρόλυση του πεύκου είναι πίεση 16 bar, 175°C και χρόνος προκατεργασίας 60 min (δείγμα 12). Όπως μελετήθηκε και στην παράγραφο 3.1.1.2.2, οι μικρότεροι χρόνοι προκατεργασίας ευνοούν την απελευθέρωση σακχάρων από τη βιομάζα, όταν ως διαλύτης χρησιμοποιείται EtOH. Και στην περίπτωση του πεύκου, η σημαντικότητα της προκατεργασίας πριν την ενζυμική υδρόλυση μπορεί να διαπιστωθεί εάν κανείς παρατηρήσει τις αμελητέες συγκεντρώσεις γλυκόζης και σακχάρων που απελευθερώνονται κατά την υδρόλυση του ακατέργαστου δείγματος πεύκου (Untreated).



Εικόνα 3.19. Συγκέντρωση απελευθερωμένης γλυκόζης (αριστερά) και ολικών αναγωγικών σακχάρων (TRS) (δεξιά) κατά τη διάρκεια της ενζυμικής υδρόλυσης προκατεργασμένων με THF δειγμάτων πεύκου σε συγκέντρωση στερεών 9% DM, 50 ° C, 100 mM ρυθμιστικού διαλύματος κιτρικού-φωσφορικού άλατος pH=5.0 και ενζυμικό φορτίο 9 mg/g. Αυτά είναι, κατά αύξουσα αριθμητική σειρά: 14 (γκρι ρόμβος, συνθήκες προκατεργασίας: 16 bar, 175°C, 60 min), 15 (γκρι τετράγωνο, συνθήκες προκατεργασίας: 16 bar, 175°C, 120 min), 17 (γκρι τρίγωνο, συνθήκες προκατεργασίας: 16 bar, 150°C, 120 min) και 18 (μαύρο χι, συνθήκες προκατεργασίας: 16 bar, 160°C, 120 min). Για σύγκριση, παρατίθεται και το ακατέργαστο δείγμα πεύκου (untreated, γκρι αστερίσκος).

Στις παραπάνω εικόνες παρουσιάζεται η εξέλιξη της υδρόλυσης που λαμβάνει χώρα για 72 ώρες, σε συγκέντρωση στερεών 9%, ενζυμικό φορτίο 9 mg/g σε υποστρώματα πεύκου που έχουν προκατεργαστεί με διαλύτη THF. Όπως είναι αντιληπτό, όταν χρησιμοποιείται διαλύτης THF, οι συνθήκες που μεγιστοποιούν την παραγωγή γλυκόζης και συνολικών αναγωγικών σακχάρων είναι για πίεση 16 bar, θερμοκρασία 175°C και χρόνο προκατεργασίας 120 min (δείγμα 15). Για χρόνο 60 λεπτών σε θερμοκρασία 175°C (δείγμα 14) και 120 λεπτών σε μικρότερες θερμοκρασίες (150 και 160°C) (δείγματα 17,18) το αποτέλεσμα ως προς την απελευθέρωση γλυκόζης και ολικών αναγωγικών σακχάρων είναι περίπου το ίδιο.



Εικόνα 3.20. Συγκέντρωση γλυκόζης (αριστερά) και ολικών αναγωγικών σακχάρων (TRS) (δεξιά) που απελευθερώνονται κατά τη διάρκεια της ενζυμικής υδρόλυσης προκατεργασμένου με διαλύτη ACO πεύκου, σε συγκέντρωση στερεών 9% DM, 50 ° C, ενζυμικό φορτίο 9 mg/g και ρυθμιστικό διάλυμα κιτρικού-φωσφορικού άλατος συγκέντρωσης 100 mM, pH=5.0. Οι συνθήκες προκατεργασίας του δείγματος είναι 16 bar, 175°C, 60 min και αντιστοιχεί στον αριθμό 14 (γκρι ρόμβος). Για σύγκριση, παρατίθεται και το ακατέργαστο δείγμα πεύκου (untreated, γκρι αστερίσκος).

Στις παραπάνω εικόνες παρουσιάζεται η εξέλιξη της υδρόλυσης που λαμβάνει χώρα για 72 ώρες, σε συγκέντρωση στερεών 9%, ενζυμικό φορτίο 9 mg/g σε πεύκο που έχει προκατεργαστεί με διαλύτη ACO υπό συνθήκες πίεσης 16 bar, θερμοκρασίας 175°C και για χρόνο 60 min. Οι συγκεντρώσεις γλυκόζης που επιτυγχάνονται κατά το πέρας της υδρόλυσης, ύστερα από προκατεργασία της λιγνοκυτταρινούχου βιομάζας, είναι περίπου 40 mg/mL ενώ για τα ολικά αναγωγικά σάκχαρα ελαφρώς υψηλότερες. Όπως και στις προηγούμενες περιπτώσεις, αξίζει να σημειωθεί ότι αυτές είναι πολύ σημαντικά υψηλότερες από τις αντίστοιχες που κατορθώνει η υδρόλυση του ακατέργαστου πεύκου, επιδεικνύοντας για ακόμη μία φορά τη σημαντικότητα της υδρόλυσης στην απελευθέρωση σακχάρων από κυτταρίνη και ημικυτταρίνη.



### 3.1.2 Επιλογή δειγμάτων για τις διεργασίες SSF, SHF

Βάσει της σχέσης που εισήχθη στην παράγραφο 2.2.1.2 της ενότητας «Υλικά και Μέθοδοι» υπολογίζεται για κάθε υδρολυόμενη βιομάζα η μετατροπή της κυτταρίνης σε ζυμώσιμα σάκχαρα, και επιλέγονται από κάθε κατηγορία ξύλου (οξιά και πεύκο) αυτά με τις υψηλότερες τιμές. Επίσης, για την επιλογή των προκατεργασμένων βιομάζων που θα χρησιμοποιηθούν ως δυνητικές πηγές σακχάρων, λαμβάνονται υπόψιν και οι συγκεντρώσεις της γλυκόζης και των ολικών σακχάρων που απελευθερώνονται κατά την ενζυμική υδρόλυση σε διάστημα 72 ωρών, καθώς και το «δυναμικό» απελευθέρωσης γλυκόζης και ολικών σακχάρων ανά g προκατεργασμένης βιομάζας. Τα υποστρώματα που πληρούν τα τρία παραπάνω κριτήρια, και τα οποία επιλέχθηκαν, παρουσιάζονται παρακάτω. Η επιλογή αφορά σε 8 υποστρώματα οξιάς και 3 υποστρώματα πεύκου. Για τα υπόλοιπα υποστρώματα, τα σχετικά μεγέθη παρουσιάζονται σε Πίνακες του Παραρτήματος (Πίνακας 6.2, Πίνακας 6.3).

*Πίνακας 3.1 Μετατροπή κυτταρίνης (%), συγκέντρωση γλυκόζης (mg/mL) και mg γλυκόζης/g βιομάζας για τα «καλύτερα» προκατεργασμένα υποστρώματα οξιάς και πεύκου που επιλέχθηκαν ύστερα από την υδρόλυσή τους.*

Δείγμα #	Είδος βιομάζας	Προκατεργασία βιομάζας	%Μετατροπή κυτταρίνης	Συγκέντρωση γλυκόζης (mg/mL) 72 h	mg γλυκόζης / g βιομάζας
4	Οξιά	H <sub>2</sub> O/THF (50/50%), O <sub>2</sub> 8 bar, 175°C, 120 min	78,66	60,06	667,34
5	Οξιά	H <sub>2</sub> O/ACO (50/50%), O <sub>2</sub> 12 bar, 175°C, 120 min	74,46	59,19	657,62
6	Οξιά	H <sub>2</sub> O/EtOH (50/50%), O <sub>2</sub> 12 bar, 175°C, 120 min	79,79	63,94	710,45
7	Οξιά	H <sub>2</sub> O/THF (50/50%), O <sub>2</sub> 12 bar, 175°C, 120 min	97,24	77,89	865,49
8	Οξιά	H <sub>2</sub> O/ACO (50/50%), O <sub>2</sub> 25 bar, 175°C, 120 min	99,69	80,02	889,10
9	Οξιά	H <sub>2</sub> O/ACO (50/50%), O <sub>2</sub> 12 bar, 175°C, 60 min	107,39	79,27	880,77
10	Οξιά	H <sub>2</sub> O/EtOH (50/50%), O <sub>2</sub> 12 bar, 175°C, 60 min	124,87	89,40	993,29
11	Οξιά	H <sub>2</sub> O/THF (50/50%), O <sub>2</sub> 12 bar, 175°C, 60 min	91,61	67,33	748,10
12	Πεύκο	H <sub>2</sub> O/EtOH (50/50%), O <sub>2</sub> 16 bar, 175°C, 60 min	70,50	54,70	607,78
13	Πεύκο	H <sub>2</sub> O/ACO (50/50%), O <sub>2</sub> 16 bar, 175°C, 60 min	48,13	38,82	442,47
16	Πεύκο	H <sub>2</sub> O/EtOH (50/50%), O <sub>2</sub> 16 bar, 175°C, 120 min	58,57	46,60	517,77

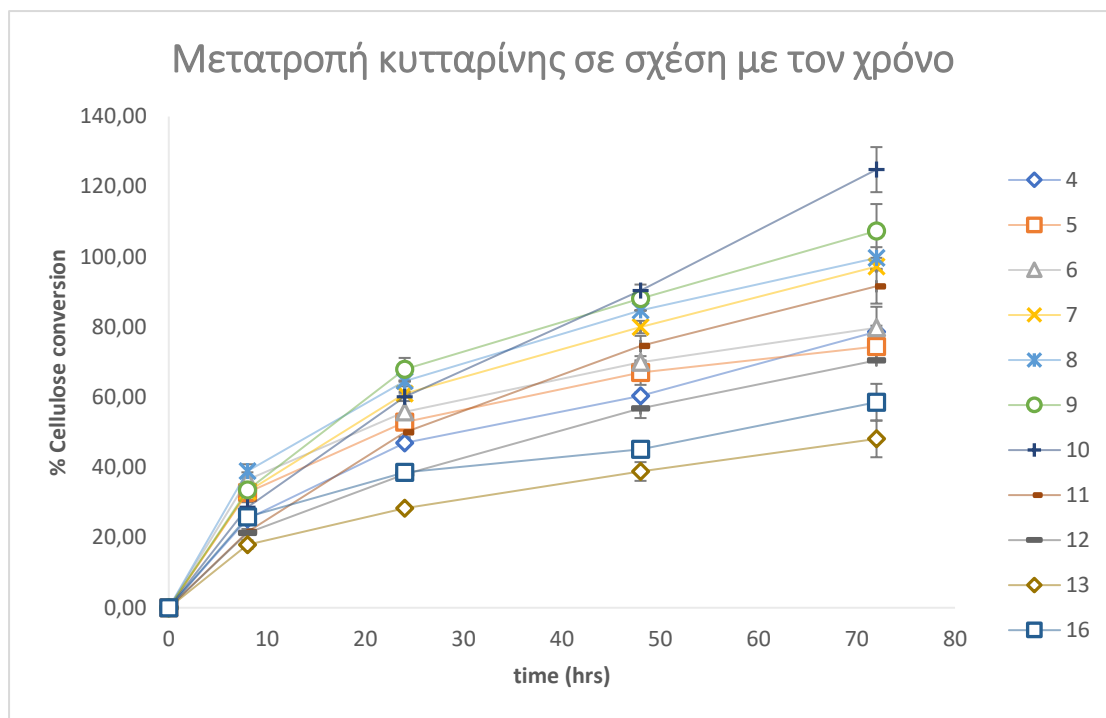
Πίνακας 3.2 Συγκέντρωση ολικών σακχάρων (TRS) (mg/mL) και mg ολικών σακχάρων/g βιομάζας για τα «καλύτερα» προκατεργασμένα υποστρώματα οξιάς και πεύκου που επιλέχθηκαν ύστερα από την υδρόλυσή τους.

Δείγμα #	Είδος βιομάζας	Προκατεργασία βιομάζας	Συγκέντρωση	mg ολικών
			ολικών σακχάρων (mg/mL)	σακχάρων / g βιομάζας
				<b>72 h</b>
4	Οξιά	H <sub>2</sub> O/THF (50/50%), O <sub>2</sub> 8 bar, 175°C, 120 min	75,34	837,14
5	Οξιά	H <sub>2</sub> O/ACO (50/50%), O <sub>2</sub> 12 bar, 175°C, 120 min	78,30	870,03
6	Οξιά	H <sub>2</sub> O/EtOH (50/50%), O <sub>2</sub> 12 bar, 175°C, 120 min	89,74	997,09
7	Οξιά	H <sub>2</sub> O/THF (50/50%), O <sub>2</sub> 12 bar, 175°C, 120 min	94,18	1046,42
8	Οξιά	H <sub>2</sub> O/ACO (50/50%), O <sub>2</sub> 25 bar, 175°C, 120 min	99,96	1110,70
9	Οξιά	H <sub>2</sub> O/ACO (50/50%), O <sub>2</sub> 12 bar, 175°C, 60 min	103,06	1145,08
10	Οξιά	H <sub>2</sub> O/EtOH (50/50%), O <sub>2</sub> 12 bar, 175°C, 60 min	125,12	1390,25
11	Οξιά	H <sub>2</sub> O/THF (50/50%), O <sub>2</sub> 12 bar, 175°C, 60 min	90,55	1006,06
12	Πεύκο	H <sub>2</sub> O/EtOH (50/50%), O <sub>2</sub> 16 bar, 175°C, 60 min	54,7	753, 42
13	Πεύκο	H <sub>2</sub> O/ACO (50/50%), O <sub>2</sub> 16 bar, 175°C, 60 min	38,82	518,73
16	Πεύκο	H <sub>2</sub> O/EtOH (50/50%), O <sub>2</sub> 16 bar, 175°C, 120 min	46,60	571,05

Να σημειωθεί ότι ο Πίνακας 3.1 περιλαμβάνει βιομάζες που κατά την υδρόλυσή τους επιτυγχάνουν μετατροπή κυτταρίνης πάνω από 100%. Αυτό οφείλεται σε πειραματικά σφάλματα της υδρόλυσης αλλά και της μεθόδου ανίχνευσης της γλυκόζης.

### 3.1.2.1 Σύγκριση της αποτελεσματικότητας της υδρόλυσης μεταξύ των καλύτερων υποστρωμάτων

Στο σημείο αυτό γίνεται μία σύντομη σύγκριση ως προς την αποτελεσματικότητα της υδρόλυσης ανάμεσα στα προκατεργασμένα δείγματα που επιλέχθηκαν. Η σύγκριση αυτή πραγματοποιείται με κατασκευή των διαγραμμάτων μετατροπής κυτταρίνης ως προς τον χρόνο έτσι ώστε να αποτυπωθεί η ευελιξία τους ως προς την υδρόλυση κάθε χρονική στιγμή.



Εικόνα 3.21. Μετατροπή κυτταρίνης σε γλυκόζη κατά τη διάρκεια της ενζυμικής υδρόλυσης για 72 ώρες στα καλύτερα υποστρώματα οξιάς και πεύκου.

Από την Εικόνα 3.21 μπορεί να παρατηρηθεί ότι για το πρώτο δωρο της ενζυμικής υδρόλυσης υψηλότερη μετατροπή της κυτταρίνης επιτυγχάνεται για το υπόστρωμα **8** (οξιά: ACO, 25 bar, 175°C, 120 min). Στις 24 ώρες από την έναρξη της υδρόλυσης υψηλότερη μετατροπή σημειώνει το δείγμα **9** (οξιά: ACO, 12 bar, 175°C, 60 min), ακολουθούμενο από τα δείγματα οξιάς **8**, **7** (THF, 12 bar, 175°C, 120 min), **10** (EtOH, 12 bar, 175°C, 60 min), **6** (EtOH, 12 bar, 175°C, 120 min), **5** (ACO, 12 bar, 175°C, 120 min), **11** (THF, 12 bar, 175°C, 60 min) και **4** (THF, 8 bar, 175°C, 120 min) που σημειώνουν μετατροπή πάνω από 40%. Αξίζει να σημειωθεί ότι για το πρώτο 24ωρο τα δείγματα πεύκου σημειώνουν χαμηλότερες μετατροπές σε σχέση με της οξιάς, που φαίνεται να δείχνουν υπεροχή. Κάτι τέτοιο οδηγεί στο συμπέρασμα ότι το πεύκο συνιστά πιο δύσκολα αποδομήσιμη βιομάζα σε σχέση με την οξιά. Για το επόμενο 24ωρο και μέχρι το πέρας της υδρόλυσης, το δείγμα **10** αποτελεί το κατεξοχήν κυρίαρχο δείγμα σε μετατροπή κυτταρίνης. Κοντινά με αυτό βρίσκονται τα 9 και 8, ενώ οι χαμηλότερες μετατροπές σημειώνονται και εδώ για τα δείγματα πεύκου 16 και 13. Στο τέλος της υδρόλυσης, οι βιομάζες για τις οποίες έχει σημειωθεί μεγάλου βαθμού μετατροπή είναι οι 10, 9, 8, 7 και 11, που σαφώς προέρχονται από οξιά. Με μετατροπές κυτταρίνης από 60-80% εντοπίζονται τα 6 και 5, που προέρχονται, επίσης, από οξιά, και το 12, προερχόμενο από πεύκο. Όμοια με πριν, τα δείγματα πεύκου 16 και 13 παρουσιάζουν χαμηλές μετατροπές, με το 13 να είναι το λιγότερο βιομετατρέψιμο μέχρι το τέλος της υδρόλυσης.

## 3.2 ΠΑΡΑΓΩΓΗ ΓΑΛΑΚΤΙΚΟΥ ΟΞΕΟΣ ΑΠΟ *LACTOBACILLUS DELBRUECKII* ΜΕ ΔΙΕΡΓΑΣΙΑ SSF

Για την SSF διεργασία παραγωγής γαλακτικού οξέος από γαλακτικά βακτήρια, ως πηγές σακχάρων χρησιμοποιήθηκαν τα καλύτερα υποστρώματα και από τα δύο είδη βιομαζών, οξιάς και πεύκου. Επίσης, ως καλλιέργεια «ελέγχου» ορίστηκε η καλλιέργεια κυττάρων γαλακτικών βακτηρίων *L. delbrueckii* που αναπτύχθηκε σε ακατέργαστη βιομάζα, αντίστοιχα πεύκου ή οξιάς. Για την ποσοτικοποίηση του παραγόμενου γαλακτικού οξέος στις καλλιέργειες χρησιμοποιήθηκε η φασματοφωτομετρική μέθοδος τριχλωριούχου σιδήρου (FeCl<sub>3</sub>) που περιγράφεται στην παράγραφο 2.2.2.1.1.1 του κεφαλαίου ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ.

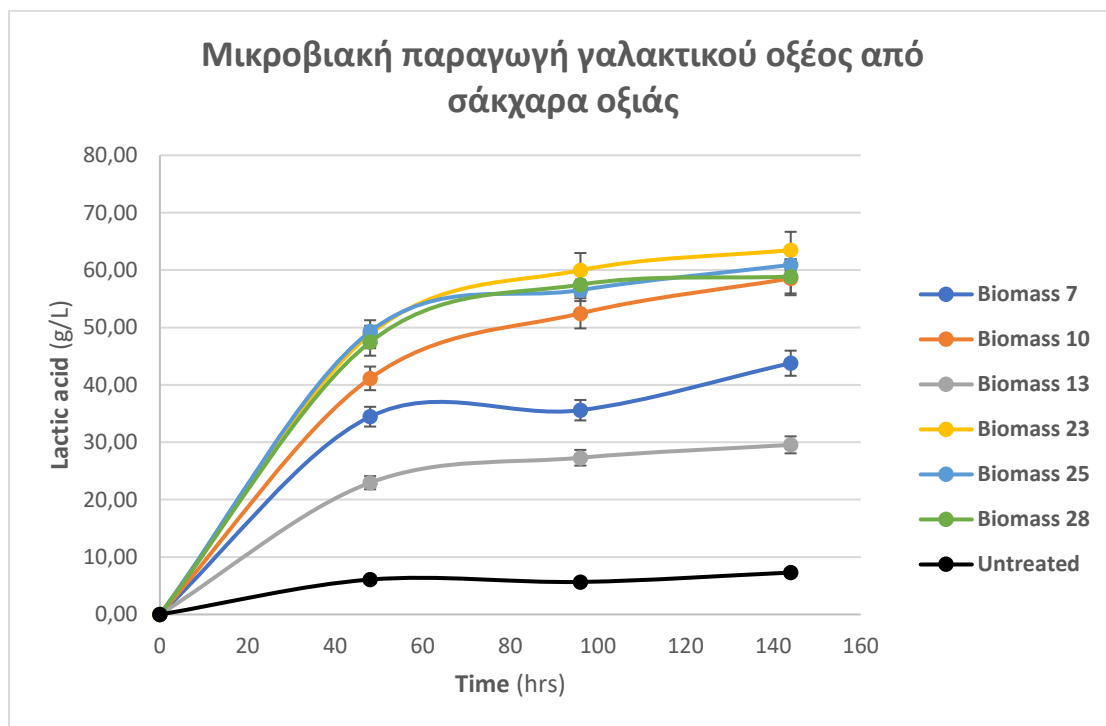
### 3.2.1 Παραγωγή γαλακτικού οξέος από σάκχαρα προερχόμενα από οξιά

Οι πούλπες οξιάς που χρησιμοποιήθηκαν ως υποστρώματα για τις ζυμώσεις από γαλακτικά βακτήρια περιλάμβαναν δείγματα με την καλύτερη υδρολυτική ικανότητα από προηγούμενες μελέτες που διεξήχθησαν στο εργαστήριο Βιοτεχνολογίας και δεν αναλύονται στην παρούσα διπλωματική εργασία, αλλά και από την τωρινή που παρουσιάστηκε στην Παράγραφο «ΥΔΡΟΛΥΣΕΙΣ ΒΙΟΜΑΖΩΝ». Για καθένα από τα υποστρώματα αυτά (Πίνακας 3.3) πραγματοποιήθηκαν διπλές καλλιέργειες *L. delbrueckii*, υπό τις συνθήκες που περιεγράφηκαν στην παράγραφο 2.2.2.1 του κεφαλαίου ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ. Για την καλλιέργεια ελέγχου πραγματοποιήθηκε ανάπτυξη του μικροοργανισμού σε ακατέργαστο δείγμα οξιάς. Επίσης, για την εκτίμηση της κατανάλωσης των απελευθερωμένων σακχάρων από τον μικροοργανισμό, πραγματοποιήθηκαν ξεχωριστά από την SSF, ενζυμικές υδρολύσεις σε συνθήκες ίδιες με την SSF, δηλαδή σε θερμοκρασία 44°C για 168 ώρες. Για λόγους ευκολίας, από εδώ και ως το εξής οι καλλιέργειες θα αναφέρονται με τον αριθμό (#) της αντίστοιχης βιομάζας που χρησιμοποιήθηκε ως υπόστρωμα για την μικροβιακή παραγωγή γαλακτικού οξέος.

Πίνακας 3.3 Δείγματα οξιάς που χρησιμοποιήθηκαν ως πηγές σακχάρων για τις SSF καλλιέργειες παραγωγής γαλακτικού οξέος από *L. delbrueckii*. Τα δείγματα 7,13,23,28,25 αφορούν τα καλύτερα υποστρώματα προηγούμενης μελέτης, ενώ το δείγμα 10 αφορά το καλύτερο υπόστρωμα της τωρινής. ACO: Ακετόνη, EιOH: Αιθανόλη, THF: Τετραϋδροφουράνιο.

Δείγμα Οξιάς (#)	Μέθοδος Προκατεργασίας	%Κυτταρίνη	%Ημικυτταρίνη	%Λιγνίνη	%Μετατροπή κυτταρίνης (44°C, 168 h)
7	H <sub>2</sub> O/ACO (50/50%), O <sub>2</sub> 16 bar, 150°C, 120 min	64,04	21,62	13,61	59,36±1,10

<b>13</b>	H <sub>2</sub> O/THF (50/50%), O <sub>2</sub> 8 bar, 150°C, 120 min	56,6	19,24	18,12	51,25±0,00
<b>23</b>	H <sub>2</sub> O/ACO (50/50%), O <sub>2</sub> 16 bar, 175°C, 60 min	85,41	11,45	2,32	81,18±0,52
<b>28</b>	H <sub>2</sub> O/ACO (50/50%), O <sub>2</sub> 16 bar, 175°C, 120 min	86,11	8,7	1,62	81,32±2,26
<b>10</b>	H <sub>2</sub> O/EtOH (50/50%), O <sub>2</sub> 12 bar, 175°C, 60 min	71,6	17,98	6,36	80,01±0,00
<b>25</b>	H <sub>2</sub> O/EtOH (50/50%), O <sub>2</sub> 16 bar, 175°C, 60 min	81,28	13,99	2,69	107,10±0,00
<b>Untreated</b>	-	39,42	20,26	22,65	12,85±0,67



Εικόνα 3.22. Συγκέντρωση γαλακτικού οξέος που παράγεται κατά τη διεργασία SSF από το *Lactobacillus delbrueckii*, σε 9% w/v αρχική συγκέντρωση στερεού προκατεργασμένου και ακατέργαστου υποστρώματος οξιάς (DM), 9 mg/g ενζυμικό φορτίο, θερμοκρασία 44°C και pH=5.0. Για σύγκριση αναπαρίσταται και η παραγωγή γαλακτικού οξέος από ακατέργαστο πεύκο (Untreated).

Στην Εικόνα 3.22 αναπαρίσταται η συγκέντρωση του παραγόμενου γαλακτικού οξέος από τα γαλακτικά βακτήρια σε συνάρτηση με τον χρόνο της επώασης για τα διάφορα επιλεγμένα υποστρώματα οξιάς. Όπως είναι φανερό, αυτή δείχνει να αυξάνεται σε όλες τις καλλιέργειες που χρησιμοποιούνται σάκχαρα από προκατεργασμένη οξιά όσο προχωράει η διεργασία SSF.

Για τις πρώτες 48 ώρες ο ρυθμός παραγωγής γαλακτικού οξέος είναι μέγιστος για όλες τις καλλιέργειες σε σάκχαρα προκατεργασμένης οξιάς, ενώ ακολουθείται από πιο ήπια παραγωγή μέχρι το τέλος της επώασης. Ανάμεσα στις βιομάζες που

χρησιμοποιήθηκαν, ξεχωρίζει η 23, και ακολουθούν οι 25, 28 και 10 λόγω των υψηλών συγκεντρώσεων γαλακτικού οξέος που παράγονται με ανάπτυξη στα σάκχαρα τους. Λιγότερο αποτελεσματικά υποστρώματα αποτελούν οι 7 και 13, σημειώνοντας τις χαμηλότερες παραγωγές γαλακτικού οξέος.

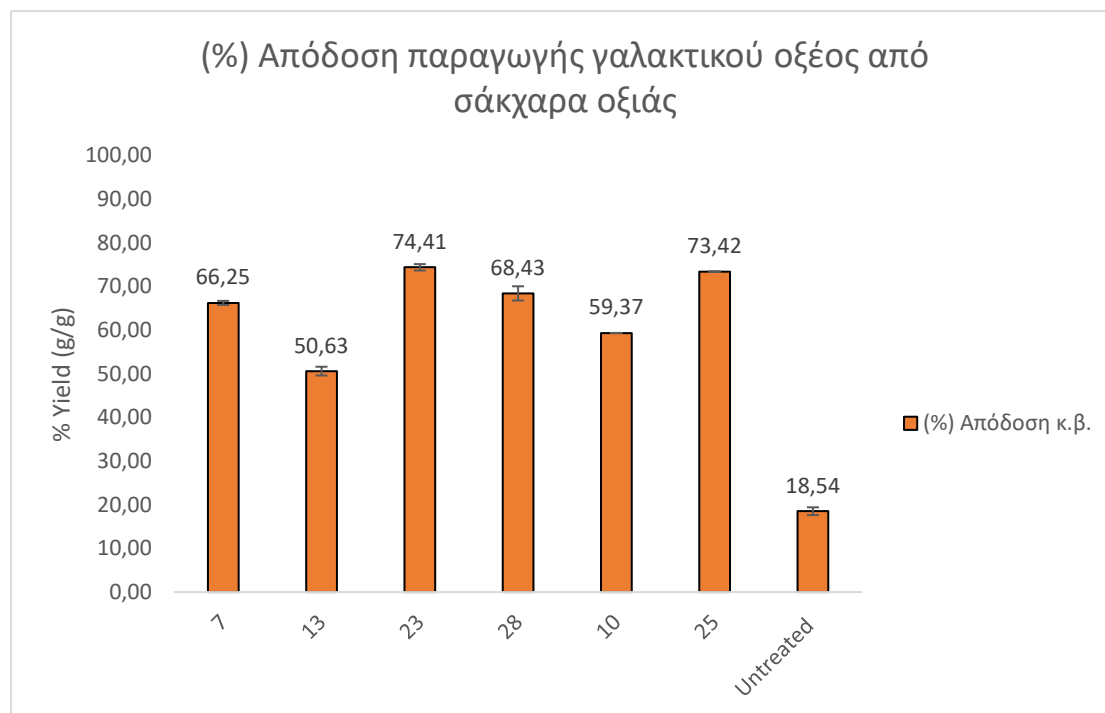
Για την καλλιέργεια ελέγχου, η παραγωγή γαλακτικού οξέος είναι στάσιμη, με μικρές αυξομειώσεις να παρατηρούνται γύρω από την τιμή 10 g/L. Η παραγωγή αυτή είναι σαφώς πολύ μικρότερη από αυτή που επιτυγχάνουν οι υπόλοιπες καλλιέργειες, καθιστώντας φανερή την αδυναμία ανάπτυξης του μικροοργανισμού, και συνεπώς, παραγωγής του επιθυμητού προϊόντος, σε βιομάζα που δεν έχει υποστεί προκατεργασία.

Πίνακας 3.4 Παραγωγή γαλακτικού οξέος με συγκέντρωση στερεών 9% (w/v) DM, 9 mg/g ενζυμικό φορτίο μετά από 168 ώρες από τα καλύτερα υποστρώματα οξιάς.

Βιομάζα (#)	Μέθοδος Προκατεργασίας	Συγκέντρωση γαλακτικού οξέος (g/L)	mg γαλακτικού οξέος/g βιομάζας	mg γαλακτικού οξέος/g κυτταρίνης	%Απόδοση (g/g)
7	H <sub>2</sub> O/ACO (50/50%), O <sub>2</sub> 16 bar, 150°C, 120 min	43,77	486	759	66,25
13	H <sub>2</sub> O/THF (50/50%), O <sub>2</sub> 8 bar, 150°C, 120 min	29,55	328	580	50,63
23	H <sub>2</sub> O/ACO (50/50%), O <sub>2</sub> 16 bar, 175°C, 60 min	63,49	705	826	74,41
28	H <sub>2</sub> O/ACO (50/50%), O <sub>2</sub> 16 bar, 175°C, 120 min	58,87	654	760	68,43
10	H <sub>2</sub> O/EtOH (50/50%), O <sub>2</sub> 12 bar, 175°C, 60 min	44,08	490	684	59,37
25	H <sub>2</sub> O/EtOH (50/50%), O <sub>2</sub> 16 bar, 175°C, 60 min	60,9	677	833	73,42
Untreated	-	7,3	81	206	18,54

Ο Πίνακας 3.4 περιλαμβάνει τα αποτελέσματα που προέκυψαν για κάθε διεργασία SSF διαφορετικής προκατεργασίας υποστρώματος ύστερα από κατάλληλους υπολογισμούς. Όπως επισημάνθηκε και προηγούμενος, στο πέρας των 168 ωρών υψηλότερη συγκέντρωση γαλακτικού επιτυγχάνεται με ανάπτυξη σε σάκχαρα της βιομάζας 23, ακολουθούμενη από τις 25, 28 και 10. Δεδομένου ότι σε κάθε καλλιέργεια προστίθεται η ίδια ποσότητα στερεού υποστρώματος (9% w/v DM) μεγαλύτερη αποδοτικότητα ως προς την παραγωγή γαλακτικού οξέος έχει η καλλιέργεια 23, με ικανότητα να παράγει 0.705 g γαλακτικού οξέος ανά g υποστρώματος. Με κοντινό «δυναμικό» ακολουθεί η καλλιέργεια 25, και μετά η 28. Ωστόσο, σημαντική

παράμετρο αποτελεί και η ικανότητα παραγωγής γαλακτικού οξέος ανά g κυτταρίνης, η οποία βρίσκεται σε διαφορετικές περιεκτικότητες σε κάθε προκατεργασμένη βιομάζα. Υψηλότερη τιμή σημειώνουν οι 23 και 25 με παραγωγές της τάξης του 0,83 g γαλακτικού οξέος ανά g κυτταρίνης. Ακολουθούν οι καλλιέργειες 7 και 28, με 0,76 g γαλακτικού ανά g. Αξίζει να σημειωθεί ότι σε όλες τις καλλιέργειες με προκατεργασμένη οξιά σημειώνονται παραγωγές γαλακτικού υψηλότερες από 0,58 g ανά g περιεχόμενης κυτταρίνης.



Εικόνα 3.23. Ποσοστιαία απόδοση γαλακτικού οξέος (g/g) για τις διάφορες καλλιέργειες *L.delbrueckii* που χρησιμοποιήθηκαν ως υποστρώματα δείγματα οξιάς. Κάθε καλλιέργεια αναπαρίσταται με τον αντίστοιχο αριθμό του χρησιμοποιούμενου δείγματος οξιάς, ο οποίος αναγράφεται στον οριζόντιο άξονα.

Στην εικόνα Εικόνα 3.23 αναπαρίσταται η απόδοση σε γαλακτικό οξύ για κάθε καλλιέργεια του μικροοργανισμού με διαφορετική βιομάζα οξιάς. Τα υποστρώματα που οδηγούν στις υψηλότερες αποδόσεις παραγωγής γαλακτικού οξέος είναι το 23 και 25, με αποδόσεις που ξεπερνούν το 70% κ.β. Ως εκ τούτου, η προκατεργασία με διαλύτη αιθανόλη ή ακετόνη σε πίεση O<sub>2</sub> 16 bar, θερμοκρασία 175°C και για λιγότερο χρόνο κρίνεται περισσότερο αποτελεσματική για οξιά που πρόκειται να χρησιμοποιηθεί σε ζυμώσεις προς παραγωγή γαλακτικού οξέος.

Συγκρίνοντας τις βιομάζες 23 και 28, οι οποίες έχουν προκατεργαστεί με τον ίδιο διαλύτη (ACO), σε ίδιες συνθήκες πίεσης και θερμοκρασίας αλλά για διαφορετικό χρόνο (60 και 120 min αντίστοιχα), προκύπτει ότι οι μικρότεροι χρόνοι προκατεργασίας οδηγούν σε υποστρώματα με υψηλότερες αποδόσεις παραγωγής γαλακτικού οξέος. Ωστόσο αξίζει να σημειωθεί ότι τα δύο υποστρώματα παρουσιάζουν ίδια υδρολυσιμότητα. Αυτό πιθανότατα οφείλεται στο ότι οι μεγαλύτεροι χρόνοι οδηγούν σε περισσότερα προϊόντα αποικοδόμησης της βιομάζας που δρουν παρεμποδιστικά στη ζύμωση.

Συγκρίνοντας τις βιομάζες 7 και 28, οι οποίες έχουν προκατεργαστεί με τον ίδιο διαλύτη (ACO), σε ίδιες συνθήκες πίεσης και χρόνου αλλά διαφορετική θερμοκρασία (150°C και 175°C αντίστοιχα) διαπιστώνεται ότι δεν παρουσιάζεται ιδιαίτερη διαφορά ως προς την απόδοση της παραγωγής γαλακτικού οξέος, παρ' όλο που το υπόστρωμα 28 είναι πιο ευκόλως υδρολύσιμο (Πίνακας 3.3). Αυτό ίσως οφείλεται στους παρεμποδιστές που παράγονται κατά τις υψηλότερες θερμοκρασίες που αναστέλλουν την κυτταρική ανάπτυξη και ζύμωση.

Συγκρίνοντας τις βιομάζες 10 και 25, οι οποίες έχουν προκατεργαστεί με τον ίδιο διαλύτη (EtOH), σε ίδιες συνθήκες θερμοκρασίας και χρόνου αλλά σε διαφορετική πίεση (12 και 16 bar αντίστοιχα) παρατηρείται ότι η πίεση επηρεάζει κατά πολύ την απόδοση της παραγωγής του γαλακτικού οξέος. Μάλιστα, οι υψηλότερες πιέσεις οδηγούν σε πιο αποδοτικά υποστρώματα για SSF διεργασία προς παραγωγή γαλακτικού οξέος.

Τέλος, η προκατεργασία σε διαλύτη τετραϋδροφουράνιο, σε χαμηλή πίεση και θερμοκρασία και υψηλούς χρόνους (βιομάζα 13) κρίνεται ως η λιγότερη αποτελεσματική προκατεργασία για υποστρώματα προς παραγωγή γαλακτικού οξέος, με απόδοση που ξεπερνά ελαφρώς το 50% κ.β.

Αξίζει να σημειωθεί, επίσης, ότι η ακατέργαστη οξιά αποτελεί αναποτελεσματική πηγή σακχάρων για την παραγωγή γαλακτικού οξέος αφού επιφέρει χαμηλές συγκεντρώσεις γαλακτικού οξέος και παρουσιάζει υποτετραπλάσια απόδοση από εκείνη του καλύτερου υποστρώματος. Ως εκ τούτου, η προκατεργασία βελτιώνει κατά πολύ την απόδοση παραγωγής γαλακτικού οξέος από λιγνοκυτταρινούχα υλικά.

### **3.2.2 Παραγωγή γαλακτικού οξέος από σάκχαρα προερχόμενα από πεύκο**

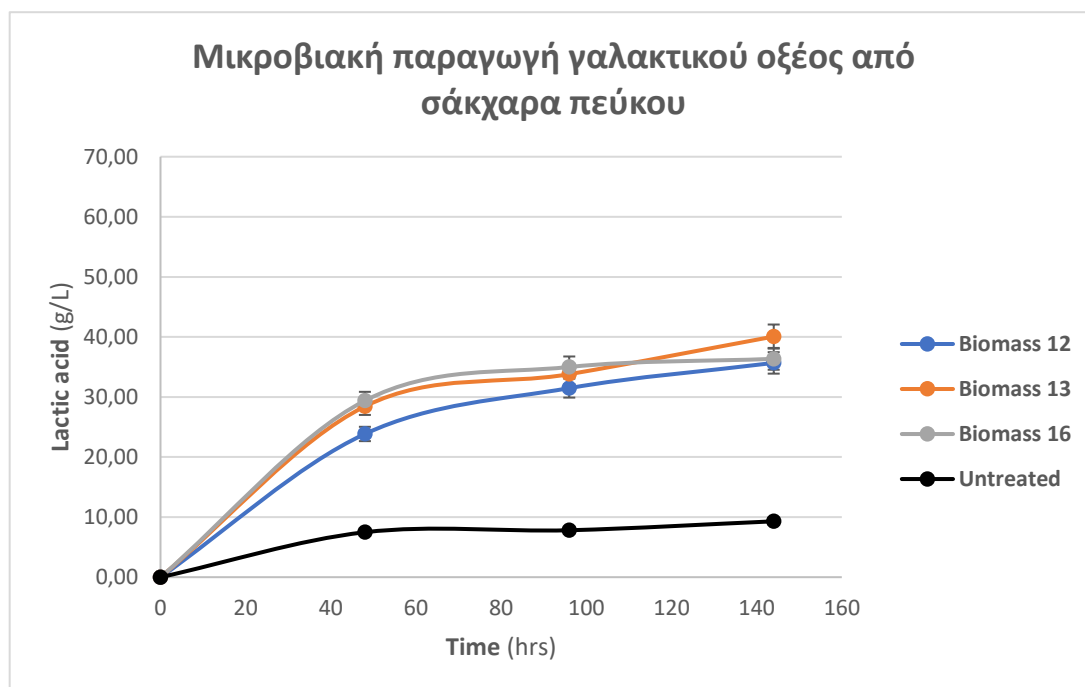
Οι πούλπες πεύκου που χρησιμοποιήθηκαν ως υποστρώματα για τις ζυμώσεις από γαλακτικά βακτήρια περιλάμβαναν τα δείγματα 12, 13, 16 που σαφώς παρουσίασαν την καλύτερη υδρολυσιμότητα, σύμφωνα με την Παράγραφο 3.1.2. Για καθένα από τα υποστρώματα αυτά πραγματοποιήθηκαν διπλές καλλιέργειες *L. delbrueckii*, υπό τις συνθήκες που περιεγράφηκαν στην παράγραφο 2.2.2.1 του κεφαλαίου ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ. Για την καλλιέργεια ελέγχου πραγματοποιήθηκε ανάπτυξη του μικροοργανισμού σε ακατέργαστο δείγμα πεύκου.

Για λόγους ευκολίας, από εδώ και ως το εξής, οι καλλιέργειες θα αναφέρονται με τον αριθμό (#) της αντίστοιχης βιομάζας που χρησιμοποιήθηκε ως υπόστρωμα για την μικροβιακή παραγωγή γαλακτικού οξέος.



Πίνακας 3.5 Δείγματα πεύκου που χρησιμοποιήθηκαν ως πηγές σακχάρων για τις SSF καλλιέργειες παραγωγής γαλακτικού οξέος από *L.delbrueckii*. Τα δείγματα 12,13 και 16 αφορούν τα καλύτερα υποστρώματα πεύκου της τωρινής μελέτης. ACO: Ακετόνη, EtOH: Αιθανόλη, THF: Τετραϋδροφουράνιο, Untreated: Ακατέργαστο δείγμα πεύκου

Δείγμα Πεύκου (#)	Μέθοδος Προκατεργασίας	%Κυτταρίνη	%Ημικυτταρίνη	%Λιγνίνη
12	H <sub>2</sub> O/EtOH (50/50%), O <sub>2</sub> 16 bar, 175°C, 60 min	77,6	13,23	7,18
13	H <sub>2</sub> O/ACO (50/50%), O <sub>2</sub> 16 bar, 175°C, 60 min	82,75	10,13	4,23
16	H <sub>2</sub> O/EtOH (50/50%), O <sub>2</sub> 16 bar, 175°C, 120 min	79,57	9,74	6,38
Untreated	-	40,00	18,4	29,51



Εικόνα 3.24. Συγκέντρωση γαλακτικού οξέος που παράγεται κατά τη διεργασία SSF από το *Lactobacillus delbrueckii*, σε 9% αρχική συγκέντρωση στερεού προκατεργασμένου υποστρώματος πεύκου (DM), 9 mg/g ενζυμικό φορτίο, θερμοκρασία 44°C και pH=5.0. Για σύγκριση αναπαρίσταται και η παραγωγή γαλακτικού οξέος από ακατέργαστο πεύκο (Untreated).

Στην Εικόνα 3.24 αναπαρίσταται η συγκέντρωση του παραγόμενου γαλακτικού οξέος από την αναερόβια ζύμωση γαλακτικού βακτηρίου σε συνάρτηση με τον χρόνο, με πηγή άνθρακα τα υποστρώματα πεύκου που επιλέχθηκαν. Όπως είναι φανερό, αυτή δείχνει να αυξάνεται για όλες τις καλλιέργειες με προκατεργασμένη βιομάζα, όσο προχωράει η διεργασία SSF. Εξάιρεση αποτελεί η καλλιέργεια ελέγχου, όπου όπως και

στην προηγούμενη περίπτωση με την οξιά, η παραγωγή παραμένει σχεδόν σταθερή στα 10 g/L γαλακτικού καθ' όλη τη διάρκεια της διεργασίας.

Όπως και στην περίπτωση της οξιάς, για τις πρώτες 48 ώρες ο ρυθμός παραγωγής γαλακτικού οξέος είναι μέγιστος για όλες τις καλλιέργειες σε σάκχαρο προκατεργασμένου πεύκου. Στη συνέχεια παρουσιάζεται πιο ήπια παραγωγή μέχρι το τέλος της επώασης. Και για τα τρία υποστρώματα πεύκου, οι παραγόμενες συγκεντρώσεις γαλακτικού οξέος είναι παραπλήσιες, με ελαφρώς υψηλότερη να είναι της βιομάζας 13.

Άξιο παρατήρησης είναι ότι οι συγκεντρώσεις που επιτυγχάνονται με προκατεργασμένη βιομάζα μπορούν να φτάνουν και σε πενταπλάσιες τιμές από αυτήν που επιτυγχάνεται με ακατέργαστη.

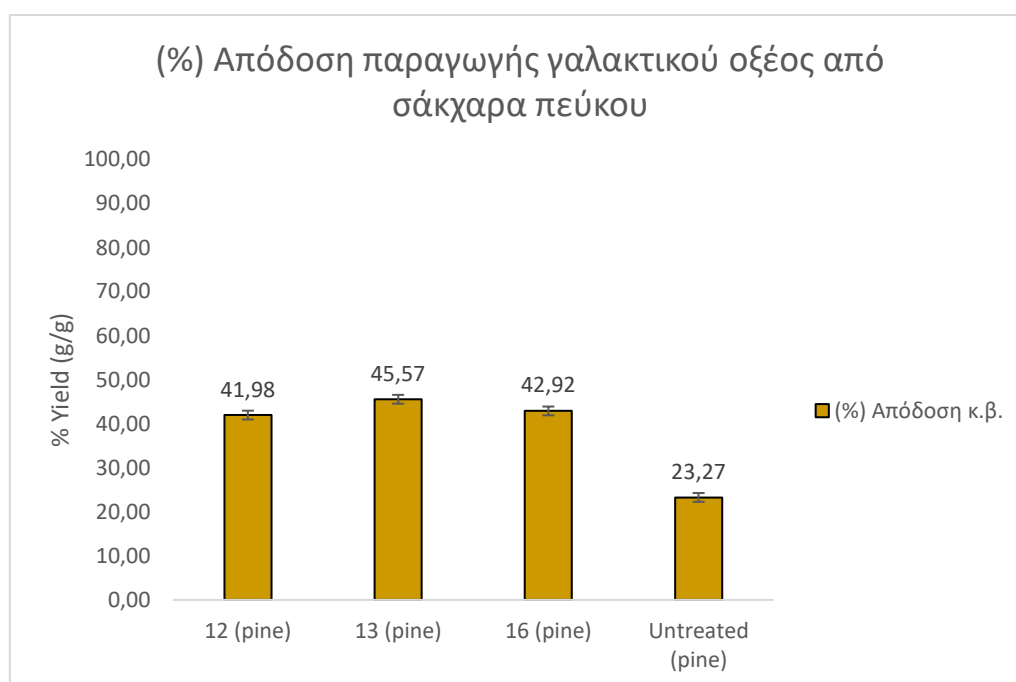
Πίνακας 3.6 Παραγωγή γαλακτικού οξέος με συγκέντρωση στερεών 9% (w/v) DM, 9 mg/g ενζυμικό φορτίο μετά από 168 ώρες από τα καλύτερα υποστρώματα πεύκου. Στον ίδιο πίνακα παρατίθενται και τα αποτελέσματα καλλιέργειας σε σάκχαρο ακατέργαστου δείγματος πεύκου.

Βιομάζα (#)	Μέθοδος Προκατεργασίας	Συγκέντρωση γαλακτικού οξέος (g/L)	mg γαλακτικού οξέος/g βιομάζας	mg γαλακτικού οξέος/g κυτταρίνης	%Απόδοση (g/g)
12	H <sub>2</sub> O/EtOH (50/50%), O <sub>2</sub> 16 bar, 175°C, 60 min	35,67	396	511	41,98
13	H <sub>2</sub> O/ACO (50/50%), O <sub>2</sub> 16 bar, 175°C, 60 min	40,06	445	538	45,57
16	H <sub>2</sub> O/EtOH (50/50%), O <sub>2</sub> 16 bar, 175°C, 120 min	36,35	404	508	42,92
Untreated	-	9,3	103	258	23,27

Στον Πίνακα 3.6 παρουσιάζονται τα αποτελέσματα που προέκυψαν για κάθε διεργασία SSF διαφορετικής προκατεργασίας υποστρώματος ύστερα από κατάλληλους υπολογισμούς. Όπως επισημάνθηκε και προηγουμένως, στο πέρας των 168 ωρών υψηλότερη συγκέντρωση γαλακτικού επιτυγχάνεται στην καλλιέργεια 13, με παραγωγή 40,06 g/L.

Δεδομένου ότι σε κάθε καλλιέργεια προστίθεται η ίδια ποσότητα στερεού υποστρώματος (9% DM) μεγαλύτερη αποδοτικότητα ως προς την παραγωγή γαλακτικού οξέος έχει η καλλιέργεια 13, με ικανότητα να παράγει 0,445 g γαλακτικού οξέος ανά g βιομάζας. Έπειτα, ακολουθούν η 12 και 16, με παραπλήσιο «δυναμικό» της τάξης του 0,4 g ανά g βιομάζας. Ωστόσο, σημαντική παράμετρο αποτελεί και η ικανότητα παραγωγής γαλακτικού οξέος ανά g κυτταρίνης, η οποία βρίσκεται σε διαφορετικές περιεκτικότητες σε κάθε προκατεργασμένη βιομάζα. Από τις καλλιέργειες πεύκου, υψηλότερη τιμή σημειώνει και εδώ η καλλιέργεια 13, στην οποία παράγονται πάνω από 0,538 g γαλακτικού οξέος ανά g. Αξίζει να σημειωθεί ότι σε όλες τις καλλιέργειες με προκατεργασμένο πεύκο σημειώνονται παραγωγές γαλακτικού που

ξεπερνούν τα 0.5 g ανά g περιεχόμενης κυτταρίνης, και είναι αρκετά χαμηλότερες από αυτές της οξιάς.



Εικόνα 3.25. Ποσοστιαία απόδοση γαλακτικού οξέος (g/g) για τις διάφορες καλλιέργειες *L.delbrueckii* που χρησιμοποιήθηκαν ως υποστρώματα δείγματα πεύκου. Κάθε καλλιέργεια αναπαρίσταται με τον αντίστοιχο αριθμό του χρησιμοποιούμενου δείγματος, ο οποίος αναγράφεται στον οριζόντιο άξονα.

Στην εικόνα Εικόνα 3.25 αναπαρίσταται η απόδοση σε γαλακτικό οξύ για κάθε καλλιέργεια του μικροοργανισμού με διαφορετική βιομάζα πεύκου. Όπως είναι φανερό, τα σάκχαρα που προέρχονται από τη βιομάζα 13 οδηγούν στην υψηλότερη απόδοση γαλακτικού οξέος, με τιμή 45,57 % κ.β. Με μικρή διαφορά ακολουθούν οι αποδόσεις των σακχάρων που προέρχονται από τη βιομάζα 12 και 16. Συγκρίνοντας τα δείγματα 12 και 13, η προκατεργασία με διαλύτη ακετόνη, στις ίδιες συνθήκες πίεσης και θερμοκρασίας οδηγεί σε ελαφρώς πιο αποτελεσματική ζύμωση, απ' ότι η προκατεργασία με αιθανόλη. Αυτό ίσως οφείλεται στα υψηλότερα κλάσματα κυτταρίνης που λαμβάνονται με προκατεργασία με ακετόνη (82,75% έναντι του 77,6% που λαμβάνεται με αιθανόλη), αλλά και στην καλύτερη απομάκρυνση ημικυτταρίνης και λιγνίνης που επιτυγχάνεται με χρήση ακετόνης, που οδηγούν σε αποτελεσματική σακχαροποίηση και λιγότερους παρεμποδιστές και ως εκ τούτου, υψηλότερη παραγωγή γαλακτικού οξέος.

Επίσης, συγκρίνοντας τη βιομάζα 12 και 16, προκύπτει ότι οι μεγαλύτεροι χρόνοι προκατεργασίας όταν χρησιμοποιείται διαλύτης αιθανόλη, σε πίεση 16 bar, και θερμοκρασία 175°C δεν επιφέρει κάποια ιδιαίτερη διαφορά ως προς την απόδοση παραγωγής γαλακτικού οξέος. Αυτό ίσως οφείλεται στα παραπλήσια ποσοστά κυτταρίνης που περιλαμβάνουν οι δύο βιομάζες (βιομάζα 12: 77,6% κ.β., βιομάζα 16

79,57% κ.β.) που έχει ως αποτέλεσμα παρόμοια συμπεριφορά ως προς τη ζύμωση των σακχάρων.

Αξιοσημείωτη είναι η διαφορά που σημειώνουν και εδώ οι καλλιέργειες με προκατεργασμένη βιομάζα σε σχέση με την καλλιέργεια ελέγχου, όπου χρησιμοποιείται ακατέργαστο υλικό. Η απόδοση στην εν λόγω καλλιέργεια είναι αρκετά χαμηλή και δεν ξεπερνάει το 25% κ.β. Η τιμή αυτή είναι χαμηλότερη από το υποδιπλάσιο της μέγιστης απόδοσης που σημειώνεται στην εν λόγω διεργασία.

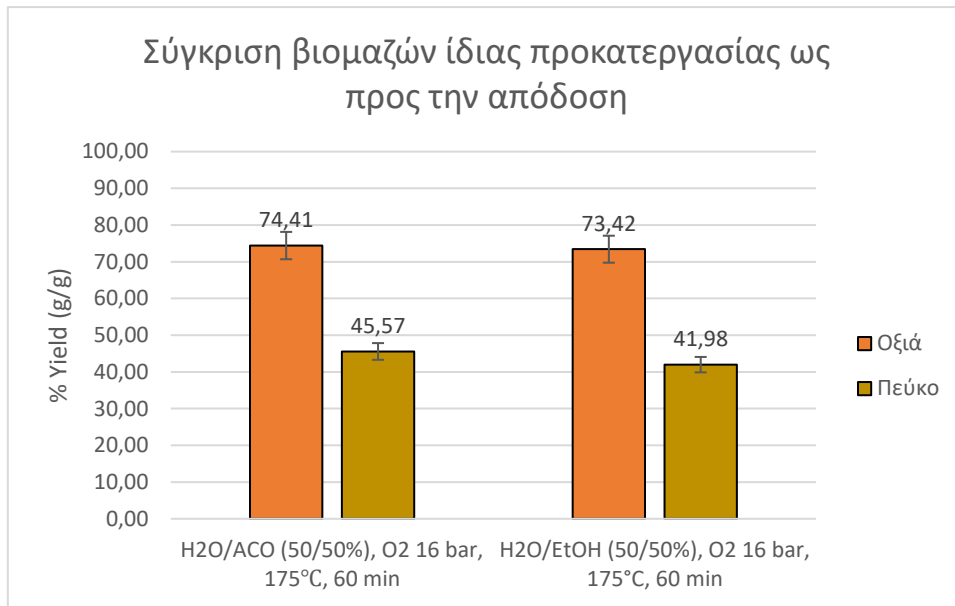
Σαν γενική εικόνα, η χρήση σακχάρων προερχόμενων από πεύκο για διεργασία SSF παραγωγής γαλακτικού οξέος μπορεί να οδηγήσει σε αποδόσεις της τάξης του 40-45% κ.β.

### 3.2.3 Σύγκριση της απόδοσης από σάκχαρα οξιάς και πεύκου με την ίδια προκατεργασία

Στο σημείο αυτό, κρίνεται σκόπιμη η σύγκριση ως προς την απόδοση γαλακτικού οξέος για τα υποστρώματα οξιάς και πεύκου που έχουν προκατεργαστεί με την ίδια μέθοδο και χρησιμοποιήθηκαν ως στερεές τροφοδοσίες στις διεργασίες SSF.

Πίνακας 3.7 Σύγκριση της απόδοσης γαλακτικού οξέος σε διεργασίες SSF όταν ως πηγή άνθρακα χρησιμοποιούνται στερεές πούλπες οξιάς και πεύκου ίδιας προκατεργασίας.

Μέθοδος προκατεργασίας	% Κυτταρίνη		% Απόδοση (κ.β.)	
	Οξιά	Πεύκο	Οξιά	Πεύκο
<i>H<sub>2</sub>O/EtOH (50/50%), O<sub>2</sub> 16 bar, 175°C, 60 min</i>	81,28	77,6	73,42	41,98
<i>H<sub>2</sub>O/ACO (50/50%), O<sub>2</sub> 16 bar, 175°C, 60 min</i>	85,41	82,75	74,41	45,57



Εικόνα 3.26. Ποσοστιαία απόδοση γαλακτικού οξέος (g/g) για τις καλλιέργειες *L.delbrueckii* που χρησιμοποιήθηκαν ως υποστρώματα δείγματα οξιάς και πεύκου ίδιας προκατεργασίας.

Παρατηρείται ότι για την ίδια μέθοδο προκατεργασίας σε ξύλο οξιάς και πεύκου, τα αποτελέσματα ως προς την απόδοση της παραγωγής γαλακτικού οξέος δεν είναι ίδια. Συγκεκριμένα, για προκατεργασία βιομάζας με αιθανόλη και ακετόνη σε συνθήκες πίεσης 16 bar, θερμοκρασίας 175 °C και χρόνου 60 λεπτών, οι αποδόσεις που σημειώνονται με χρήση σακχάρων οξιάς είναι κατά πολύ υψηλότερες από τις αντίστοιχες του πεύκου. Ως εκ τούτου, πιο αποτελεσματικό υπόστρωμα για την παραγωγή γαλακτικού οξέος κρίνεται η οξιά.

### 3.3 ΠΑΡΑΓΩΓΗ Ω-3 ΛΙΠΑΡΩΝ ΟΞΕΩΝ ΑΠΟ *CRYPTHESODINIUM COHNII* ΜΕ ΔΙΕΡΓΑΣΙΑ SHF

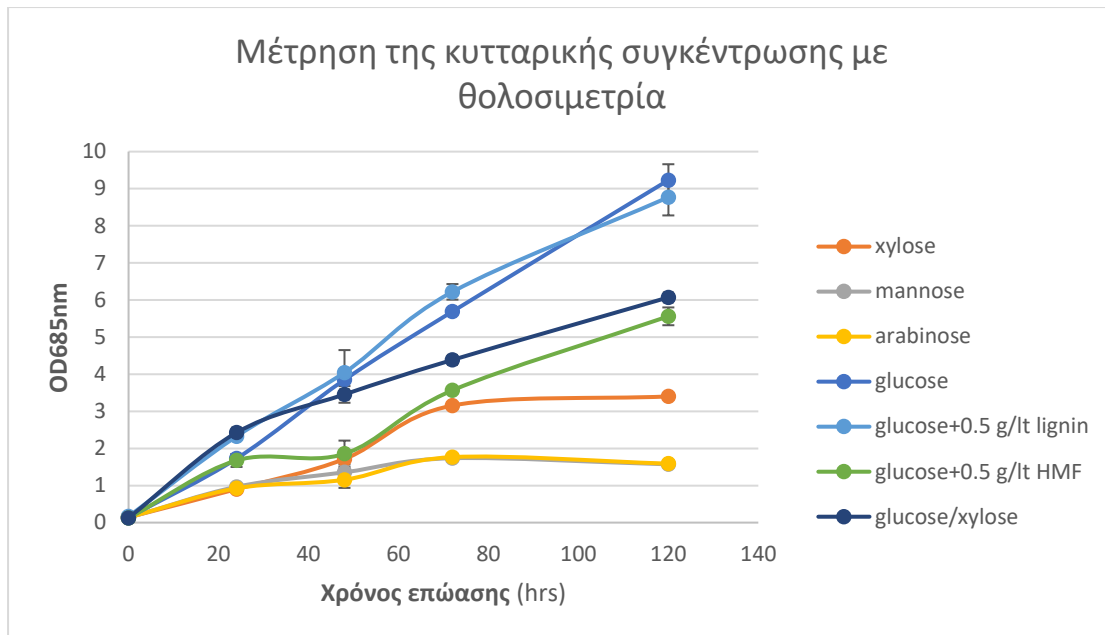
Για την SHF διεργασία παραγωγής ω-3 λιπαρών οξέων από μικροφύκη, ως πηγές σακχάρων χρησιμοποιήθηκαν υδρολύματα από τα καλύτερα υποστρώματα οξιάς και πεύκου. Ακόμη, εξετάστηκε η ικανότητα παραγωγής σε καθαρά σάκχαρα, καθώς και παρουσία άλλων ουσιών που επιδρούν στον μεταβολισμό του μικροφύκου. Για τις καλλιέργειες με υδρολύματα βιομαζών, ως καλλιέργεια «ελέγχου» ορίστηκε η καλλιέργεια που αναπτύχθηκε σε υδρόλυμα ακατέργαστης βιομάζας, αντίστοιχα πεύκου ή οξιάς, αλλά και η καλλιέργεια σε καθαρή γλυκόζη.

#### 3.3.1 Καλλιέργειες για παραγωγή ω-3 λιπαρών οξέων με χρήση καθαρών σακχάρων

Στη μελέτη αυτή, έγινε καλλιέργεια του μικροφύκου σε εμπορικά σάκχαρα γλυκόζη, ξυλόζη, μαννόζη και αραβινόζη. Μελετήθηκε, επίσης, η ικανότητα ανάπτυξης του μικροοργανισμού παρουσίας γλυκόζης – ξυλόζης σε αναλογία 1:1 στο υγρό της καλλιέργειας αλλά και παρουσίας λιγνίνης σε συγκέντρωση 0,5 g/L, με πηγή άνθρακα γλυκόζη στη γνωστή συγκέντρωση. Για τη μελέτη της επίδρασης των παρεμποδιστών στην ανάπτυξη του μικροφύκου, έγιναν καλλιέργειες γλυκόζης στη γνωστή συγκέντρωση με προσθήκη HMF σε τελική συγκέντρωση 0.5 g/L στο υγρό της καλλιέργειας.

##### 3.3.1.1 *Μέτρηση της κυτταρικής συγκέντρωσης*

Η ικανότητα ανάπτυξης του μικροφύκου στα παραπάνω υποστρώματα εξετάστηκε με θολοσιμετρία, όπως περιγράφεται στην Παράγραφο 2.2.3.2.2 του κεφαλαίου ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ.



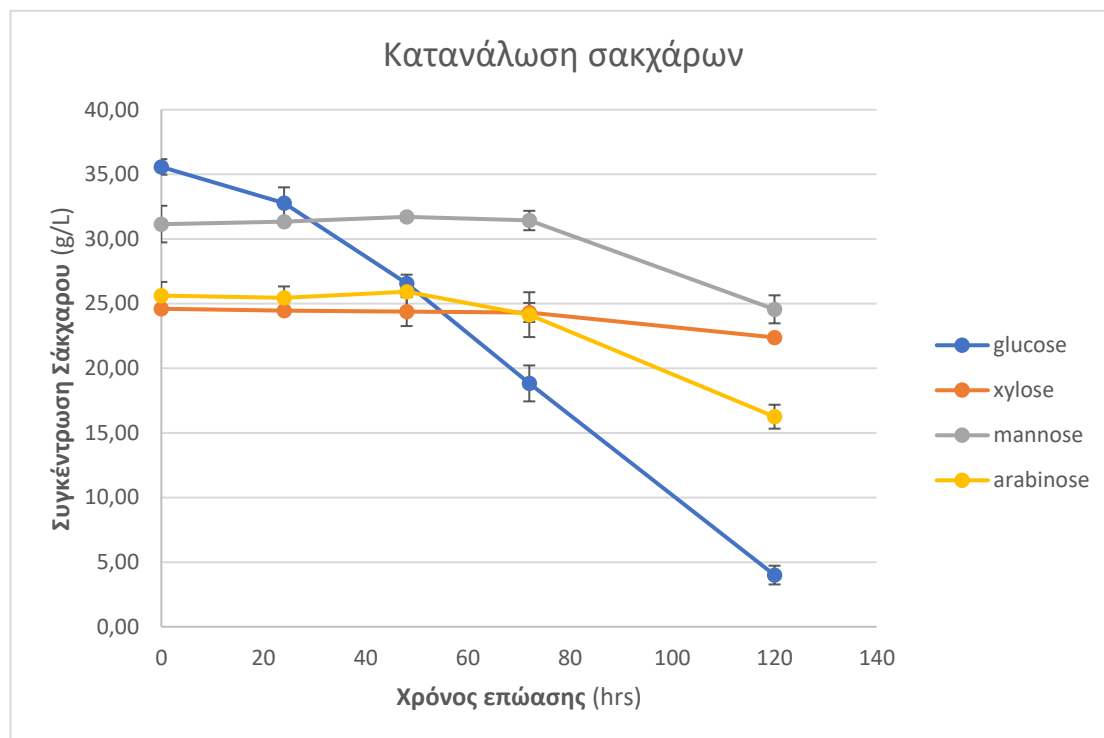
Εικόνα 3.27. Κυτταρική ανάπτυξη του μικροφύκου *C. cohnii* σε διαφορετικά υποστρώματα καθαρών σακχάρων (γλυκόζη, ξυλόζη, μαννόζη, αραβινόζη, γλυκόζη-ξυλόζη) και παρουσίας άλλων ουσιών (λιγνίνη, HMF).

Στην Εικόνα 3.27 παρουσιάζεται η κυτταρική συγκέντρωση του μικροφύκου για τις 120 ώρες επώασης σε καλλιέργειες με καθαρά σάκχαρα (γλυκόζη, ξυλόζη, μαννόζη, αραβινόζη, γλυκόζη-ξυλόζη 1:1) και καλλιέργειες γλυκόζης παρουσία άλλων ουσιών (λιγνίνη, HMF). Όπως είναι φανερό, μεγαλύτερη ικανότητα ανάπτυξης παρουσιάζεται σε σάκχαρο γλυκόζη, καθώς και σε γλυκόζη παρουσίας λιγνίνης. Κάτι τέτοιο οδηγεί στη σκέψη ότι η λιγνίνη δεν αποτελεί παρεμποδιστικό παράγοντα για την ανάπτυξη του μικροφύκου και ότι μπορεί εξίσου αποτελεσματικά να μεγαλώνει σε υποστρώματα τέτοιου είδους. Μάλιστα, για τις 72 ώρες, το μικροφύκος παρουσιάζει μέγιστη ανάπτυξη στην καλλιέργεια γλυκόζης παρουσία λιγνίνης. Η ανάπτυξη σε γλυκόζη-ξυλόζη, σε αναλογία 1:1, είναι λιγότερη αποτελεσματική από της καθαρής γλυκόζης, οδηγώντας στο συμπέρασμα ότι όταν η ξυλόζη βρίσκεται σε ίση ποσότητα με τη γλυκόζη στο μέσο της καλλιέργειας δρα παρεμποδιστικά στην ανάπτυξη του μικροοργανισμού. Ωστόσο, είναι υψηλότερη της ανάπτυξης σε καθαρή ξυλόζη. Η ανάπτυξη σε γλυκόζη παρουσία HMF είναι λιγότερο αποτελεσματική από την ανάπτυξη σε καθαρή γλυκόζη, με κυτταρικές πυκνότητες που αγγίζουν σχεδόν το ήμισυ της καθαρής γλυκόζης. Από αυτό φαίνεται ότι το HMF δρα παρεμποδιστικά στην ανάπτυξη του μικροοργανισμού. Τέλος, τις χαμηλότερες κυτταρικές πυκνότητες σημειώνουν οι καλλιέργειες με καθαρά σάκχαρα αραβινόζη και μαννόζη, υποδεικνύοντας την αδυναμία του μικροοργανισμού να μεταβολίζει τέτοιου είδους σάκχαρα.

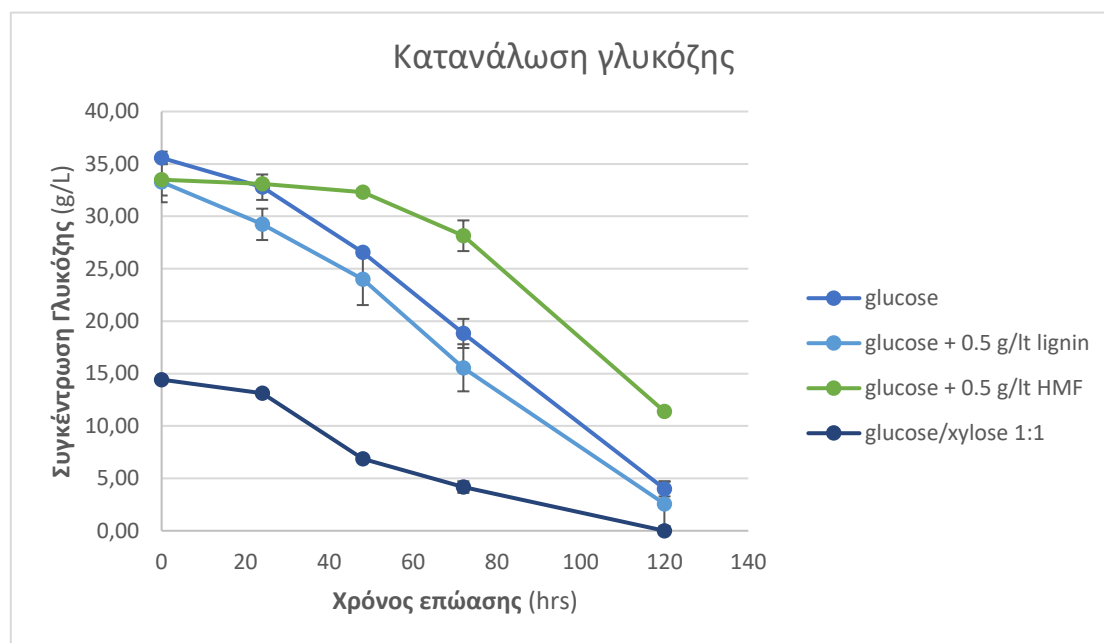
### 3.3.1.2 Μέτρηση των καταναλωθέντων σακχάρων

Η μέτρηση των καταναλωθέντων σακχάρων σε κάθε μία από τις καλλιέργειες πραγματοποιήθηκε με HPLC. Προσδιορίστηκαν τα επίπεδα γλυκόζης στις καθαρές καλλιέργειές της, στις καλλιέργειες παρουσίας ισόποσης ξυλόζης, λιγνίνης και HMF

καθώς και των υπολοίπων σακχάρων (ξυλόζη, μαννόζη, αραβινόζη) στις καθαρές καλλιέργειές τους.



Εικόνα 3.29. Κατανάλωση καθαρών σακχάρων από το μικροφύκος *C. cohnii* σε διάστημα 120 ωρών επώασης.



Εικόνα 3.28. Κατανάλωση γλυκόζης παρουσία ξυλόζης, λιγνίνης και HMF από το μικροφύκος *C. cohnii* σε διάστημα 120 ωρών επώασης

Στην Εικόνα 3.29 αναπαρίσταται η κατανάλωση γλυκόζης, ξυλόζης, μαννόζης και αραβινόζης στις αντίστοιχες καλλιέργειές τους, για τις 120 ώρες επώασης. Από αυτήν μπορεί να παρατηρηθεί ότι το μικροφύκος παρουσιάζει μία προτίμηση ως προς την



κατανάλωση γλυκόζης. Για τα σάκχαρα μαννόζη και αραβινόζη η κατανάλωση είναι αμελητέα μέχρι τις 72 ώρες. Μετά τις 72 ώρες ένα μέρος τους καταναλώνεται, ωστόσο πολύ μικρό. Χαμηλότερη προτίμηση έναντι όλων των σακχάρων παρουσιάζεται για την ξυλόζη, όπου η κατανάλωσή της είναι αμελητέα. Έτσι, φαίνεται ότι ο μικροοργανισμός δεν έχει μεγάλη ικανότητα μεταβολισμού των πεντοζών όταν αυτές αποτελούν την κύρια πηγή άνθρακα στο μέσο, δείχνοντας μεγαλύτερη προτίμηση ως προς τις εξόζες. Έτσι, η προτίμηση σε σάκχαρα είναι κατά σειρά: γλυκόζη, αραβινόζη-μαννόζη και τέλος ξυλόζη.

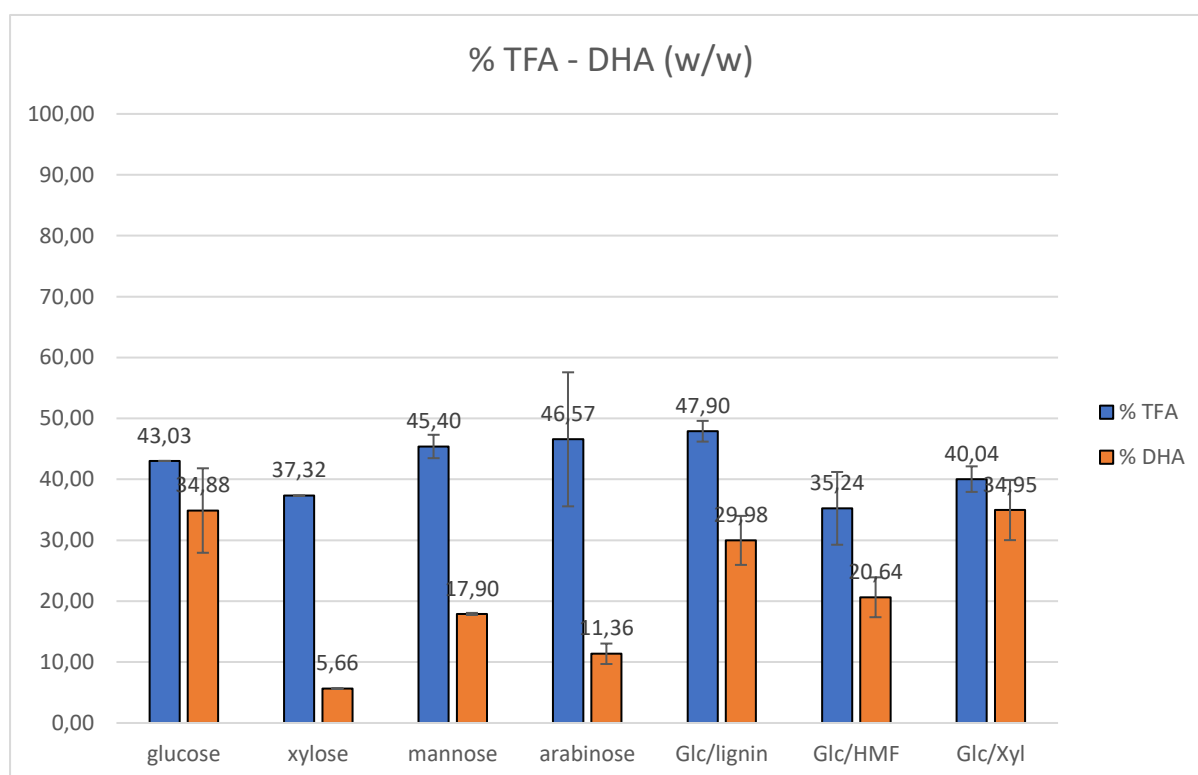
Στην Εικόνα 3.28 αναπαρίσταται η κατανάλωση γλυκόζης στις διάφορες καλλιέργειες που χρησιμοποιείται ως πηγή άνθρακα (καθαρής γλυκόζης, παρουσία ισόποσης ξυλόζης, παρουσία 0.5 g/lt λιγνίνης και αντίστοιχα HMF), Φαίνεται ότι η κατανάλωση γλυκόζης είναι πιο έντονη στις καλλιέργειες όπου αυτή συναντάται σε καθαρή μορφή, αλλά και παρουσία λιγνίνης. Το αποτέλεσμα αυτό είναι παρόμοιο με αυτό που εξήχθη από τη μελέτη της κυτταρικής ανάπτυξης που παρουσιάστηκε προηγουμένως. Κάτι τέτοιο είναι λογικό, αφού η κυτταρική ανάπτυξη συνδέεται άμεσα με τη διαθεσιμότητα του θρεπτικού υλικού. Μάλιστα ο ρυθμός κατανάλωσης της γλυκόζης είναι ο ίδιος στις δύο καλλιέργειες καθ' όλη τη διάρκεια της επώασης. Στο πέρας της επώασης, η συγκέντρωση της γλυκόζης βρίσκεται σε επίπεδα κάτω των 5 g/L και για τις δυο καλλιέργειες, με αρχικές συγκεντρώσεις περίπου 30 g/L. Η κατανάλωση γλυκόζης παρουσία ξυλόζης προχωράει με βραδύτερο ρυθμό. Συγκεκριμένα, στις 24 ώρες παρατηρείται έντονη κατανάλωση αυτής, η οποία ύστερα συνοδεύεται από ήπια κατανάλωση. Εν τέλει, αυτή καταναλώνεται πλήρως στις 120 ώρες. Η κατανάλωση γλυκόζης παρουσία HMF, με αρχική συγκέντρωση 30 g/L, είναι πολύ αργή για τις πρώτες 48 ώρες. Ωστόσο, η κατανάλωση φαίνεται να αρχίζει μετά τις 48 ώρες. Στις 72 ώρες και μέχρι το πέρας της επώασης παρουσιάζεται η μέγιστη κατανάλωση, φτάνοντας σε τελικές συγκεντρώσεις γλυκόζης που είναι υπερδιπλάσιες από αυτές της καθαρής γλυκόζης. Αυτό επιβεβαιώνει και το προηγούμενο πόρισμα της κυτταρικής ανάπτυξης ότι το HMF δρα παρεμποδιστικά στην μεταβολισμό του μικροφύκου, και άρα στην κυτταρική ανάπτυξη.

### **3.3.1.3 Παραγωγή ω-3 λιπαρών οξέων**

Μετά το πέρας της επώασης, γίνεται συλλογή της βιομάζας και απομόνωση των λιπαρών οξέων με τη διαδικασία που περιγράφεται στις Παράγραφους 2.2.3.2.4 και 2.2.3.2.5, αντίστοιχα. Η ποιοτική και ποσοτική ανάλυση των παραγόμενων λιπαρών οξέων έγινε με σε σύστημα αέριας χρωματογραφίας, με τη μέθοδο που περιγράφεται στην Παράγραφο 2.2.3.2.6. Έτσι, προσδιορίζονται η παραγόμενη βιομάζα των κυττάρων ανά λίτρο και ανά γραμμάριο καταναλωθέντων σακχάρων (γλυκόζης και ξυλόζης), το ποσοστό των κυττάρων σε ολικά λιπαρά οξέα (TFA), το περιεχόμενο DHA (%), καθώς και οι συγκεντρώσεις των δύο τελευταίων στην καλλιέργεια. Η ποιοτική και ποσοτική σύσταση των παραγόμενων λιπαρών διατίθεται σε Πίνακα του Παραρτήματος.

Πίνακας 3.8 Βιομάζα κυττάρων, καταναλωθέντα σάκχαρα, ολικά λιπαρά οξέα (TFA) και DHA που παράγονται από καλλιέργειες *C.cohnii* με καθαρά σάκχαρα και παρουσία άλλων ουσιών σε 9% DM και επώαση στους 23°C για 120 ώρες.

Σάκχαρο	Βιομάζα (g/l)	Καταναλωθέντα σάκχαρα (g/l)	mg βιομάζας/g καταναλωθέντων σακχάρων	% TFA (w/w)	TFA (g/l)	%DHA (w/w)	DHA (g/l)
Γλυκόζη	9,67	31,58	306,38	43,03	4,16	34,88	1,45
Ξυλόζη	1,40	4,50	312,00	37,32	0,52	5,66	0,03
Μαννόζη	1,23	6,60	186,79	45,40	0,56	17,90	0,10
Αραβινόζη	1,18	9,36	125,82	46,57	0,55	11,36	0,06
Γλυκόζη/Λιγνίνη	10,86	30,71	353,72	47,90	5,20	29,98	1,56
Γλυκόζη/HMF	7,08	22,12	320,20	35,24	2,50	20,64	0,52
Γλυκόζη/Ξυλόζη	4,27	14,42	296,45	40,04	1,71	34,95	0,60



Εικόνα 3.30. Ποσοστό ολικών παραγόμενων λιπαρών οξέων ως προς τη βιομάζα των κυττάρων και ποσοστό DHA ως προς τα ολικά παραγόμενα λιπαρά οξέα κατά βάρος, με καθαρά σάκχαρα ως πηγή άνθρακα.

Στον Πίνακα 3.8 παρουσιάζονται οι λαμβανόμενες βιομάζες κυττάρων *C.cohnii*, το ποσοστό αυτής σε λιπαρά οξέα καθώς και το ποσοστό των λιπαρών σε DHA. Μπορεί να παρατηρηθεί ότι με χρήση γλυκόζης ως πηγή άνθρακα παράγονται υψηλές κυτταρικές συγκεντρώσεις, που αγγίζουν σχεδόν τα 10 g/l, αλλά και ικανοποιητικές περιεκτικότητες σε λιπαρά οξέα (πάνω από 40% κ.β.). Ικανοποιητικό είναι, επίσης, το ποσοστό του DHA που αποτελεί το 35% κ.β. των ολικών λιπαρών οξέων.

Παρουσία λιγνίνης φαίνεται να ευνοείται η παραγωγή υψηλών κυτταρικών συγκεντρώσεων, που ξεπερνούν τα επίπεδα της καθαρής γλυκόζης. Επίσης, λαμβάνονται υψηλότερες περιεκτικότητες σε ολικά λιπαρά οξέα. Ωστόσο, το

περιεχόμενο DHA είναι λίγο χαμηλότερο από αυτό που παράγεται από την καθαρή γλυκόζη. Φαίνεται, λοιπόν, ότι η λιγνίνη ευνοεί την κυτταρική ανάπτυξη, οδηγώντας σε υψηλές κυτταρικές συγκεντρώσεις και ποσοστά λιπαρών, αλλά ως προς την παραγωγή DHA δεν έχει κάποια εύνοια. Πιθανότατα, πυροδοτεί την παραγωγή άλλων λιπαρών οξέων, όπως το C16 και C18:1, όπως μπορεί να παρατηρηθεί από τον Πίνακα 6.4 του Παραρτήματος.

Η ανάπτυξη σε ξυλόζη οδηγεί σε χαμηλή βιομάζα, που όμως καταλαμβάνεται από αξιόλογο ποσοστό λιπαρών. Το DHA ωστόσο αγγίζει πολύ χαμηλά ποσοστά, που είναι και τα χαμηλότερα για κάθε μελετώμενη καλλιέργεια με σάκχαρα. Ωστόσο, λαμβάνονται σημαντικές ποσότητες ενός άλλου λιπαρού οξέος, C18, που ξεπερνά το 75% κ.β. του περιεχόμενου των παραγόμενων λιπαρών οξέων. Η καλλιέργεια σε μαννόζη οδηγεί σε χαμηλές λαμβανόμενες βιομάζες, της τάξης του 1 g/l, που όμως αποτελούνται από υψηλό ποσοστό λιπαρών (45,4% κ.β.). Το περιεχόμενο DHA ωστόσο, είναι αρκετά χαμηλότερο, σε ποσοστό μικρότερο από 20% κ.β.. Ίδια συμπεριφορά ως προς την παραγωγή βιομάζας και περιεχόμενων λιπαρών παρουσιάζει και η καλλιέργεια σε αραβινόζη, με λαμβανόμενα ποσοστά DHA ακόμα πιο χαμηλά από της μαννόζης. Τα δύο τελευταία σάκχαρα φαίνεται να ευνοούν την παραγωγή άλλων λιπαρών οξέων, όπως C18 και C18:1, τα οποία λαμβάνονται σε σημαντικές ποσότητες.

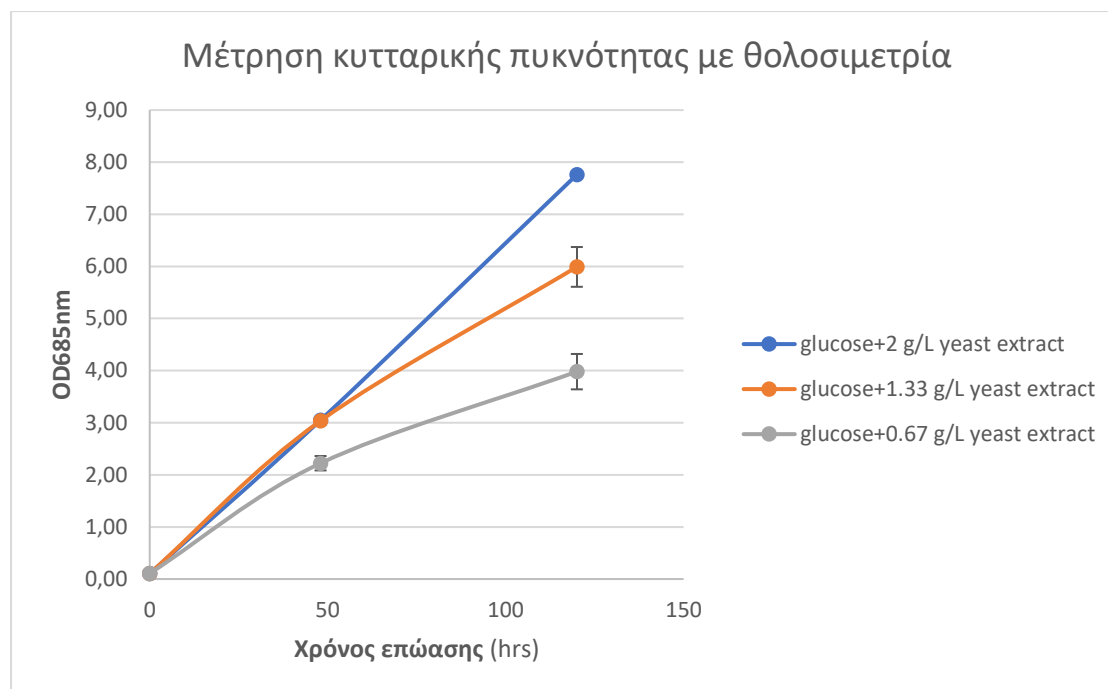
Παρουσία HMF η βιομάζα που λαμβάνεται είναι αρκετά μικρότερη από την ανάπτυξη σε καθαρή γλυκόζη, γεγονός που υποδηλώνει την ανασταλτική δράση των φουρανίων στην κυτταρική ανάπτυξη. Επίσης, οδηγεί σε παραγωγή λιπαρών κατά 18% χαμηλότερη, και παραγωγή DHA κατά 40% χαμηλότερη από της καθαρής γλυκόζης. Η παρουσία φουρανίων φαίνεται να ευνοεί την παραγωγή λιπαρών οξέων C14, αφού αυτά λαμβάνονται σε υπερδιπλάσια ποσότητα από αυτή που σημειώνεται για την καθαρή γλυκόζη (Πίνακας 6.4).

Παρουσία ίσης ποσότητας ξυλόζης σε καλλιέργεια γλυκόζης λαμβάνεται σημαντικά μικρότερη βιομάζα κυττάρων, μικρότερη από το ήμισυ της βιομάζας σε γλυκόζη, αλλά τα περιεχόμενα TFA και DHA δεν παρουσιάζουν στατιστικά σημαντική διαφορά από αυτά που επιτυγχάνονται σε καλλιέργεια μόνο με γλυκόζη. Έτσι, η ταυτόχρονη παρουσία πεντοζών και εξοζών (ξυλόζη και γλυκόζη) δεν οδηγεί σε αναστολή του καταβολισμού των μικροφυκών.

### **3.3.2 Μελέτη της ανάπτυξης και παραγωγής ω-3 λιπαρών οξέων με διαφορετικούς λόγους C/N με χρήση καθαρών σακχάρων**

Στο πείραμα αυτό, μελετήθηκε η ικανότητα ανάπτυξης και παραγωγής DHA από μικροφύκη σε διαφορετικές αναλογίες βάρους C/N. Ως πηγή άνθρακα χρησιμοποιήθηκε καθαρή πηγή γλυκόζης σε αρχική συγκέντρωση 35 g/L ενώ ως πηγή αζώτου εκχυλίσμα ζύμης (yeast extract). Εξετάστηκε η ανάπτυξη του μικροοργανισμού σε συγκεντρώσεις 2, 1.33 και 0.67 g/L εκχυλίσματος ζύμης.

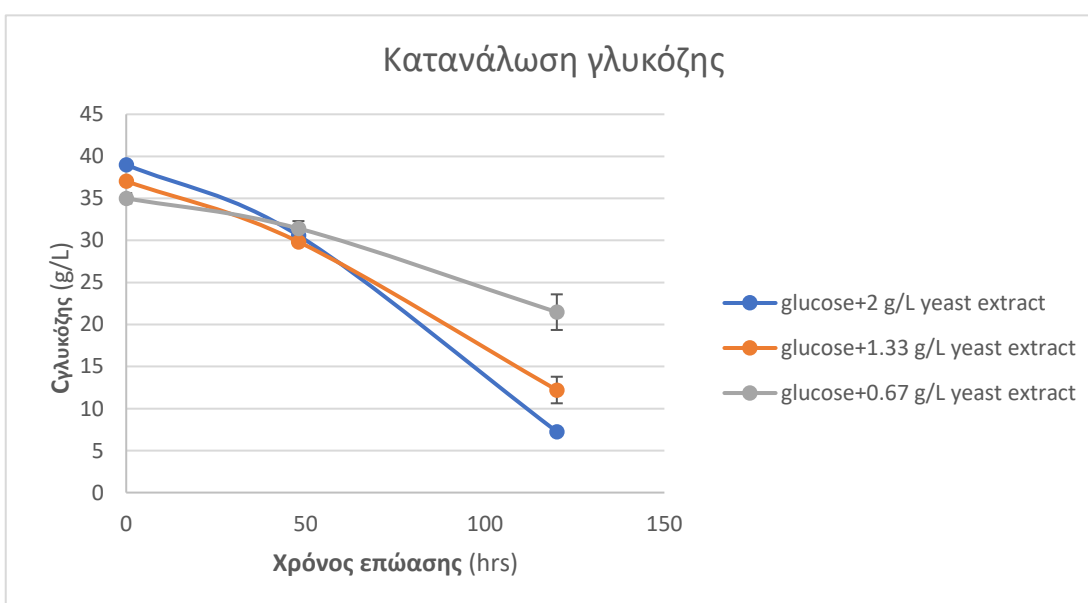
### 3.3.2.1 Μέτρηση κυτταρικής συγκέντρωσης



Εικόνα 3.31. Κυτταρική ανάπτυξη του μικροφύκου *C. cohnii* σε θρεπτικό μέσο με διαφορετικές αναλογίες C/N.

Όπως είναι φανερό από την Εικόνα 3.31, υψηλότερη κυτταρική συγκέντρωση εμφανίζεται σε καλλιέργεια με υψηλότερη συγκέντρωση εκχυλίσματος ζύμης, και άρα για μικρότερο λόγο C/N. Όσο αυξάνεται η περιεκτικότητα σε άζωτο στο θρεπτικό μέσο, σημειώνεται και υψηλότερη ανάπτυξη του μικροοργανισμού.

### 3.3.2.2 Μέτρηση καταναλωθείσας γλυκόζης



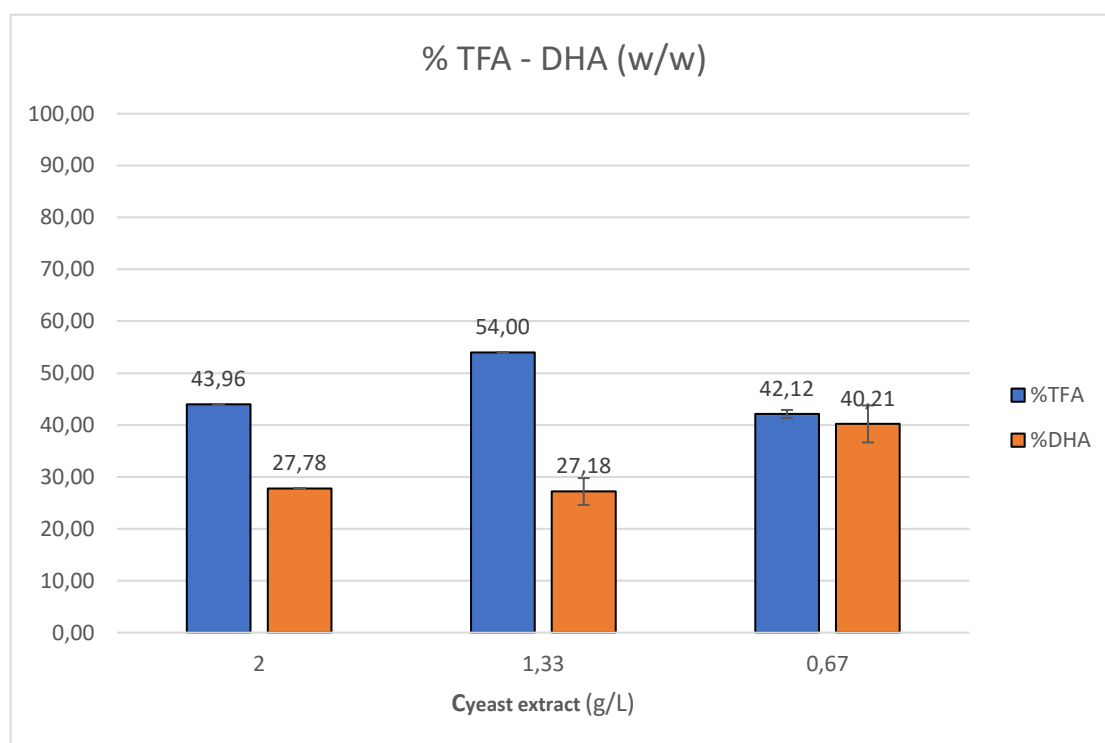
Εικόνα 3.32. Κατανάλωση γλυκόζης σε θρεπτικό μέσο με διαφορετικές αναλογίες C/N.

Η ίδια συμπεριφορά με την κυτταρική ανάπτυξη σημειώνεται για την κατανάλωση γλυκόζης στις μελετώμενες καλλιέργειες. Δηλαδή, όσο μεγαλύτερη είναι η περιεκτικότητα του θρεπτικού μέσου σε άζωτο τόσο μεγαλύτερη είναι η κατανάλωση γλυκόζης. Αυτό είναι λογικό, αφού όσο πιο πολύ γλυκόζη καταναλώνεται από τα μικροφύκη, τόσο πιο πολύ αναπτύσσονται.

### 3.3.2.3 Παραγωγή ω-3 λιπαρών οξέων

Πίνακας 3.9 Βιομάζα κυττάρων, καταναλωθείσα γλυκόζη, ολικά λιπαρά οξέα (TFA) και DHA που παράγονται από καλλιέργειες *C. cohnii*. με διαφορετική αναλογία C/N στο μέσο

Συγκέντρωση εκχυλίσματος ζύμης στο μέσο (g/L)	Βιομάζα (g/lt)	Καταναλωθείσα γλυκόζη (g/lt)	mg βιομάζας/g καταναλωθείσας γλυκόζης	% TFA (w/w)	TFA (g/lt)	%DHA (w/w)	DHA (g/lt)
<b>2</b>	10,38	31,76	326,85	<b>43,96</b>	4,56	<b>27,78</b>	1,27
<b>1,33</b>	8,24	24,84	331,88	<b>54,00</b>	4,45	<b>27,18</b>	1,21
<b>0,67</b>	5,28	13,55	390,05	<b>42,12</b>	2,23	<b>40,21</b>	0,89



Εικόνα 3.33. Ποσοστό ολικών παραγόμενων λιπαρών οξέων ως προς τη βιομάζα των κυττάρων και ποσοστό DHA ως προς τα ολικά παραγόμενα λιπαρά οξέα κατά βάρος, για τις διάφορες συγκεντρώσεις εκχυλίσματος ζύμης.

Στον Πίνακα 3.9 παρουσιάζονται οι λαμβανόμενες βιομάζες κυττάρων *C.cohnii*, το ποσοστό αυτής σε λιπαρά οξέα καθώς και το ποσοστό των λιπαρών σε DHA κατά το πέρας της επώασης, από καλλιέργειες με διαφορετική σύσταση σε εκχύλισμα ζύμης. Στην καλλιέργεια όπου υπάρχει περισσότερο άζωτο στο θρεπτικό μέσο (2 g/L) λαμβάνεται υψηλή συγκέντρωση κυττάρων, που ξεπερνά τα 10 g/L. Όσο ελαττώνεται το άζωτο στο θρεπτικό μέσο, ελαττώνεται και η κυτταρική συγκέντρωση. Ωστόσο, δεν ισχύει το ίδιο για το ποσοστό των κυττάρων σε λιπαρά οξέα. Μέγιστη παραγωγή ολικών λιπαρών οξέων παρουσιάζεται για συγκέντρωση εκχυλίσματος 1.33 g/L, με τα ποσοστά TFA να είναι παραπλήσια για τις άλλες δύο συγκεντρώσεις. Αξιοσημείωτο είναι, όμως, το γεγονός ότι για την μικρότερη συγκέντρωση ζύμης παρατηρείται το μέγιστο ποσοστό DHA, που ξεπερνάει το 40% κ.β. των παραγόμενων λιπαρών. Έτσι, φαίνεται πως ελλείψει αζώτου ευνοείται η λιπογένεση.

### 3.3.3 Καλλιέργειες για παραγωγή ω-3 λιπαρών οξέων με χρήση υδρολυμάτων λιγνοκυτταρινούχου βιομάζας (Α' Σειρά)

Αρχικά, μελετήθηκε η ικανότητα ανάπτυξης και παραγωγής ω-3 λιπαρών οξέων από σάκχαρα προερχόμενα από τα δείγματα οξιάς 7, 8, 9,10 και 11, και από το δείγμα πεύκου 12 (Πίνακας 3.1), τα οποία συνιστούν τις καλλιέργειες Α' Σειράς. Για καθένα από τα δείγματα βιομαζών πραγματοποιήθηκε προϋδρόλυση, όπως περιεγράφηκε στην Παράγραφο 2.2.3.1 και ακολουθήθηκε επώαση με διεργασία SHF. Ως καλλιέργειες ελέγχου, ορίστηκαν οι καλλιέργειες με πηγή άνθρακα καθαρή γλυκόζη.

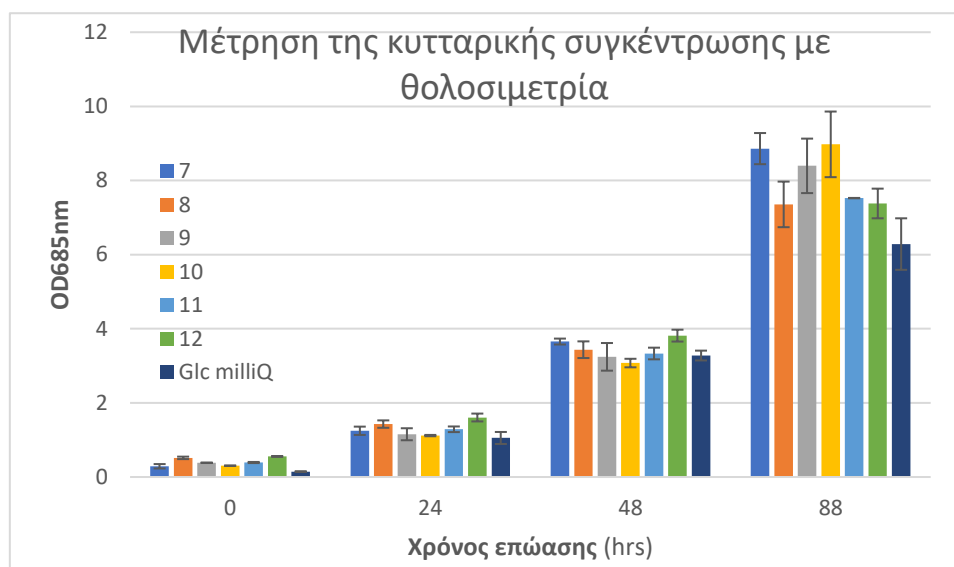
#### 3.3.3.1 Προϋδρόλυση

Πίνακας 3.10 Αρχική συγκέντρωση γλυκόζης στο υδρόλυμα που λήφθηκε ύστερα από ενζυμική υδρόλυση κάθε βιομάζας με *Cellic Tec2*® σε 9% w/v DM, 15 mg/g ενζυμικό φορτίο, 50°C, ρυθμιστικό διάλυμα MES συγκέντρωσης 80 mM, pH=5.5, 160 rpm για 48 ώρες. Τα επίπεδα γλυκόζης ανιχνεύτηκαν με *glucotest*.

Υδρόλυμα Βιομάζας	Αρχική Συγκέντρωση Γλυκόζης (g/L)	% Μετατροπή Κυτταρίνης	mg γλυκόζης/g βιομάζας
7	35,22	78,27	869,74
8	28,55	68,52	761,37
9	27,78	75,77	830,84
10	34,04	75,64	840,56
11	29,80	71,52	794,71
12	22,35	53,64	596,04

#### 3.3.3.2 Κυτταρική ανάπτυξη

Η ανάπτυξη του μικροφύκου σε σάκχαρα προερχόμενα από την υδρόλυση βιομαζών, σε κάθε μία από τις καλλιέργειες υδρολυμάτων, μελετήθηκε με θολοσιμετρία, όπως περιγράφεται στην Παράγραφο 2.2.3.2.2. Η μελέτη αφορά τις 88 ώρες επώασης. Δεδομένα για τις 120 ώρες δεν διατίθενται.

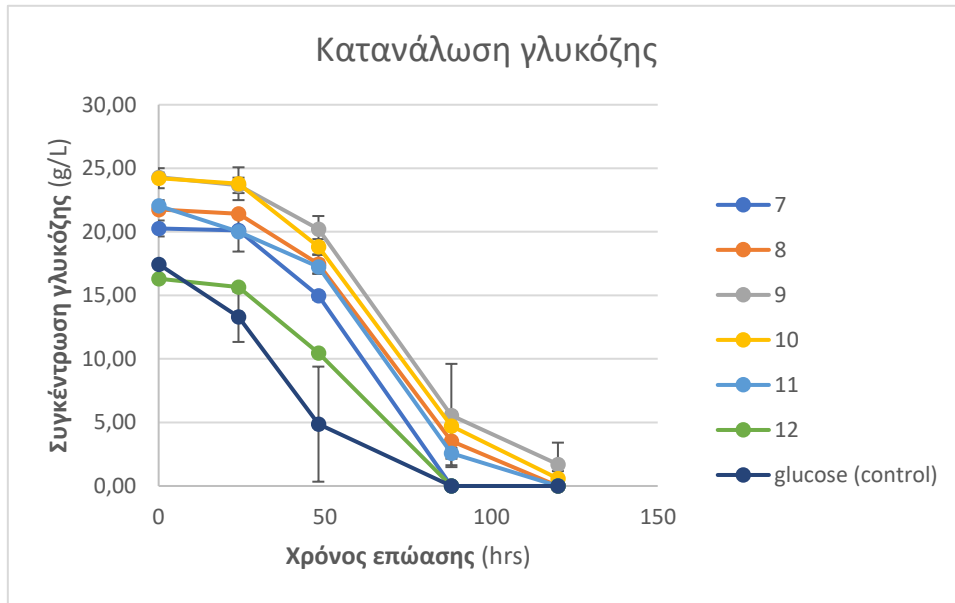


Εικόνα 3.34. Κυτταρική ανάπτυξη του μικροφύκου *C. cohnii* σε σάκχαρα προερχόμενα από υδρολύσεις προκατεργασμένου ξύλου οξιάς και πεύκου. Η καλλιέργεια ελέγχου ορίστηκε ως η ανάπτυξη σε καθαρή γλυκόζη.

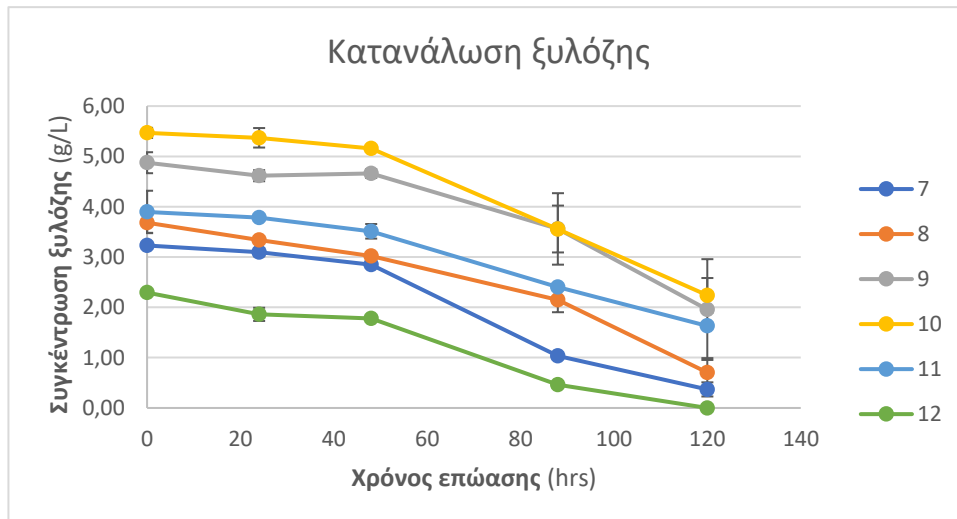
Από την Εικόνα 3.34 παρατηρείται ότι το μικροφύκος είναι ικανό να αναπτύσσεται αποτελεσματικά χρησιμοποιώντας ως πηγή άνθρακα σάκχαρα προερχόμενα από υδρολύσεις βιομαζών. Μεγαλύτερη ικανότητα ανάπτυξης παρουσιάζεται για τα σάκχαρα προερχόμενα από τις βιομάζες 7, 9 και 10, που ανήκουν σε οξιά. Μάλιστα, τα επίπεδα αυτά είναι συγκρίσιμα με την ανάπτυξη σε καθαρή γλυκόζη. Ο μικροοργανισμός μπορεί, επίσης, να αναπτύσσεται ικανά σε σάκχαρα προερχόμενα από πεύκο (πράσινη μπάρα). Αυτό παρουσιάζεται έντονα μέχρι τις 48 ώρες, όπου στη συνέχεια η ανάπτυξη σε σάκχαρα προερχόμενα από οξιά φαίνεται πιο αποτελεσματική.

### 3.3.3.3 Μέτρηση των καταναλωθέντων σακχάρων/γλυκόζης

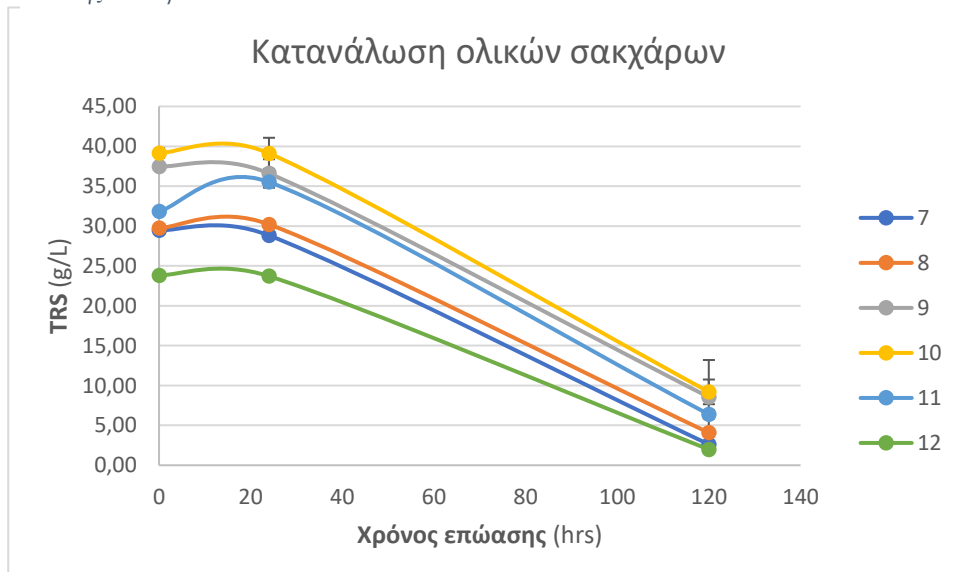
Η ανίχνευση των καταναλωθέντων σακχάρων στις καλλιέργειες υδρολυμάτων πραγματοποιήθηκε με τη μέθοδο DNS (Παράγραφος 2.2.1.1.1). Τα επίπεδα γλυκόζης και ξυλόζης ανιχνεύτηκαν με HPLC (Παράγραφος 2.2.1.1.3).



Εικόνα 3.35. Κατανάλωση γλυκόζης προερχόμενη από υδρόλυμα οξιάς και πεύκου σε διάστημα επώασης 120 ωρών. Ως καλλιέργεια ελέγχου ορίστηκε η ανάπτυξη σε καθαρή γλυκόζη.



Εικόνα 3.36. Κατανάλωση ξυλόζης προερχόμενη από υδρόλυμα οξιάς και πεύκου σε διάστημα επώασης 120 ωρών.





Εικόνα 3.37. Κατανάλωση ολικών σακχάρων (TRS), προερχόμενων από υδρόλυμα οξιάς και πεύκου σε διάστημα επώασης 120 ωρών.

Από την Εικόνα 3.35 φαίνεται ότι ο μικροοργανισμός μπορεί αποτελεσματικά να μεταβολίζει τη γλυκόζη που προέρχεται από την υδρόλυση οξιάς και πεύκου. Μάλιστα, στις 120 ώρες επώασης για τις περισσότερες βιομάζες το μεγαλύτερο μέρος της απελευθερωμένης γλυκόζης έχει καταναλωθεί. Για τις καλλιέργειες με υδρολύματα οξιάς (7,8,9,10,11) η κατανάλωση για τις πρώτες 24 ώρες φαίνεται να είναι αμελητέα. Ο μικροοργανισμός ξεκινά να καταναλώνει τη γλυκόζη μετά τις 24 ώρες. Ο μέγιστος ρυθμός κατανάλωσης γλυκόζης παρουσιάζεται μεταξύ των 48 και 88 ωρών. Για την καλλιέργεια με υδρόλυμα πεύκου ο ρυθμός κατανάλωσης γλυκόζης είναι σχεδόν μηδενικός για το πρώτο 24ωρο της επώασης και έπειτα φαίνεται να είναι σταθερός στο διάστημα των 24 - 88 ωρών. Στις 88 ώρες φαίνεται ότι η γλυκόζη έχει καταναλωθεί πλήρως από τον μικροοργανισμό για την εν λόγω καλλιέργεια. Συνεπώς, ο μικροοργανισμός μπορεί επιτυχώς να μεταβολίζει εξόζες παρουσία πεντοζών και λιγνίνης.

Όσον αφορά την ξυλόζη (Εικόνα 3.36), φαίνεται να καταναλώνεται με βραδύτερο ρυθμό απ' ό,τι η γλυκόζη. Για τις πρώτες 48 ώρες ο μικροοργανισμός φαίνεται να δυσκολεύεται να τη μεταβολίσει, παρουσιάζοντας πολύ μικρή κατανάλωση. Μετά τις 48 ώρες και μέχρι το τέλος, παρουσιάζεται η μέγιστη κατανάλωσή της για τις περισσότερες καλλιέργειες. Από αυτές, πιο έντονα λαμβάνει χώρα στην καλλιέργεια 10. Εξαιρέση αποτελεί η καλλιέργεια 8 όπου μέχρι τις 88 ώρες παρουσιάζει σταθερό ρυθμό ως προς την κατανάλωση. Για την καλλιέργεια με υδρόλυμα πεύκου (12), η οποία είναι η φτωχότερη σε ξυλόζη από τις υπόλοιπες καλλιέργειες, παρατηρείται πλήρης κατανάλωση μέχρι το πέρας της επώασης. Συμπεραίνεται, ότι ο μικροοργανισμός μπορεί αποτελεσματικά να μεταβολίζει εξόζες και πεντόζες, με μεγαλύτερη προτίμηση στις εξόζες.

Ως προς τα ολικά σάκχαρα (Εικόνα 3.37), αρχικά, παρουσιάζεται μία λανθάνουσα περίοδος, όπου μικροοργανισμός δεν καταναλώνει. Κατά το πέρας της επώασης το μεγαλύτερο μέρος τους έχει καταναλωθεί σε κάθε καλλιέργεια.

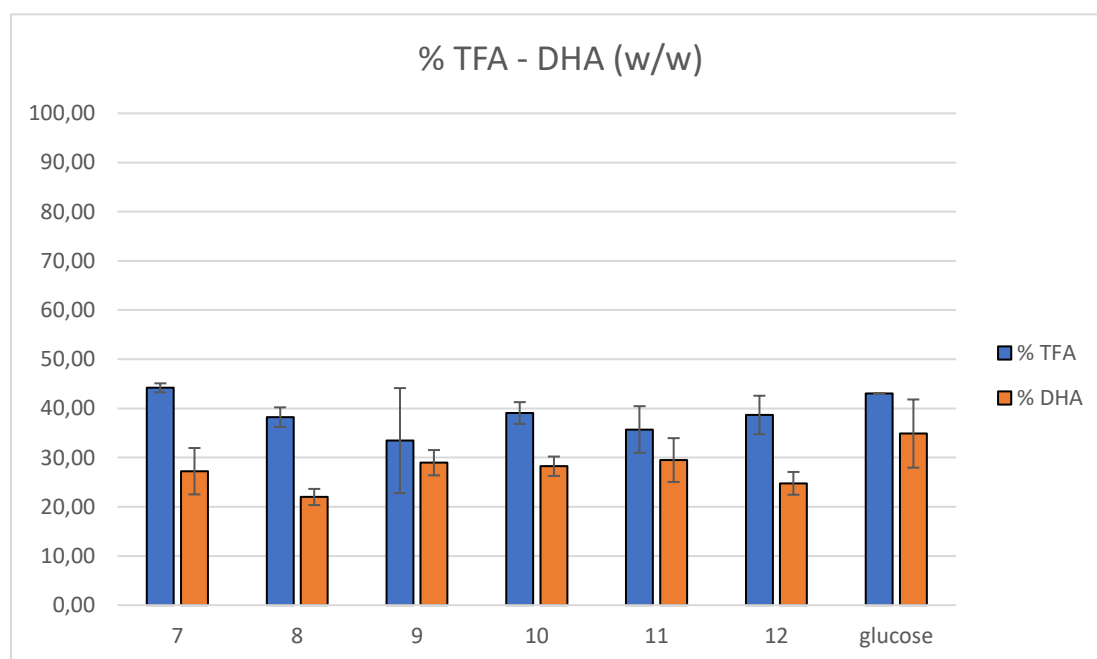
#### **3.3.3.4 Παραγωγή $\omega$ -3 λιπαρών οξέων**

Στο πέρας της SHF διεργασίας, γίνεται συλλογή της βιομάζας και απομόνωση των λιπαρών οξέων με τη διαδικασία που περιγράφεται στις Παραγράφους 2.2.3.2.4 και 2.2.3.2.5, αντίστοιχα. Η ποιοτική και ποσοτική ανάλυση των παραγόμενων λιπαρών οξέων έγινε με σε σύστημα αέριας χρωματογραφίας, με τη μέθοδο που περιγράφεται στην Παράγραφο 2.2.3.2.6. Έτσι, προσδιορίζονται η παραγόμενη βιομάζα των κυττάρων ανά λίτρο και ανά γραμμάριο καταναλωθέντων σακχάρων (γλυκόζης και ξυλόζης), το ποσοστό των κυττάρων σε ολικά λιπαρά οξέα (TFA), το περιεχόμενο DHA (%), καθώς και οι συγκεντρώσεις των δύο τελευταίων στην καλλιέργεια. Η

ποιοτική και ποσοτική σύσταση των παραγόμενων λιπαρών διατίθεται σε Πίνακα του Παραρτήματος.

Πίνακας 3.11 Βιομάζα κυττάρων, ολικά λιπαρά οξέα (TFA) και DHA που παράγονται από καλλιέργειες *C. cohnii* σε σάκχαρα προερχόμενα από υδρολύμα οξιάς και πεύκου, στους 23°C για 120 ώρες.

(#)	Συνθήκες Προκατεργασίας	Βιομάζα (g/l)	mg βιομάζας/g καταναλωθέντων σακχάρων	% TFA (w/w)	TFA (g/l)	% DHA (w/w)	DHA (g/l)
7	H <sub>2</sub> O/THF (50/50%), O <sub>2</sub> 12 bar, 175°C, 120min	7,394	320	44,18	3,27	27,23	0,89
8	H <sub>2</sub> O/ACO (50/50%), O <sub>2</sub> 25 bar, 175°C, 120min	7,71	312	38,22	2,95	21,99	0,65
9	H <sub>2</sub> O/ACO (50/50%), O <sub>2</sub> 12 bar, 175°C, 60min	7,76	304	33,45	2,60	28,96	0,75
10	H <sub>2</sub> O/EtOH (50/50%), O <sub>2</sub> 12 bar, 175°C, 60min	8,72	325	39,06	3,41	28,24	0,96
11	H <sub>2</sub> O/THF (50/50%), O <sub>2</sub> 12 bar, 175°C, 60min	7,98	328	35,71	2,85	29,50	0,84
12	H <sub>2</sub> O/EtOH (50/50%), O <sub>2</sub> 16 bar, 175°C, 60min	5,47	294	38,66	2,12	24,76	0,52



Εικόνα 3.38. Ποσοστό ολικών παραγόμενων λιπαρών οξέων ως προς τη βιομάζα των κυττάρων και ποσοστό DHA ως προς τα ολικά παραγόμενα λιπαρά οξέα κατά βάρος, που λαμβάνεται ύστερα από 120 ώρες επώασης *C. cohnii* σε σάκχαρα προερχόμενα από υδρολύματα οξιάς και πεύκου. Παράτιθενται και τα αντίστοιχα ποσοστά TFA και DHA από καθαρή γλυκόζη για σύγκριση.

Από τον Πίνακα 3.11 μπορεί να παρατηρηθεί ότι με τη χρήση σακχάρων προερχομένων από υδρόλυση λιγνοκυτταρινούχου βιομάζας για την παραγωγή ω-3 λιπαρών οξέων μπορούν να επιτευχθούν υψηλές κυτταρικές συγκεντρώσεις κατά το πέρασ της επώασης. Μάλιστα, οι βιομάζες που λαμβάνονται από τις καλλιέργειες με υδρολύματα οξιάς (7-11) είναι εξίσου υψηλές, ξεπερνώντας τα 7 g/L, και συγκρίσιμες με αυτές που λαμβάνονται από τις καλλιέργειες σε καθαρή γλυκόζη (9,67 g/L, βλ. Πίνακας 3.8). Η υψηλότερη κυτταρική πυκνότητα λαμβάνεται για τη βιομάζα 10, με τιμή 8,72 g/L που είναι αρκετά κοντινή σε αυτής της γλυκόζης. Ακολουθεί η 11, με συγκέντρωση κοντά στα 8 g/L, και έπονται οι 8 και 9 με παραπλήσια επίπεδα (περίπου 7,7 g/L). Από τα υδρολύματα οξιάς, χαμηλότερη βιομάζα σημειώνεται για το 7. Να σημειωθεί, ότι το συγκεκριμένο υδρόλυμα είναι το πλουσιότερο σε γλυκόζη από των υπολοίπων. Κάτι τέτοιο δημιουργεί υποψίες ότι ο μικροοργανισμός χρησιμοποιεί μεν ένα μέρος της διαθέσιμης γλυκόζης για την ανάπτυξη του, αλλά ένα σημαντικό μέρος της χρησιμοποιείται για την παραγωγή λιπαρών. Αυτό επιβεβαιώνεται από την σημειωθείσα περιεκτικότητα σε λιπαρά, η οποία είναι η υψηλότερη από των υπολοίπων καλλιέργειών και ξεπερνά το 44% κ.β. Από τις υπόλοιπες ληφθείσες βιομάζες, αξιόλογο είναι το ποσοστό τους σε λιπαρά, το οποίο ξεπερνά το 30% κ.β. Για το υδρόλυμα 10, εκτός από υψηλή κυτταρική πυκνότητα, λαμβάνεται και υψηλό ποσοστό λιπαρών, το δεύτερο καλύτερο από το σύνολο (39,06% κ.β.).

Ως προς την παραγωγή DHA, τα αποτελέσματα είναι χαμηλότερα από της γλυκόζης (34,88% κ.β., βλ. Πίνακας 3.8) αλλά ωστόσο ελπιδοφόρα. Η ανάπτυξη σε υδρόλυμα οξιάς 11 οδηγεί σε παραγωγή DHA που αγγίζει το 30% κ.β. των λιπαρών οξέων, και αποτελεί το κύριο παραγόμενο λιπαρό οξύ. Το ποσοστό αυτό είναι πολύ κοντινό με αυτό της γλυκόζης. Αξιόλογα ποσοστά σημειώνουν και τα υπόλοιπα υδρολύματα οξιάς με ποσοστά ελαφρώς πιο χαμηλά από του 11, όπως είναι το 9 με ποσοστό 28,96% κ.β. και το 10 με ποσοστό 28,24% κ.β.). Ωστόσο, το κύριο λιπαρό οξύ που παράγεται και για τα δύο υδρολύματα είναι το C18 (Πίνακας 6.6). Ίδια συμπεριφορά παρουσιάζεται επίσης και για τα υδρόλυμα 7. Από τα υδρολύματα οξιάς, την χαμηλότερη περιεκτικότητα σε DHA σημειώνει το 8, με ποσοστό χαμηλότερο από 22% κ.β.. Και σε αυτό, το κυρίαρχο λιπαρό οξύ είναι το C18 με αξιόλογα ποσοστά να σημειώνονται και για τα C14 και C16.

Όσον αφορά το υδρόλυμα πεύκου 12, οι κυτταρικές συγκεντρώσεις που επιτυγχάνονται είναι αρκετά χαμηλότερες από της οξιάς. Ωστόσο, το περιεχόμενο σε λιπαρά είναι αρκετά υψηλό, κοντά στο 39% κ.β. Παρ' όλα αυτά η εν λόγω βιομάζα δεν ευνοεί τόσο την παραγωγή DHA, καθώς αυτό αποτελεί περίπου μόνο το 25% κ.β. αυτής, με τη σημαντικότερη παραγωγικότητα να σημειώνεται για το λιπαρό οξύ C18 που αποτελεί το 42,69% κ.β. του συνόλου.

### **3.3.4 Καλλιέργειες για παραγωγή ω-3 λιπαρών οξέων με χρήση υδρολυμάτων λιγνοκυτταρινούχου βιομάζας (B' Σειρά)**

Σε δεύτερη φάση, μελετήθηκε η ικανότητα ανάπτυξης και παραγωγής ω-3 λιπαρών οξέων από σάκχαρα προερχόμενα από τα δείγματα οξιάς 4, 5, 6 που αφορούν την τωρινή μελέτη (Πίνακας 6.2) και τα 19, 20 που αφορούν προηγούμενη μελέτη, η οποία δεν παρουσιάζεται στην παρούσα εργασία. Τα συγκεκριμένα υποστρώματα κρίθηκαν ως ελπιδοφόρες πηγές άνθρακα λόγω της υψηλής υδρολυσιμότητάς τους. Για καθένα από τα δείγματα βιομαζών της Β' Σειράς πραγματοποιήθηκε προϋδρόλυση, όπως περιεγράφηκε στην Παράγραφο 2.2.3.1 και ακολουθήθηκε επώαση με διεργασία SHF. Για τη μελέτη της επίδρασης της προκατεργασίας στην παραγωγή DHA ως καλλιέργεια ελέγχου ορίστηκε η καλλιέργεια σε ακατέργαστο δείγμα οξιάς. Επίσης, για τη σύγκριση των παραγόμενων ποσοστών DHA από σάκχαρα προερχόμενα από υδρόλυση με τα αντίστοιχα της καθαρής γλυκόζης πραγματοποιήθηκε και ανάπτυξη σε καθαρό σάκχαρο γλυκόζης.

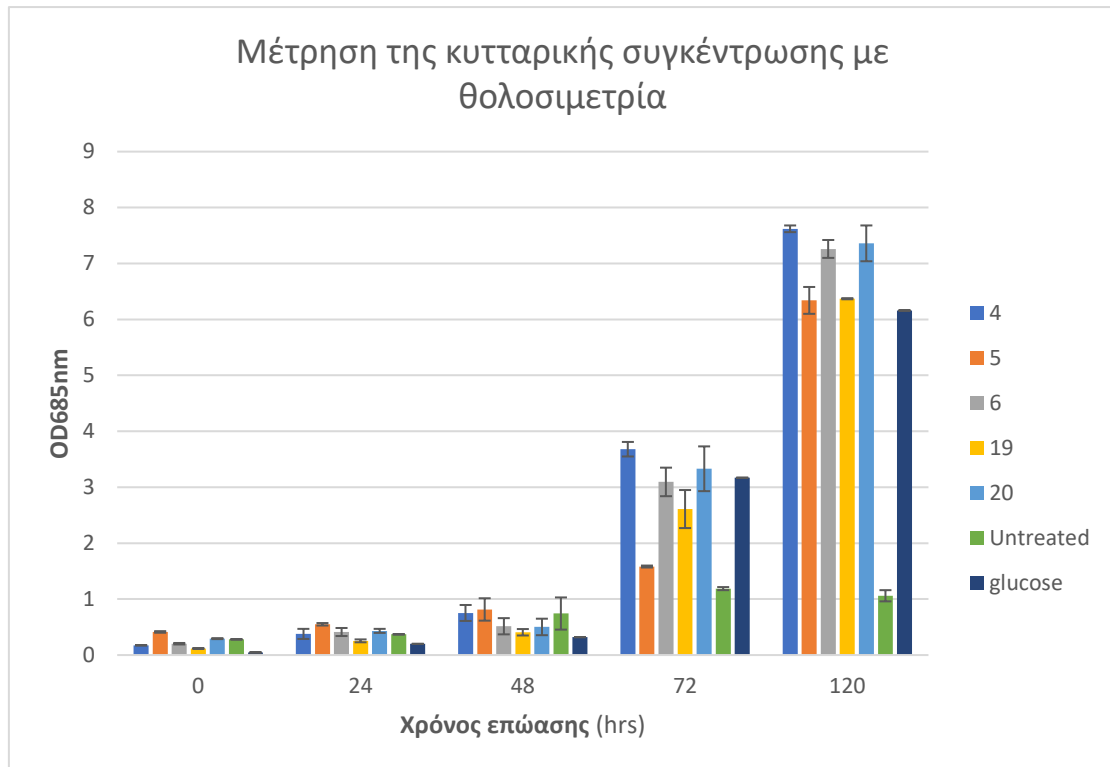
### 3.3.4.1 Προϋδρόλυση

Πίνακας 3.12 Αρχική συγκέντρωση γλυκόζης στο υδρόλυμα που λήφθηκε ύστερα από ενζυμική υδρόλυση κάθε βιομάζας με *Cellic Ctec2®* σε 9% w/v DM, 15 mg/g ενζυμικό φορτίο, 50°C, ρυθμιστικό διάλυμα MES συγκέντρωσης 80 mM, pH=5.5, 160 rpm για 48 ώρες. Τα επίπεδα γλυκόζης ανιχνεύτηκαν με *glucotest*.

Υδρόλυμα Βιομάζας	%Κυτταρίνη	Αρχική Συγκέντρωση Γλυκόζης (g/L)	% Μετατροπή Κυτταρίνης	mg γλυκόζης/g βιομάζας
4	76,36	27,40	35,92	304,48
5	79,50	30,57	38,49	339,68
6	80,14	31,19	38,95	346,51
19	64,86	23,25	35,89	258,37
20	77,76	32,34	41,64	359,37
Untreated	39,42	2,06	5,23	22,90

### 3.3.4.2 Κυτταρική ανάπτυξη

Όμοια με την Α' Σειρά, πραγματοποιήθηκε μέτρηση της κυτταρικής συγκέντρωσης σε κάθε μία από τις καλλιέργειες.

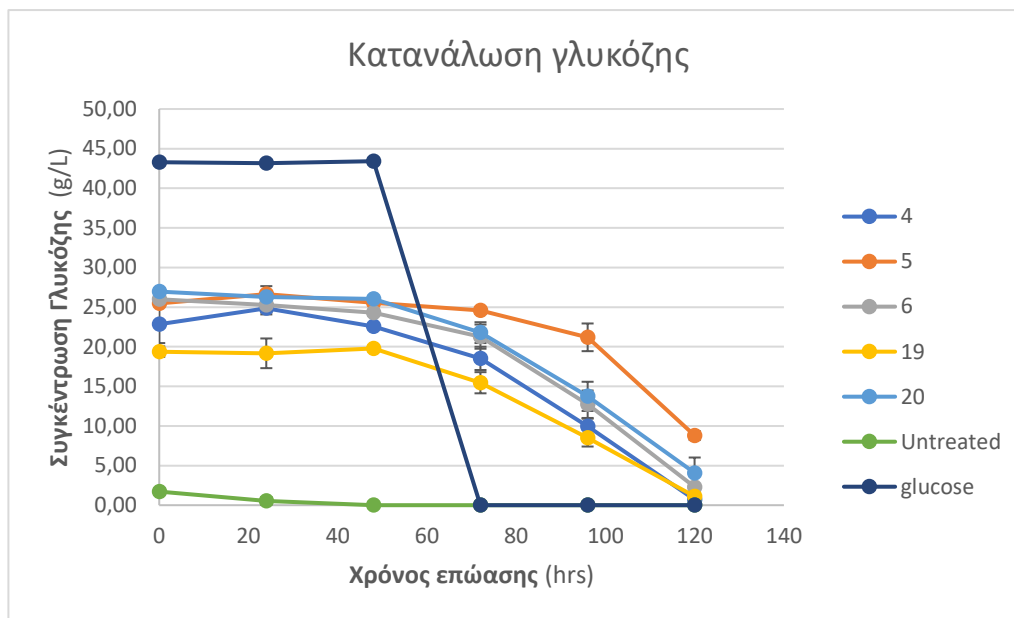


Εικόνα 3.39. Κυτταρική ανάπτυξη του μικροφύκου *C. cohnii* σε σάκχαρα προερχόμενα από υδρολύσεις προκατεργασμένου και ακατέργαστου ξύλου οξιάς. Η καλλιέργεια ελέγχου ορίστηκε ως η ανάπτυξη σε καθαρή γλυκόζη.

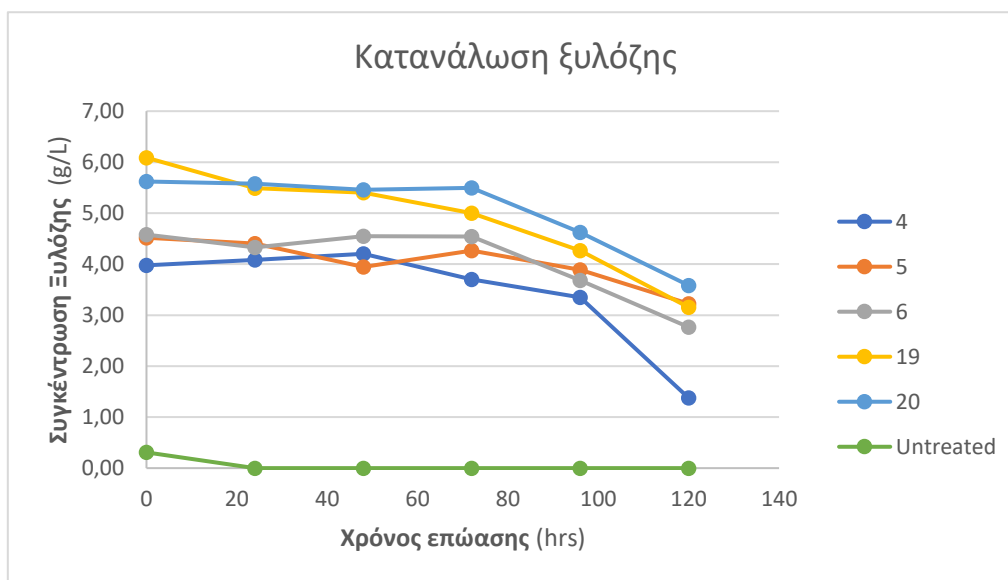
Από το παραπάνω γράφημα (Εικόνα 3.39) παρατηρείται ότι το μικροφύκος μπορεί να αναπτύσσεται ικανά χρησιμοποιώντας ως πηγή άνθρακα σάκχαρα προερχόμενα από υδρολύσεις προκατεργασμένου ξύλου οξιάς. Μάλιστα, τα εν λόγω σάκχαρα φαίνεται να ευνοούν την ανάπτυξη του μικροφύκου περισσότερο απ' ό,τι η καθαρή γλυκόζη, αφού στο πέρας της επώασης παρουσιάζονται υψηλότερες κυτταρικές συγκεντρώσεις για τις περισσότερες προκατεργασμένες βιομάζες. Βέβαια, η μέτρηση με θολοσιμετρία δεν αποτελεί τόσο αξιόπιστη μέθοδο, αλλά ωστόσο δίνει μία ένδειξη για την εξέλιξη της ανάπτυξης του μικροοργανισμού στα υποστρώματα αυτά. Άξιο προσοχής, είναι ωστόσο, η ανικανότητα ανάπτυξης του μικροοργανισμού σε υδρόλυμα προερχόμενο από ακατέργαστο υλικό. Τούτο οφείλεται στις χαμηλές συγκεντρώσεις γλυκόζης που επιτυγχάνονται κατά την προϋδρόλυση του, καθώς η παρουσία υψηλής ποσότητας λιγνίνης στις βιομάζες που δεν έχουν υποστεί προκατεργασία αποτελεί φυσικό φραγμό στην απελευθέρωσή της γλυκόζης. Τα υδρολύματα που οδηγούν σε υψηλές κυτταρικές πυκνότητες είναι τα 4, 6 και 20. Για το 4, στο οποίο παρουσιάζονται οι υψηλότερες συγκεντρώσεις, η παρουσία λιγνίνης (περίπου 6,5%) πιθανότατα βοηθά την ανάπτυξη του μικροφύκου, όπως διαπιστώθηκε στις καλλιέργειες καθαρής γλυκόζης με μικρή ποσότητα λιγνίνης.

### 3.3.4.3 Μέτρηση των καταναλωθέντων σακχάρων/γλυκόζης

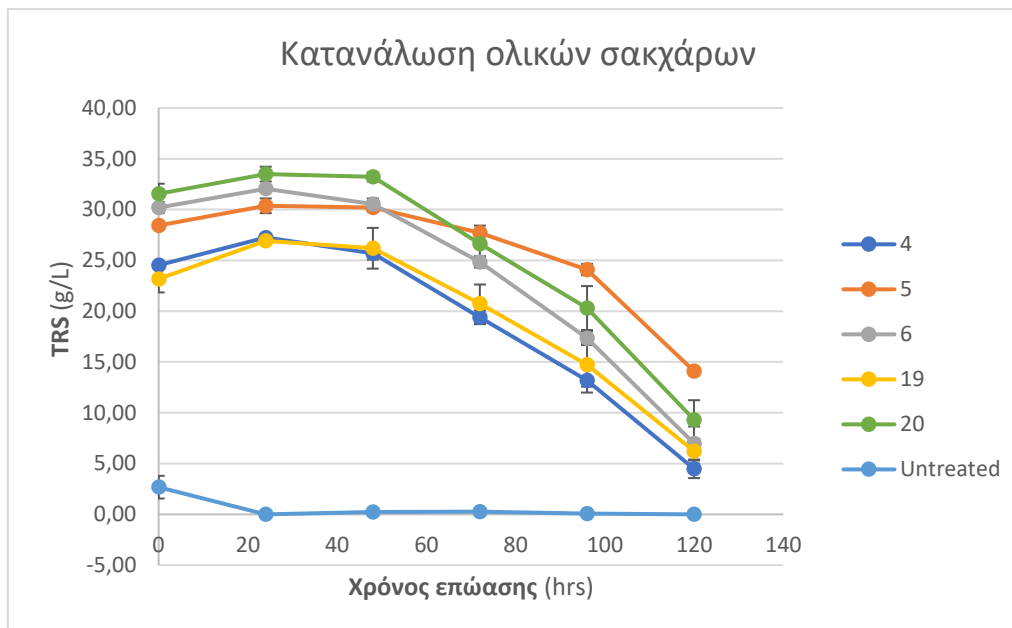
Η ανίχνευση των καταναλωθέντων σακχάρων στις καλλιέργειες της β' σειράς υδρολυμάτων πραγματοποιήθηκε με τη μέθοδο DNS (Παράγραφος 2.2.1.1.1). Τα επίπεδα γλυκόζης και ξυλόζης ανιχνεύτηκαν με HPLC (Παράγραφος 2.2.1.1.3).



Εικόνα 3.40. Κατανάλωση γλυκόζης προερχόμενη από υδρόλυμα οξιάς σε διάστημα επώασης 120 ωρών. Ως καλλιέργεια ελέγχου ορίστηκε η ανάπτυξη σε καθαρή γλυκόζη.



Εικόνα 3.41. Κατανάλωση ξυλόζης προερχόμενη από υδρόλυμα οξιάς σε διάστημα επώασης 120 ωρών.



Εικόνα 3.42. Κατανάλωση ολικών σακχάρων (TRS), προερχόμενων από υδρόλυμα οξιάς σε διάστημα επώασης 120 ωρών.

Με βάση την Εικόνα 3.40, ο μικροοργανισμός φαίνεται να καταναλώνει με βραδύτερο ρυθμό τα σάκχαρα των υδρολυμάτων της Β' σειράς, απ' ό,τι της Α' (Εικόνα 3.35). Αυτό πιθανότατα οφείλεται στον ίδιο τον μικροοργανισμό καθώς το εμβόλιο από πείραμα σε πείραμα διαφέρει. Η κατανάλωση γλυκόζης φαίνεται να ακολουθεί ίδιο ρυθμό για τις περισσότερες καλλιέργειες υδρολυμάτων προκατεργασμένης οξιάς. Αρχικά, παρουσιάζεται μία «λανθάνουσα» περίοδος 48 ωρών, στην οποία ο μικροοργανισμός καταναλώνει μικρά έως και αμελητέα ποσά γλυκόζης. Η κατανάλωση γλυκόζης φαίνεται να ενεργοποιείται μετά τις 72 ώρες, ώσπου φτάνει σε χαμηλά επίπεδα κατά το πέρας της διεργασίας. Η καθυστέρηση αυτή μπορεί να οφείλεται στην παρουσία ξυλόζης. Αξίζει να σημειωθεί ότι στην καλλιέργεια 5, παρατηρείται η πιο αργή κατανάλωση. Για την ανάπτυξη σε υδρόλυμα ακατέργαστης βιομάζας τα επίπεδα γλυκόζης είναι εξαρχής πολύ χαμηλά, και ως εκ τούτου η γλυκόζη φτάνει γρήγορα σε μηδενικά επίπεδα.

Όσον αφορά την κατανάλωση ξυλόζης (Εικόνα 3.41), ο μικροοργανισμός φαίνεται να μην παρουσιάζει ιδιαίτερη προτίμηση ως προς αυτήν. Σε σύγκριση με την γλυκόζη, σαφώς καταναλώνεται με πιο αργό ρυθμό. Παρόμοια με τη γλυκόζη, και εδώ η κατανάλωση φαίνεται να ενεργοποιείται μετά τις 72 ώρες. Όσον αφορά την κατανάλωση ξυλόζης σε καλλιέργεια με υδρόλυμα ακατέργαστης βιομάζας, ισχύει το ίδιο πράγμα με την κατανάλωση γλυκόζης.

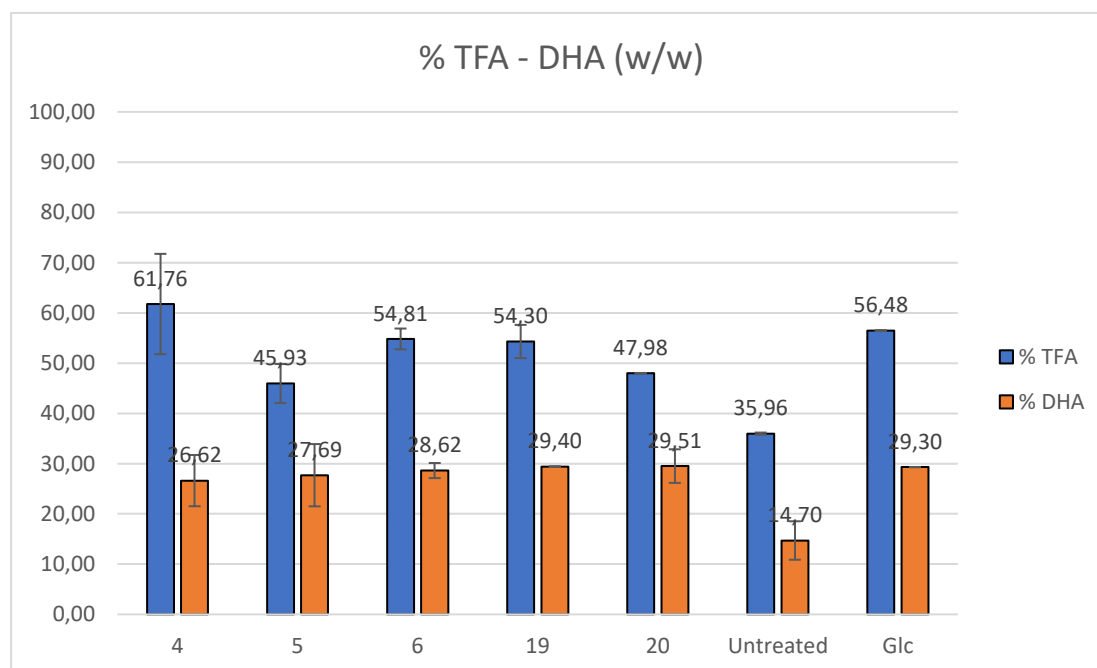
Αναφορικά με τα ολικά σάκχαρα που περιέχονται στο υδρόλυμα, αυτά φαίνεται να καταναλώνονται από τον μικροοργανισμό μετά τις 48 ώρες. Η κατανάλωση παρουσιάζει ίδια συμπεριφορά για κάθε καλλιέργεια υδρολύματος προκατεργασμένης οξιάς, εξαιρουμένου της 5, όπου όπως στο διάγραμμα κατανάλωσης γλυκόζης, και εδώ παρατηρείται μια πιο αργή τάση για κατανάλωση. Τούτο είναι λογικό, εάν ληφθεί υπόψιν ότι το κύριο μέρος των ολικών σακχάρων συνίσταται από γλυκόζη.

### 3.3.4.4 Παραγωγή ω-3 λιπαρών οξέων

Όμοια με τη Α' σειρά, ακολουθείται η ίδια διαδικασία που περιγράφηκε στην Παράγραφο 3.3.3.4. Περαιτέρω δεδομένα για την ποιοτική και ποσοτική σύσταση των λαμβανόμενων λιπαρών διατίθεται στο Παράρτημα.

Πίνακας 3.13 Βιομάζα κυττάρων, ολικά λιπαρά οξέα (TFA) και DHA που παράγονται από καλλιέργειες *C. cohnii* σε σάκχαρα προερχόμενα από υδρόλυμα οξιάς, στους 23°C για 120 ώρες. Παράτιθενται τα αντίστοιχα μεγέθη για ανάπτυξη σε καθαρή γλυκόζη.

(#)	Συνθήκες Προκατεργασίας	Βιομάζα (g/lt)	mg βιομάζας/g κατανάλωθέντων σακχάρων	% TFA (w/w)	TFA (g/lt)	% DHA (w/w)	DHA (g/lt)
4	H <sub>2</sub> O/THF (50/50%), O <sub>2</sub> 8 bar, 175°C, 120 min	8,74	353,29	61,76	5,40	26,62	1,44
5	H <sub>2</sub> O/ACO (50/50%), O <sub>2</sub> 12 bar, 175°C, 120 min	6,48	360,12	45,93	2,97	27,69	0,82
6	H <sub>2</sub> O/EtOH (50/50%), O <sub>2</sub> 12 bar, 175°C, 120 min	8,57	336,11	54,81	4,70	28,62	1,35
19	H <sub>2</sub> O/THF (50/50%), O <sub>2</sub> 16 bar, 150°C, 120 min	7,90	372,52	54,30	4,29	29,40	1,26
20	H <sub>2</sub> O/EtOH (50/50%), O <sub>2</sub> 16 bar, 175°C, 60 min	8,60	345,32	47,98	4,13	29,51	1,22
Untreated	-	0,99	490,57	35,96	0,36	14,70	0,05
Γλυκόζη	-	9,67	306,38	43,03	4,16	34,88	1,45



Εικόνα 3.43. Ποσοστό ολικών παραγόμενων λιπαρών οξέων ως προς τη βιομάζα των κυττάρων, και ποσοστό DHA ως προς τα ολικά παραγόμενα λιπαρά οξέα κατά βάρος, που λαμβάνεται ύστερα από 120 ώρες επώασης *C. cohnii* σε σάκχαρα προερχόμενα από υδρόλυμα οξιάς, προκατεργασμένης και ακατέργαστης. Παράτιθενται και τα αντίστοιχα ποσοστά TFA και DHA από καθαρή γλυκόζη για σύγκριση.



Από τον Πίνακα 3.13 εύκολα μπορεί να παρατηρηθεί ότι, για ακόμη μία φορά, η χρησιμοποίηση σακχάρων που προέρχονται από την υδρόλυση προκατεργασμένης βιομάζας, ως πηγή άνθρακα, οδηγεί σε υψηλές κυτταρικές πυκνότητες κατά το πέρας της διεργασίας. Μάλιστα, αυτές παρουσιάζονται υψηλότερες από αυτές που επιτυγχάνονται για την Α' Σειρά υδρολυμάτων οξιάς, κατά μέσο όρο, αφού λαμβάνονται σε συγκεντρώσεις μεγαλύτερες των 8 g/L. Οι τιμές αυτές είναι συγκρίσιμες με αυτές που επιτυγχάνει η ανάπτυξη σε γλυκόζη, όπως μπορεί να παρατηρηθεί. Συνεπώς, ο μικροοργανισμός μπορεί εξίσου αποτελεσματικά να αναπτύσσεται σε σάκχαρα που προέρχονται από υδρόλυση κυτταρίνης. Εξαιρέση αποτελούν η καλλιέργεια σε υδρόλυμα βιομάζας 5, όπου επιτυγχάνονται αρκετά μικρότερες κυτταρικές συγκεντρώσεις (περίπου 6,5 g/L) καθώς και σε υδρόλυμα ακατέργαστης βιομάζας, όπου οι κυτταρικές συγκεντρώσεις είναι δραματικά μικρότερες και δεν ξεπερνούν το 1 g/L.

Το περιεχόμενο σε λιπαρά οξέα είναι αρκετά υψηλό και ξεπερνάει το 40% της βιομάζας για όλα τα υδρολύματα. Οι τίτλοι λιπαρών που επιτυγχάνονται είναι συγκρίσιμοι με αυτούς της γλυκόζης, και μάλιστα υψηλότεροι για τα περισσότερα υδρολύματα. Ιδιαίτερα υψηλούς τίτλους σημειώνει το υδρόλυμα 4 με τιμή που ξεπερνάει τα 5 g/L. Για το ακατέργαστο δείγμα, το ποσοστό σε λιπαρά είναι μεν ικανοποιητικό, αλλά οι τίτλοι λιπαρών που λαμβάνονται είναι αρκετά χαμηλοί λόγω της χαμηλής παραγόμενης βιομάζας.

Ωστόσο, το περιεχόμενο των λιπαρών σε DHA για όλες τις καλλιέργειες υδρολυμάτων δεν ξεπερνά το 30% κ.β., παρά τα υψηλά ποσοστά λιπαρών οξέων που σημειώνουν. Υψηλότερο περιεχόμενο σε DHA καταλαμβάνουν τα λιπαρά που προέρχονται από τις καλλιέργειες υδρολυμάτων 19 και 20, με ποσοστά που αγγίζουν το 29,51% κ.β., το οποίο είναι αρκετά κοντινό με της γλυκόζης (34,88% κ.β.). Αξίζει να σημειωθεί ότι στις περισσότερες καλλιέργειες, το DHA αποτελεί το κύριο παραγόμενο λιπαρό οξύ. Εξαιρέση αποτελούν η βιομάζα 20, στην οποία παράγεται σε ίση ποσότητα και C14 λιπαρό οξύ (29,51%), η βιομάζα 4 που κύριο λιπαρό οξύ σημειώνεται το C18 (34,98% κ.β.) και η ακατέργαστη βιομάζα που ευνοεί την παραγωγή C18 (62,69% κ.β.). Ωστόσο, για όλες τις καλλιέργειες, το ποσοστό του DHA ξεπερνά το 25% κ.β., εξαιρουμένου της καλλιέργειας σε σάκχαρα ακατέργαστης βιομάζας, κάτι το οποίο είναι πολύ ελπιδοφόρο. Για την καλλιέργεια σε υδρόλυμα ακατέργαστου υλικού, τα ποσοστά σημειώνονται αρκετά χαμηλότερα και σχεδόν υποδιπλάσια από αυτά που επιτυγχάνονται με προκατεργασμένη βιομάζα, υποδεικνύοντας της σημαντικότητα της προκατεργασίας κατά τη ζύμωση.

Εν τέλει, οι τίτλοι λιπαρών που επιτυγχάνονται είναι υψηλοί και πολύ κοντινοί με αυτούς που επιτυγχάνονται με γλυκόζη ως πηγή άνθρακα. Μάλιστα, ξεπερνούν το 1 g/L.

### 3.3.5 Καλλιέργειες για παραγωγή ω-3 λιπαρών οξέων με χρήση υδρολυμάτων λιγνοκυτταρινούχου βιομάζας σε ημιδιαλείποντος έργου διεργασία

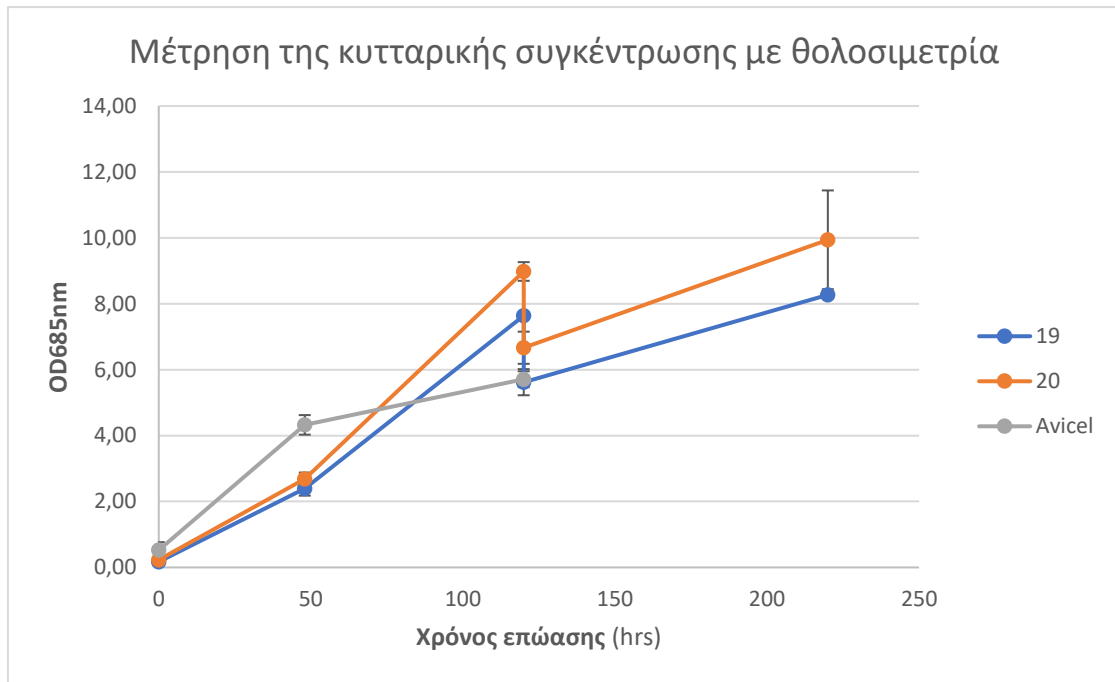
Σε τρίτη φάση, μελετήθηκε η ικανότητα ανάπτυξης και παραγωγής ω-3 λιπαρών οξέων από *C.cohnii* σε ημιδιαλείποντος έργου διεργασία SHF με χρήση σακχάρων από προϋδρόλυση. Συγκεκριμένα, υδρολύματα των βιομαζών 19 και 20, τα οποία κρίθηκαν ως αποτελεσματικές πηγές άνθρακα στην παραγωγή DHA (βλ. Παράγραφος 3.3.4.4), χρησιμοποιήθηκαν ως αρχική τροφοδοσία σε καλλιέργειες *C.cohnii* στις οποίες έγινε τάισμα ξανά με την ίδια τροφοδοσία στις 120 ώρες. Ακολουθήθηκε επώαση για άλλες 100 ώρες. Η τροφοδοσία των σακχάρων αποστειρώθηκε με τη μέθοδο του αποστειρωμένου φίλτρακιού και ο όγκος που προστέθηκε ήταν ίσος με τον αρχικό όγκο της τροφοδοσίας (27 mL). Ως καλλιέργεια ελέγχου ορίστηκε η ανάπτυξη σε υδρόλυμα κρυσταλλικής κυτταρίνης, για τις πρώτες 120 ώρες (Avicel).

#### 3.3.5.1 Προϋδρόλυση

Πίνακας 3.14 Αρχική συγκέντρωση γλυκόζης στα υδρολύματα που λήφθηκαν, ύστερα από ενζυμική υδρόλυση κάθε υποστρώματος με Cellic Ctec2® σε 9% w/v DM, 15 mg/g ενζυμικό φορτίο, 50°C, ρυθμιστικό διάλυμα MES συγκέντρωσης 80 mM, pH=5.5, 160 rpm για 48 ώρες.

Υδρόλυμα Βιομάζας	%Κυτταρίνη	Αρχική Συγκέντρωση Γλυκόζης (g/L)	% Μετατροπή Κυτταρίνης	mg γλυκόζης/g βιομάζας
19	64,86	24,03	37,08	266,98
20	77,76	33,35	42,93	370,50
Avicel	~100	18,83	18,85	209,18

#### 3.3.5.2 Κυτταρική ανάπτυξη

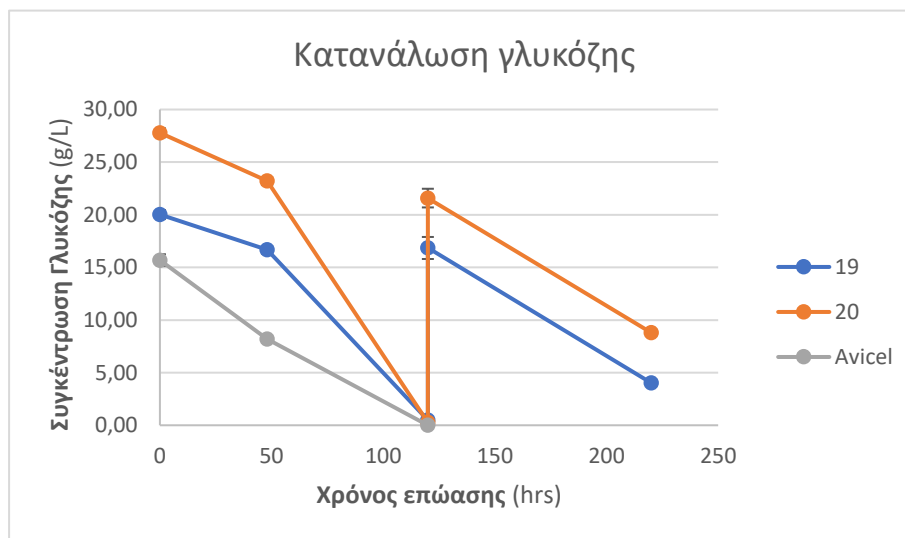


Εικόνα 3.44. Κυτταρική ανάπτυξη του μικροφύκου *C.sohnii* σε σάκχαρα προερχόμενα από υδρολύσεις προκατεργασμένου ξύλου οξιάς για 220 ώρες, με επανατροφοδότηση υδρολύματος στις 120 ώρες επώασης. Ως καλλιέργεια ελέγχου ορίστηκε η ανάπτυξη σε κρυσταλλική κυτταρίνη.

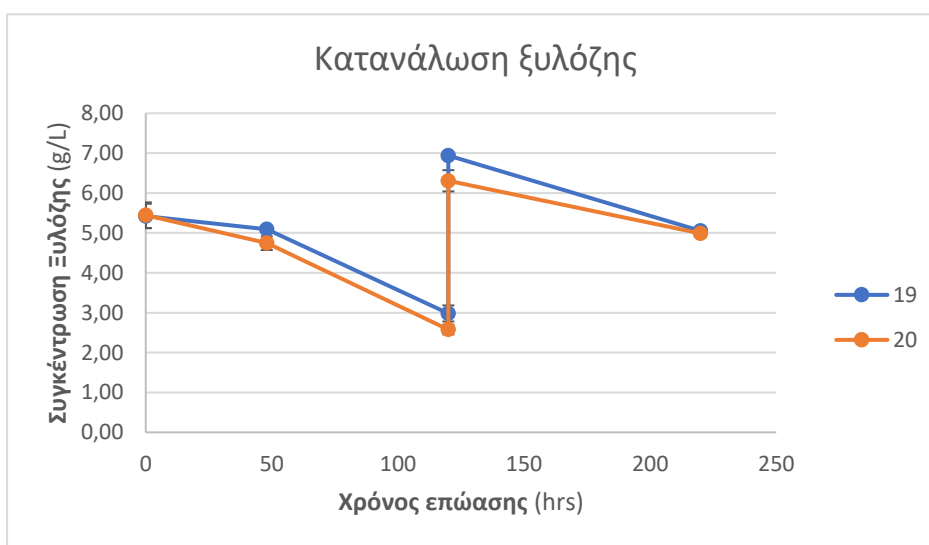
Όπως μπορεί να διαπιστωθεί, για τις πρώτες 48 ώρες ο μικροοργανισμός αναπτύσσεται με μεγαλύτερη ταχύτητα σε υδρόλυμα προερχόμενο από κρυσταλλική κυτταρίνη. Αυτό πιθανότατα οφείλεται στο γεγονός ότι το υδρόλυμα κρυσταλλικής κυτταρίνης συνίσταται αποκλειστικά από γλυκόζη και κελλοβιόζη, σε αντίθεση με τα υδρολύματα των λιγνοκυτταρινούχων βιομαζών που περιέχουν και συστατικά της ημικυτταρίνης (πεντόζες) και της λιγνίνης (φαινολικές ενώσεις) που μπορεί να δράσουν παρεμποδιστικά στην ανάπτυξη του μικροοργανισμού. Τούτο επαληθεύεται και από το γεγονός ότι η ανάπτυξη στα υδρολύματα των βιομαζών 19 και 20 είναι κατά πολύ μικρότερη τις πρώτες 48 ώρες. Μάλιστα, αυτή ακολουθεί την ίδια πορεία μέχρι τις 120 ώρες και για τις δύο καλλιέργειες. Μετά τις 48 ώρες, η ανάπτυξη σε γλυκόζη προερχόμενη από κρυσταλλική κυτταρίνη φαίνεται να ακολουθεί βραδύτερο ρυθμό, κάτι που υποδηλώνει πως ο μικροοργανισμός έχει καταναλώσει πλήρως τη διαθέσιμη γλυκόζη. Στις 120 ώρες, όπου γίνεται το τάισμα στις καλλιέργειες 19 και 20 με το αντίστοιχο υδρόλυμα βιομάζας, η κυτταρική συγκέντρωση παρουσιάζει μια απότομη πτώση, πιθανότατα λόγω αραίωσης με την προσθήκη του επιπλέον όγκου υδρολύματος στην καλλιέργεια. Ο μικροοργανισμός φαίνεται να αναπτύσσεται αποτελεσματικά με την επιπλέον προσθήκη υδρολύματος για τις επόμενες 100 ώρες αφού οι τελικές κυτταρικές συγκεντρώσεις φτάνουν σε υψηλότερα επίπεδα από αυτά πριν από την προσθήκη.

### 3.3.5.3 Μέτρηση των καταναλωθέντων σακχάρων/γλυκόζης

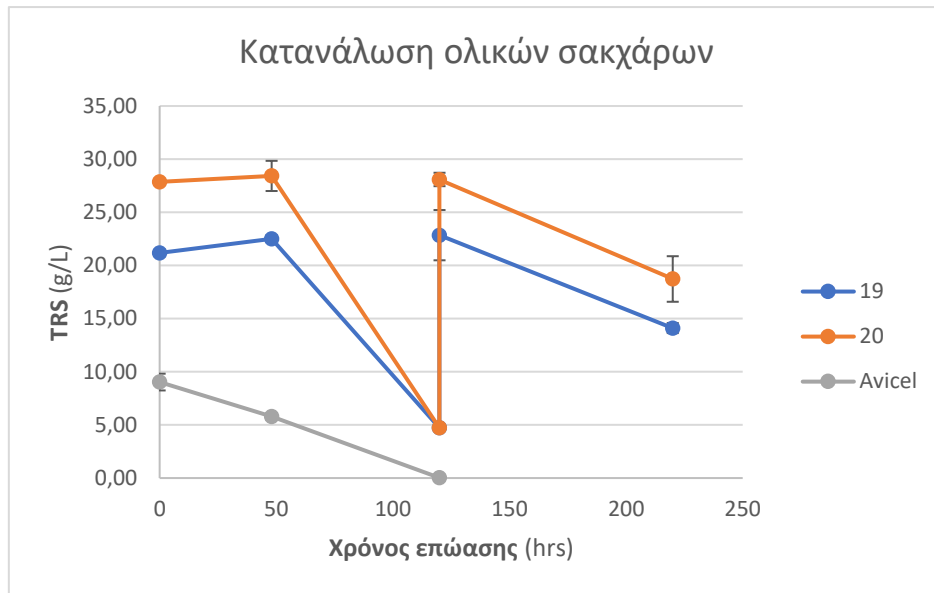
Η ανίχνευση των καταναλωθέντων σακχάρων στις καλλιέργειες υδρολυμάτων πραγματοποιήθηκε με τη μέθοδο DNS (Παράγραφος 2.2.1.1.1). Τα επίπεδα γλυκόζης και ξυλόζης ανιχνεύθηκαν με HPLC (Παράγραφος 2.2.1.1.3).



Εικόνα 3.45. Κατανάλωση γλυκόζης προερχόμενη από υδρόλυμα οξιάς σε διάστημα επώασης 220 ωρών με επανατροφοδότηση υδρολύματος στις 120 ώρες. Ως καλλιέργεια ελέγχου ορίστηκε η ανάπτυξη σε κρυσταλλική κυτταρίνη.



Εικόνα 3.46. Κατανάλωση ξυλόζης προερχόμενη από υδρόλυμα οξιάς σε διάστημα επώασης 220 ωρών με επανατροφοδότηση υδρολύματος στις 120 ώρες.



Εικόνα 3.47. Κατανάλωση ολικών σακχάρων (TRS) προερχόμενων από υδρόλυμα οξιάς σε διάστημα επώασης 220 ωρών με επανατροφοδότηση υδρολύματος στις 120 ώρες. Ως καλλιέργεια ελέγχου ορίστηκε η ανάπτυξη σε κρυσταλλική κυτταρίνη.

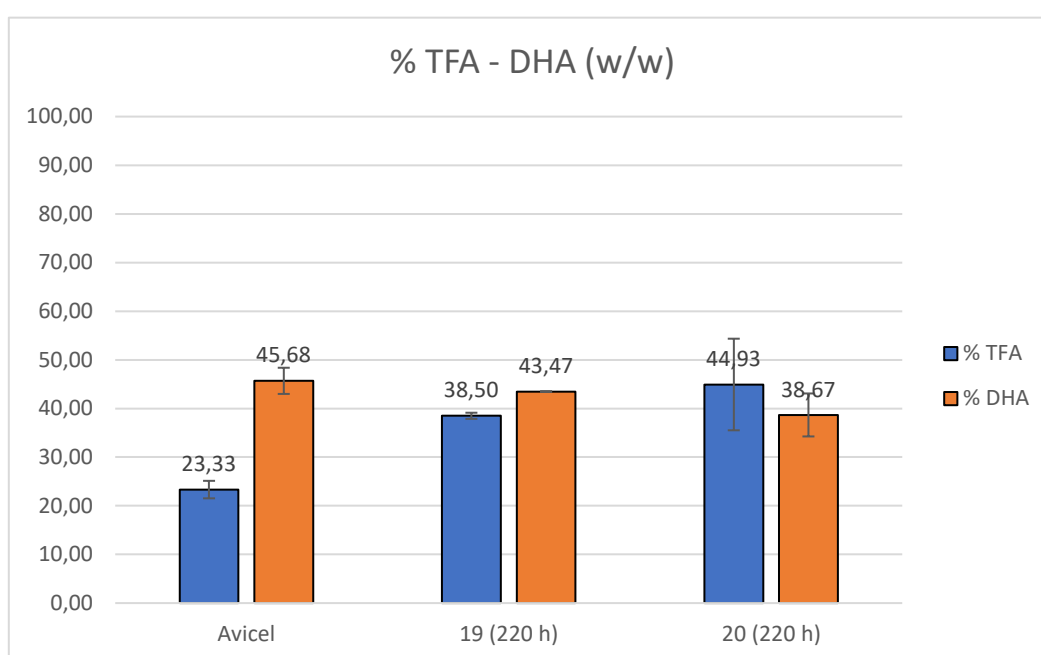
Από την Εικόνα 3.45, Εικόνα 3.46 και Εικόνα 3.47 καθίσταται φανερή η δυνατότητα κατανάλωσης γλυκόζης και ξυλόζης και, συνεπώς, των ολικών σακχάρων από τον μικροοργανισμό ύστερα από την προσθήκη νέα τροφοδοσίας σακχάρων από υδρόλυση. Η απότομη αύξηση της συγκέντρωσης που παρατηρείται στις 120 ώρες και στα τρία γραφήματα αντιπροσωπεύει την προσθήκη της φρέσκιας τροφοδοσίας στην καλλιέργεια. Η συμπεριφορά ως προς την κατανάλωση γλυκόζης, ξυλόζης και ολικών σακχάρων είναι ίδια μεταξύ των δύο καλλιεργειών υδρολυμάτων 19 και 20. Στις 120 ώρες η γλυκόζη έχει καταναλωθεί πλήρως από τον μικροοργανισμό στην καλλιέργεια με υδρόλυμα κρυσταλλικής κυτταρίνης.

#### 3.3.5.4 Παραγωγή ω-3 λιπαρών οξέων

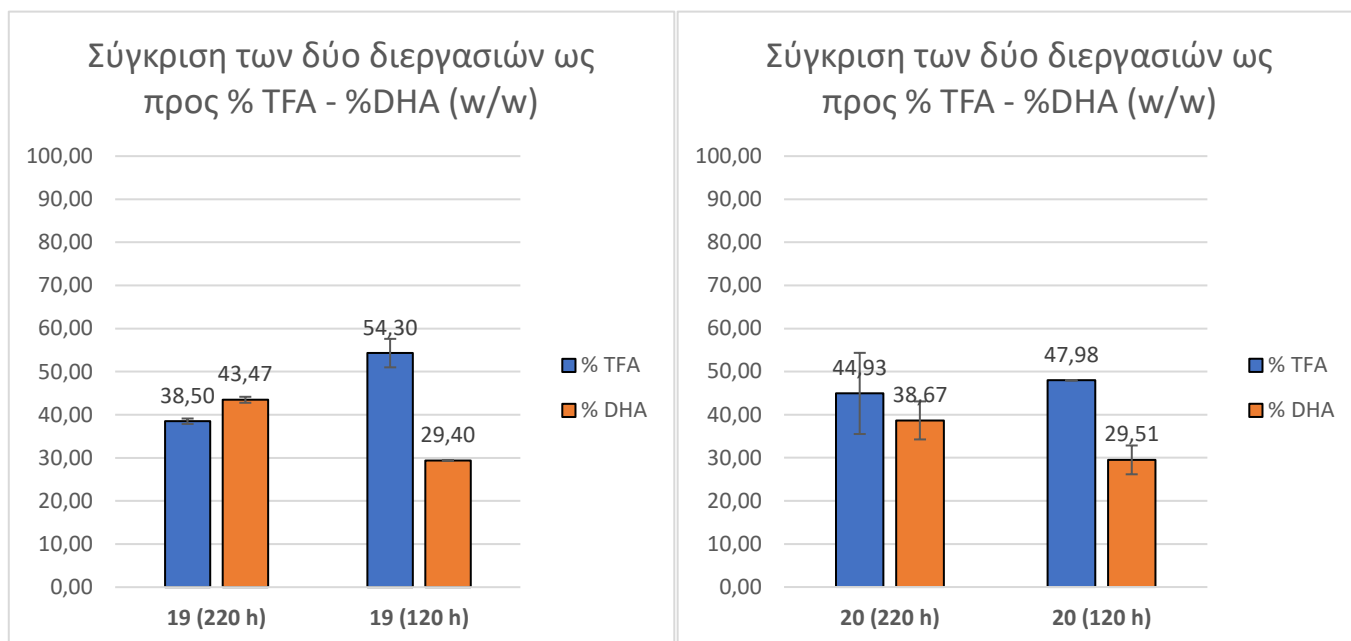
Η βιομάζα κυττάρων, τα λιπαρά οξέα και το DHA που λαμβάνεται για τις καλλιέργειες των υδρολυμάτων 19 και 20 αφορούν τις 220 ώρες επώασης. Τα αντίστοιχα μεγέθη για την ανάπτυξη σε υδρόλυμα κρυσταλλικής κυτταρίνης λαμβάνονται έπειτα από επώαση για 120 ώρες. Περαιτέρω δεδομένα για την ποιοτική και ποσοτική σύσταση των λαμβανόμενων λιπαρών διατίθεται στο Παράρτημα.

Πίνακας 3.15 Βιομάζα κυττάρων, ολικά λιπαρά οξέα (TFA) και DHA που παράγονται από καλλιέργειες *C.cohnii* σε διεργασία ημιδιαλείποντος έργου SHF με σάκχαρα προερχόμενα από υδρόλυμα οξιάς, στους 23°C για 220 ώρες. Παρατίθενται τα αντίστοιχα μεγέθη για ανάπτυξη σε υδρόλυμα κρυσταλλικής κυτταρίνης, με επώαση για 120 ώρες.

(#)	Βιομάζα (g/lt)	mg βιομάζας/g καταναλωθέντων σακχάρων	% TFA (w/w)	TFA (g/lt)	%DHA (w/w)	DHA (g/lt)
<b>Avicel</b>	<b>5,57</b>	355,26	<b>23,33</b>	1,30	<b>45,68</b>	0,59
<b>19 (220 h)</b>	<b>10,28</b>	280,41	<b>38,50</b>	3,96	<b>43,47</b>	1,72
<b>20 (220 h)</b>	<b>12,71</b>	285,66	<b>44,93</b>	5,71	<b>38,67</b>	2,21



Εικόνα 3.48. Ποσοστό ολικών παραγόμενων λιπαρών οξέων ως προς τη βιομάζα των κυττάρων, και ποσοστό DHA ως προς τα ολικά παραγόμενα λιπαρά οξέα κατά βάρος, που λαμβάνεται για διεργασία ημιδιαλείποντος έργου παραγωγής ω-3 λιπαρών οξέων από μικροφύκος *C.cohnii*. Η ανάπτυξη λαμβάνει χώρα σε υδρόλυμα προκατεργασμένης οξιάς για 220 ώρες και επανατροφοδότηση της καλλιέργειας με φρέσκο υδρόλυμα στις 120 ώρες. Ως καλλιέργεια ελέγχου χρησιμοποιήθηκε η ανάπτυξη σε σάκχαρα προερχόμενα από κρυσταλλική κυτταρίνη με επώαση για 120 ώρες.



Εικόνα 3.49. Σύγκριση της SHF διεργασίας διαλείποντος (επώαση 120 ώρες, χωρίς επανατροφοδότηση) και ημιδιαλείποντος έργου (επώαση 220 ώρες, επανατροφοδότηση στις 120 ώρες) για την παραγωγή ω-3 λιπαρών οξέων από σάκχαρα του υδρολύματος 19 (αριστερά) και 20 (δεξιά)

Όπως μπορεί να παρατηρηθεί, η προσθήκη φρέσκου υδρολύματος στις καλλιέργειες στις 120 ώρες και η επώαση του συστήματος για 220 ώρες συνολικά, οδηγεί σε σημαντικά υψηλότερες λαμβανόμενες κυτταρικές συγκεντρώσεις από αυτές της γλυκόζης (βλ. Πίνακας 3.13) και της γλυκόζης από υδρόλυση κρυσταλλικής κυτταρίνης. Και για τις δύο καλλιέργειες ημιδιαλείποντος έργου, η τελική βιομάζα των κυττάρων ξεπερνά τα 10 g/L. Η τιμή αυτή είναι αρκετά υψηλότερη από αυτή που λαμβάνεται για τη διεργασία διαλείποντος έργου με τα ίδια υδρολύματα, όπου για το υδρόλυμα 19 φτάνει τα 7,9 g/L και για το 20 τα 8,6 g/L (βλ. Πίνακας 3.11). Από την Εικόνα 3.49 παρατηρείται ότι με διεργασία ημιδιαλείποντος έργου λαμβάνονται βιομάζες με χαμηλότερη περιεκτικότητα σε λιπαρά (%TFA κ.β.), που όμως είναι κατά πολύ πλουσιότερες σε DHA, που αποτελεί και το ζητούμενο. Έτσι προκύπτει ότι η σχέση ποιότητας – ποσότητας λιπαρών είναι αντιστρόφως ανάλογη. Οι τελικές συγκεντρώσεις DHA που λαμβάνονται είναι πολύ υψηλότερες από αυτές που λαμβάνονται σε διαλείποντος έργου διεργασία. Αξίζει να σημειωθεί ότι τα ποσοστά DHA που λαμβάνονται για την ημιδιαλείποντος διεργασία με προσθήκη υδρολύματος βιομάζας 19 είναι πολύ κοντινά σε αυτά της κρυσταλλικής κυτταρίνης, και μάλιστα συνιστούν το 40% κ.β. των ολικών παραγόμενων λιπαρών.

Όσον αφορά την ανάπτυξη σε υδρόλυμα κρυσταλλικής κυτταρίνης, οι βιομάζες που λαμβάνονται είναι χαμηλές και συνιστούν περίπου το ήμισυ των κυτταρικών συγκεντρώσεων που λαμβάνονται από την ημιδιαλείποντος έργου διεργασία. Χαμηλό είναι, επίσης, το περιεχόμενο των κυττάρων σε λιπαρά. Ωστόσο, η περιεκτικότητά τους σε DHA είναι πολύ υψηλή και ξεπερνά το 45% κ.β. Τα ποσοστά αυτά είναι πιο υψηλά από τα αντίστοιχα με ανάπτυξη σε καθαρή γλυκόζη.

# 4 ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ ΚΑΙ ΣΥΖΗΤΗΣΗ

## 4.1 ΥΔΡΟΛΥΣΕΙΣ ΒΙΟΜΑΖΩΝ

Στα πλαίσια της παρούσα εργασίας επιχειρήθηκε η παραγωγή προϊόντων προστιθέμενης αξίας με πρώτη ύλη σάκχαρα προερχόμενα από λιγνοκυτταρινούχα βιομάζα, η οποία έχει υποστεί προκατεργασία με ήπια υγρή οργανολυτική οξείδωση υπό ποικίλες συνθήκες. Οι συνθήκες αυτές αφορούν τον χρησιμοποιούμενο διαλύτη, την εφαρμοζόμενη πίεση και θερμοκρασία, καθώς και τον χρόνο της προκατεργασίας. Ως καταλύτης σε κάθε περίπτωση προκατεργασίας χρησιμοποιείται αέριο  $O_2$ .

Η μεταβολή των παραμέτρων προκατεργασίας όπως η συγκέντρωση ή πίεση του καταλύτη (αν πρόκειται για αέριο), η συγκέντρωση του διαλύτη, η θερμοκρασία της αντίδρασης και ο χρόνος αντίδρασης, είναι δυνατό να δημιουργήσει μια σειρά υποστρωμάτων με ποικίλες ευαισθησίες στην ενζυμική υδρόλυση από περίπου 35% έως 100% μετατροπή και περιεκτικότητες σε λιγνίνη (Del Rio, et al., 2010). Συνεπώς, η εύρεση των κατάλληλων συνθηκών που οδηγούν σε ένα εύκολα αποδομήσιμο κυτταρινούχο υλικό καθίσταται μεγίστης σημασίας για τα μετέπειτα στάδια αξιοποίησης της βιομάζας που είναι η ενζυμική υδρόλυση και η ζύμωση. Βέβαια, οι συνθήκες αυτές είναι διαφορετικές για κάθε τύπο βιομάζας, σκληρού ή μαλακού ξύλου. Στην προκειμένη περίπτωση, οι πούλπες που προμηθευτήκαν προέρχονταν από οξιά, που αποτελεί σκληρού τύπου ξύλο, και πεύκο, που αποτελεί μαλακού τύπου ξύλο.

### 4.1.1 Οξιά

Όσον αφορά την οξιά, η μέγιστη υδρολυσιμότητα παρατηρήθηκε για προκατεργασία με διαλύτη αιθανόλη (EtOH), σε αναλογία 50/50% με νερό, πίεση  $O_2$  12 bar, θερμοκρασία 175°C, και για χρόνο 60 λεπτών (δείγμα **10**: 71,6% κυτταρίνη, 17,98% ημικυτταρίνη, 6,36% λιγνίνη), με πλήρη υδρόλυση της κυτταρίνης στις 72 ώρες και τελική συγκέντρωση ολικών σακχάρων 125,12 g/L. Μέχρι στιγμής, δεν υπάρχουν καταγεγραμμένες πειραματικές μελέτες με τη συγκεκριμένο μέθοδο προκατεργασίας για ξύλο οξιάς. Υπάρχουν αναφορές για χρήση οξέων  $H_3PO_4$  και  $H_2SO_4$  ως καταλύτες προκατεργασίας, αντί  $O_2$ , σε διάφορες περιεκτικότητες (Kalogiannis, et al., 2018). Στη μελέτη του Καλογιάννη, ενζυμική υδρόλυση έλαβε χώρα σε συγκέντρωση στερεών 2% κ.β. (εδώ 9% κ.β.), σε 50 mM ρυθμιστικό διάλυμα κιτρικού άλατος (pH 5), φορτίο ενζύμου 8,4 mg / g υποστρώματος (παραπλήσιο με της παρούσας εργασίας) και χρήση ίδιου εμπορικού ενζύμου Cellic® CTec 2, συγκέντρωσης 100 mg/mL. Η υψηλότερη μετατροπή κυτταρίνης σε γλυκόζη σημειώθηκε για την προκατεργασία οξιάς με χρήση  $H_3PO_4$ , σε περιεκτικότητα 5,6% κ.β, με αναλογία διαλυτών EtOH-H<sub>2</sub>O 60:40, στην ίδια θερμοκρασία και χρόνο με την παρούσα μελέτη (175°C, 60 min). Αυτή ανιχνεύτηκε μετά από 48 ώρες υδρόλυσης και άγγιξε το 68,1%.

Η ήπια οργανολυτική οξείδωση με χρήση αιθανόλης ως διαλύτη και καταλύτη  $H_2SO_4$  έχει εφαρμοστεί επιτυχώς και σε άλλες βιομάζες μαλακής ξυλείας, όπως λεύκα (Pan, et al., 2006). Οι βέλτιστες συνθήκες προκατεργασίας που επιφέρουν υψηλή ανάκτηση



κυτταρίνης (περίπου 88%) και μετατροπή κυτταρίνης σε μονασκαχαρίτες (περίπου 85% μετά από 48 ώρες ενζυμικής υδρόλυσης) για το εν λόγω υπόστρωμα ήταν για θερμοκρασία 180°C, 60 λεπτά, 1,25% H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> και 60% (v/v) EtOH, που είναι αρκετά κοντινές με αυτές που βρέθηκαν για την οξιά στην παρούσα εργασία.

Η ήπια οργανολυτική οξείδωση με χρήση O<sub>2</sub> έχει εφαρμοστεί επιτυχώς και σε πούλπες άλλων λιγνοκυτταρινούχων βιομαζών, όπως ζαχαροκάλαμου, παρουσιάζοντας αξιολογικά αποτελέσματα. Η ενζυμική υδρόλυση με χρήση ίδιου εμπορικού σκευάσματος, στην ίδια θερμοκρασία και pH ρυθμιστικού διαλύματος κιτρικού, υψηλότερης συγκέντρωσης (1 M), με ενζυμικό φορτίο 14.9 mg/g και 8% DM ανέδειξε υψηλή υδρολυσιμότητα γλουκανών σε παρόμοια προκατεργασμένο υπόλειμμα σαχαροκάλαμου (EtOH-H<sub>2</sub>O 60:40, πίεση O<sub>2</sub> 15 bar, θερμοκρασία 160°C και χρόνο 80 λεπτά). Η υδρολυσιμότητα των γλουκανών έφτανε το 93,3%, και η τελική συγκέντρωση γλυκόζης και ξυλόζης τα 60,3 g/L (Li, et al., 2018).

Ικανοποιητικά αποτελέσματα, επίσης, ως προς την ενζυμική υδρόλυση, παρουσίασε και η οργανολυτική προκατεργασία ξύλου οξιάς με διαλύτη ακετόνη (ACO). Για τον εν λόγω διαλύτη, εξετάστηκαν δύο περιπτώσεις προκατεργασίας. Η πρώτη αφορά σε αρχική πίεση O<sub>2</sub> 25 bar, θερμοκρασία 175°C και χρόνο 120 min (δείγμα 8), ενώ η δεύτερη σε αρχική πίεση O<sub>2</sub> 12 bar, θερμοκρασία 175°C και χρόνο 60 min (δείγμα 9). Όσον αφορά στο αποτέλεσμα της ενζυμικής υδρόλυσης, και οι δύο προκατεργασίες επίφεραν σχεδόν πλήρη υδρόλυση του υλικού κατά το πέρας των 72 ωρών (δείγμα 9: 107,39 ± 7,67 % και δείγμα 8: 99,69 ± 3,08%). Το αποτέλεσμα αυτό συμφωνεί με προηγούμενες πειραματικές μελέτες που έχουν γίνει όσον αφορά την ενζυμική υδρόλυση ξύλου οξιάς που έχει προκατεργαστεί με την ίδια μέθοδο. Συγκεκριμένα, για προκατεργασία ίδια με αυτή που εφαρμόστηκε στο δείγμα 8 (αναλογία διαλυτών 1:1, 25 bar, 175°C, 120 λεπτά) και ενζυμική υδρόλυση με ένζυμο Cellic® CTec2, 50 ° C, 100 mM ρυθμιστικό διάλυμα κιτρικού-φωσφορικού pH 5,0, ενζυμικό φορτίο 9 mg/g υποστρώματος και παραπλήσια συγκέντρωση στερεών 13% (w/v) (σε αντίθεση με την παρούσα εργασία που εφαρμόστηκε 9%), επιτεύχθηκε μετατροπή κυτταρίνης ύστερα από 48 ώρες υδρόλυσης 85,1% (στην παρούσα περίπτωση 84,73% για 48 ώρες) (Katsimpouras, et al., 2017).

Αξίζει να σημειωθεί, επίσης, ότι το δείγμα 10, για το οποίο παρατηρήθηκε η μέγιστη μετατροπή κυτταρίνης, χαρακτηρίζεται από σχετικά υψηλό περιεχόμενο σε λιγνίνη (6,36%) σε σχέση με υπόλοιπα δείγματα. Προηγούμενες πειραματικές μελέτες έχουν δείξει ότι η περιεκτικότητα ενός δεδομένου υποστρώματος σε υπολειμματική λιγνίνη δεν σχετίζεται πάντα με την ευκολία ενζυμικής υδρόλυσης αυτού του υποστρώματος (Del Rio, et al., 2010).

Χαμηλότερη υδρολυσιμότητα παρατηρήθηκε για το δείγμα οξιάς που είχε υποστεί προκατεργασία με οργανικό διαλύτη τετραϋδροφουράνιο (THF), σε πίεση O<sub>2</sub> 16 bar, θερμοκρασία 175°C, και χρόνο 120 λεπτά (δείγμα 2). Ωστόσο, για κάθε περίπτωση προκατεργασίας σε οξιά, οι υδρολυόμενες πούλπες εμφανίζουν υψηλή υδρολυτική ικανότητα, καθιστώντας την ήπια οργανολυτική οξείδωση ενδιαφέρουσα μέθοδο για την παραλαβή υψηλών κλασμάτων γλυκόζης.

### 4.1.2 Πεύκο

Όσον αφορά το πεύκο, η μέγιστη υδρολυσιμότητα παρατηρήθηκε για προκατεργασία με διαλύτη αιθανόλη (EtOH), σε αναλογία 50/50% με νερό, πίεση O<sub>2</sub> 16 bar, θερμοκρασία 175°C, και για χρόνο 60 λεπτών, με μετατροπή κυτταρίνης 70,5% (δείγμα 12: ). Όμοια με την οξιά, δεν υπάρχουν καταγεγραμμένες πειραματικές μελέτες με χρήση O<sub>2</sub> ως καταλύτη, παρά μόνο οργανικών οξέων, όπως θειικό (Pan, et al., 2007). Σε σχετική πειραματική μελέτη του Pan, πεύκο προερχόμενο από τον Καναδά (Lodgepole pine, *Pinus contorta*) προκατεργάστηκε σε μία ποικιλία αναλογίας διαλυτών EtOH-H<sub>2</sub>O θερμοκρασιών, χρόνων προκατεργασίας και συγκέντρωσης καταλύτη. Βρέθηκε ότι οι υψηλότερες αποδόσεις ενζυμικής υδρόλυσης (περίπου 97% για 48 ώρες υδρόλυσης) ήταν για πεύκο που είχε προκατεργαστεί σε θερμοκρασία 170 °C, χρόνο 60 min, καταλύτη 1.1% H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, και 65% (v/v) EtOH. Οι συνθήκες αυτές δεν διαφέρουν πολύ από τις εφαρμόζουσες, παρά μόνο στην επιλογή του καταλύτη και την εφαρμόζουσα αναλογία όγκου οργανικού διαλύτη - νερού. Ωστόσο, αξίζει να σημειωθεί ότι η ενζυμική υδρόλυση πραγματοποιήθηκε με διαφορετικό εμπορικό σκεύασμα από της παρούσας μελέτης.

Για διαλύτη EtOH, παρατηρήθηκε ότι με εφαρμογή υψηλής θερμοκρασίας (175°C) και για πίεση 16 bar, ο χρόνος προκατεργασίας επηρεάζει την ενζυμική υδρόλυση του πεύκου, και μάλιστα μεγαλύτερες μετατροπές λαμβάνονται για τους μικρότερους χρόνους. Επίσης, για διαλύτη THF, η εφαρμογή υψηλότερων θερμοκρασιών οδηγεί σε καλύτερες υδρολυσιμότητες για τα προκατεργασμένα δείγματα πεύκου.

Χαμηλότερη δυνατότητα υδρόλυσης παρουσιάστηκε για το δείγμα πεύκου που είχε προηγούμενος υποβληθεί σε προκατεργασία με οργανικό διαλύτη THF, σε αναλογία 50/50% με νερό, πίεση O<sub>2</sub> 16 bar, θερμοκρασία 150°C και χρόνο 120 λεπτά (δείγμα 17), με μετατροπή μόλις 30,16%.

### 4.1.3 Σύγκριση απόδοσης υδρόλυσης οξιάς - πεύκου

Αξιοσημείωτες είναι οι διαφορές που σημειώνονται ως προς την απόδοση της υδρόλυσης μεταξύ ξύλου οξιάς και πεύκου, με τις μετατροπές της πρώτης να είναι σημαντικά υψηλότερες από της δεύτερης. Μάλιστα, σε όλα τα δείγματα οξιάς πάνω από το 70% της περιεχόμενης κυτταρίνης έχει μετατραπεί σε ζυμώσιμα σάκχαρα στις 72 ώρες της υδρόλυσης, ενώ σε αυτά του πεύκου οι αποδόσεις κυμαίνονται περίπου από 30-50%, με εξαίρεση το δείγμα 12 που σημειώνει και την υψηλότερη μετατροπή (70,5%). Σύμφωνα με τη βιβλιογραφία, η ημικυτταρίνη και λιγνίνη που απαντώνται σε βιομάζα μαλακής ξυλείας είναι χημικά πιο ανθεκτικές σε σύγκριση με εκείνες του σκληρού ξύλου, με αποτέλεσμα να μην απομακρύνονται το ίδιο αποτελεσματικά κατά την οργανολυτική προκατεργασία (Ramos, 2003). Το υψηλό περιεχόμενό τους σε λιγνίνη και ημικυτταρίνη έχει ως αποτέλεσμα χαμηλές αποδόσεις κατά την ενζυμική υδρόλυση (Park, et al., 2010). Ωστόσο, και για τις δύο περιπτώσεις βιομάζας, η EtOH αποτελεί τον διαλύτη που ευνοεί την απελευθέρωση γλυκόζης από το κυτταρινούχο υλικό.

#### 4.1.4 Σύγκριση απόδοσης ακατέργαστης-προκατεργασμένης βιομάζας

Και για τα δύο είδη βιομάζας, μαλακού και σκληρού ξύλου, οι μετατροπές των αντίστοιχων προκατεργασμένων υλικών ήταν κατά πολύ υψηλότερες από των απροκατέργαστων. Μάλιστα, για τις πούλπες που είχαν προκατεργαστεί με διαλύτη EtOH υπό τις βέλτιστες συνθήκες, η απόδοση σε σάκχαρα ανά g βιομάζας ήταν 8,64 φορές υψηλότερη από του απροκατέργαστου υλικού για την οξιά (δείγμα 10), ενώ για το πεύκο αντίστοιχα, (δείγμα 12), 14,91 φορές. Κατά συνέπεια, η προκατεργασία συνιστά κρίσιμο στάδιο για την αποτελεσματική αξιοποίηση της βιομάζας.

## 4.2 ΠΑΡΑΓΩΓΗ ΓΑΛΑΚΤΙΚΟΥ ΟΞΕΟΣ ΑΠΟ *LACTOBACILLUS DELBRUECKII* ΜΕ ΔΙΕΡΓΑΣΙΑ SSF

Η παραγωγή γαλακτικού οξέος από γαλακτικά βακτήρια εξετάστηκε για σάκχαρα οξιάς και πεύκου, που είχαν υποστεί διαφορετική προκατεργασία, και παρουσίαζαν υψηλή υδρολυσιμότητα. Τα αποτελέσματα έδειξαν ότι η παραγωγή γαλακτικού οξέος για σκληρού τύπου βιομάζα, όπως η οξιά, συμβαδίζει με την υδρολυσιμότητα. Συγκεκριμένα, για τα υποστρώματα με την υψηλότερη απόδοση σακχαροποίησης επιτεύχθηκαν και οι υψηλότερες αποδόσεις παραγωγής γαλακτικού οξέος (Βιομάζα 23 και 25), λαμβάνοντας υπόψιν τα πειραματικά σφάλματα, ενώ για το λιγότερο υδρολύσιμο υπόστρωμα παρουσιάστηκε και η μικρότερη απόδοση (Βιομάζα 13) (βλ. Πίνακας 3.3). Εξάιρεση φαίνεται να αποτελεί το υπόστρωμα 7, για το οποίο δεν σημειώνονται ιδιαίτερα υψηλές μετατροπές κυτταρίνης αλλά ωστόσο παρουσιάζει σχετικά υψηλή απόδοση.

Όσον αφορά την επίδραση διαφόρων παραμέτρων προκατεργασίας στην απόδοση, παρατηρήθηκε ότι για προκατεργασία με διαλύτη ακετόνη (ACO) σε δεδομένη πίεση και θερμοκρασία, η απόδοση παραγωγής γαλακτικού οξέος επηρεάζεται από τον χρόνο, και μάλιστα οι μικρότεροι χρόνοι οδηγούν σε πιο ευνοϊκά υποστρώματα. Όσον αφορά τη θερμοκρασία, δεν παρουσιάζεται ιδιαίτερη διαφορά ως προς την απόδοση για το ίδιο σύστημα διαλύτη (ACO) και συνθηκών πίεσης και χρόνου. Για διαλύτη αιθανόλη, τα υποστρώματα που έχουν προκατεργαστεί σε υψηλότερες πιέσεις εμφανίζουν και υψηλότερες αποδόσεις παραγωγής γαλακτικού οξέος. Ως λιγότερο αποτελεσματική προκατεργασία για υποστρώματα που προορίζονται για SSF διεργασία παραγωγής γαλακτικού οξέος κρίνεται εκείνη σε διαλύτη τετραϋδροφουράνιο, σε χαμηλή πίεση και θερμοκρασία και υψηλούς χρόνους (βιομάζα 13).

Όσον αφορά την παραγωγή γαλακτικού οξέος από σάκχαρα προερχόμενα από μαλακού τύπου βιομάζα, όπως πεύκο, αυτή φαίνεται να μη συμβαδίζει απόλυτα με την υδρολυσιμότητα. Ενώ υψηλότερη υδρολυσιμότητα παρατηρήθηκε για το δείγμα πεύκου 12, όπως παρουσιάστηκε σε προηγούμενη ενότητα, την υψηλότερη απόδοση γαλακτικού οξέος σημείωσε το δείγμα 13, με την χαμηλότερη υδρολυσιμότητα από τα

καλύτερα δείγματα που επιλέχθηκαν. Επίσης, το εν λόγω δείγμα χαρακτηρίζεται από τα υψηλότερα κλάσματα κυτταρίνης σε σχέση με τα υπόλοιπα δείγματα πεύκου που επιλέχθηκαν. Άξιο ενδιαφέροντος είναι, ωστόσο, ότι και σε αυτήν την περίπτωση διεργασίας SSF, η υψηλότερη απόδοση επιτυγχάνεται για προκατεργασία πούλπας με διαλύτη ακετόνη (ACO), για ίδιο χρόνο και πίεση με την οξιά. Κατά συνέπεια, η ακετόνη μπορεί αποτελεσματικά να χρησιμοποιηθεί ως διαλύτης προκατεργασίας για σκληρού και μαλακού τύπου βιομάζες που προορίζονται για SSF διεργασίες παραγωγής γαλακτικού οξέος.

Συγκρίνοντας τα δύο είδη βιομάζας ως δυνητικές πηγές άνθρακα για διεργασία SSF προς παραγωγή γαλακτικού οξέος, ως πιο αποτελεσματική βιομάζα κρίνεται η οξιά, καθώς για δεδομένη προκατεργασία επιφέρει πολύ υψηλότερες αποδόσεις παραγωγής γαλακτικού οξέος από αυτές του πεύκου.

Ανάμεσα στις διάφορες πούλπες οξιάς και πεύκου που χρησιμοποιήθηκαν ως στερεές τροφοδοσίες για την παραγωγή γαλακτικού οξέος από *L.delbrueckii*, με ταυτόχρονη σακχαροποίηση και ζύμωση, ξεχώρισαν από τα δείγματα οξιάς το 23, σημειώνοντας αποδόσεις παραγωγής γαλακτικού οξέος υψηλότερες από 70% κ.β., ενώ από τα δείγματα πεύκου, το 13. Αυτά συνοψίζονται στον παρακάτω Πίνακα.

Πίνακας 4.1 Τα καλύτερα υποστρώματα οξιάς και πεύκου ως προς την παραγωγή γαλακτικού οξέος.

Βιομάζα (#)	Είδος βιομάζας	Μέθοδος Προκατεργασίας	% Κυτταρίνη	% Ημικυτταρίνη	Συγκέντρωση γαλακτικού οξέος (g/L)	mg γαλακτικού οξέος/g βιομάζας	%Απόδοση (g/g)
23	Οξιά	H <sub>2</sub> O/ACO (50/50%), O <sub>2</sub> 16 bar, 175°C, 60 min	85,41	11,45	63,49	705	74,41
13	Πεύκο	H <sub>2</sub> O/ACO (50/50%), O <sub>2</sub> 16 bar, 175°C, 60 min	82,75	10,13	40,06	445	45,57

Τα παραπάνω αποτελέσματα αφορούν σε επώαση 168 ωρών. Όπως προκύπτει, η παραγωγή γαλακτικού οξέος φτάνει τα 0,71 g ανά g προκατεργασμένης βιομάζας για προκατεργασμένη οξιά και συγκεντρώσεις που ξεπερνούν τα 60 g/L, που είναι αρκετά αξιόλογες. Παρόμοιες διεργασίες SSF με αξιοποίηση ποικίλων υποστρωμάτων λιγνοκυτταρινούχου βιομάζας και χρήση γαλακτικού βακτηρίου *Lb.delbrueckii* έχουν πραγματοποιηθεί από άλλες ερευνητικές ομάδες. Σε διεργασία SSF όπου ως πρώτη ύλη χρησιμοποιήθηκαν φύτρες αλάφα, προκατεργασμένων με θερμό νερό, ο *L.delbrueckii* ήταν ικανός να παράγει 0,59 g γαλακτικού οξέος ανά g βιομάζας, με αποδόσεις που έφταναν μόλις το 35% της θεωρητικής, και συγκεντρώσεις γαλακτικού 35,4 g/L (Sreenath, et al., 2001). Σε διεργασία SSF που χρησιμοποιήθηκε α-κυτταρίνη ως υπόστρωμα, η παραγωγή γαλακτικού οξέος έφτασε τα 65 g/L, με θεωρητική απόδοση μόλις 18% (Iyer & Lee, 1999). Ωστόσο, σε ημιδιαλείποντος έργου διεργασία SSF από την ίδια ομάδα, που έλαβε χώρα σε βιοαντιδραστήρα δύο ζωνών, χρησιμοποιήθηκε switchgrass που είχε προκατεργαστεί με υγρή αμμωνία. Η συνολική απόδοση γαλακτικού οξέος έφτασε το 77% της θεωρητικής (Iyer & Lee, 1999). Ακόμη, σάκχαρα προερχόμενα από λιγνοκυτταρινούχα βιομάζα έχουν χρησιμοποιηθεί σε

διαφορετικού είδους ζυμώσεις. Σε βυθισμένη ζύμωση, όπου ως υπόστρωμα χρησιμοποιήθηκε το υγρό κλάσμα από υδροθερμική προκατεργασία καλαμιού μολάσας, ο ίδιος μικροοργανισμός ήταν ικανός να παράγει 55.89 g/L γαλακτικό οξύ, και κατ'όπιν βελτιστοποίησης των συνθηκών, 84,5 g/L (Srivastava, et al., 2015).

Δεδομένου ότι στην παρουσία εργασία εφαρμόστηκε διεργασία SSF διαλείποντος έργου, τα αποτελέσματα που προέκυψαν είναι αξιόλογα και επιδέχονται περιθώριο βελτίωσης. Μάλιστα, οι αποδόσεις που επιτεύχθηκαν με σάκχαρα προερχόμενα από οξιά και πεύκο είναι κατά πολύ υψηλότερες από αυτές που σημειώθηκαν για σάκχαρα αλφάλφα και α-κυτταρίνης από τις άλλες ομάδες. Το γεγονός αυτό αναδύκει τη δυναμικότητα της οξιάς και του πεύκου ως πηγές σακχάρων για μια οικονομικά βιώσιμη και αποτελεσματική διεργασία SSF παραγωγής γαλακτικού οξέος.

Ωστόσο, οι αποδόσεις και παραγωγικότητες της παρούσας μελέτης είναι χαμηλότερες από τις μελέτες που αφορούν τη χρήση αμυλούχων λιγνοκυτταρινούχων υποστρωμάτων. Σε πείραμα όπου ακατέργαστη κασάβα χρησιμοποιήθηκε ως στερεή τροφοδοσία, σε συγκέντρωση 15% (w/v), για παραγωγή γαλακτικού οξέος από τον ίδιο μικροοργανισμό, με χρήση α-αμυλασών ως υδρολυτικά ένζυμα, επιτεύχθηκε μετατροπή 94% και συγκεντρώσεις γαλακτικού οξέος 81,9 g/L (John, et al., 2006). Παρόμοια αποτελέσματα λήφθηκαν και για σπασμένους κόκκους ρυζιού ως πηγή σακχάρων (Συγκέντρωση γαλακτικού 79.0 g/L, απόδοση 81%) (Nakano, et al., 2012). Τα αποτελέσματα αυτά είναι υψηλότερα, αλλά συγκρίσιμα με αυτά που επιτυγχάνονται στην εν λόγω μελέτη για τα υποστρώματα οξιάς. Κάτι τέτοιο, όμως, είναι αναμενόμενο καθώς η λιγνοκυτταρινούχα βιομάζα είναι πιο δύσκολα ζυμώσιμη από την αμυλούχα βιομάζα, λόγω της σύνθετης και περίπλοκης δομής της (Abdel-Rahman, et al., 2013). Για την αποτελεσματική αξιοποίησή της, απαιτείται προκατεργασία, που, όμως, για τις περισσότερες μεθόδους έχει σαν αποτέλεσμα το σχηματισμό ανασταλτικών παραπροϊόντων. Αυτά αφορούν φαινολικές ενώσεις που παράγονται από την αποικοδόμηση της λιγνίνης, ενώσεις φουρανίου όπως φουρφοουράλη και 5-υδροξυμεθυλοφουρφοουράλη (HMF) που παράγονται από αποικοδόμηση σακχάρων πεντοζών και εξοζών αντίστοιχα, αλειφατικά οξέα (οξικό οξύ, μυρμηκικό οξύ και λεβουλινικό οξύ) που προκύπτουν ως αποτέλεσμα της υδρόλυσης των ακετυλομάδων των ημικυτταρινών, ανόργανα ιόντα και βιοαλκοόλες. Οι αναστολές αυτοί σχηματίζονται ή απελευθερώνονται κατά τη διάρκεια της υδρόλυσης της λιγνοκυτταρινούχου βιομάζας και αναστέλλουν σε μεγάλο βαθμό τη διαδικασία ζύμωσης επηρεάζοντας την κυτταρική ανάπτυξη, τις ενζυμικές δραστηριότητες και την παραγωγή γαλακτικού οξέος. Παρ' όλα αυτά, η αξιοποίησή της συνίσταται καθώς αποτελεί φθηνή, μη εδωδιμη πηγή, σε αντίθεση με το άμυλο, και μπορεί να δώσει λύση σε πολλά περιβαλλοντολογικά ζητήματα (Abdel-Rahman & Sonomoto, 2016).

Σαν επιπλέον συμπέρασμα μπορεί να εξαχθεί η αναποτελεσματικότητα της διεργασίας με χρήση ακατέργαστου υλικού ως πηγή σακχάρων. Και για τα δύο είδη βιομάζας, οι αποδόσεις γαλακτικού οξέος ήταν χαμηλότερες από 25% (18,54% για την οξιά και 23,27% για το πεύκο). Μάλιστα, οι αποδόσεις για τα δύο διαφορετικά είδη βιομάζας είναι αρκετά κοντινές, που σημαίνει ότι η απόδοση του τελικού προϊόντος εξαρτάται σημαντικά από την επιλογή της εφαρμοζόμενης προκατεργασίας. Με επιλογή της κατάλληλης μεθόδου προκατεργασίας μπορεί να επιτευχθεί πάνω από 100% αύξηση της απόδοσης σε κάθε είδος βιομάζας.

## 4.3 ΠΑΡΑΓΩΓΗ Ω-3 ΛΙΠΑΡΩΝ ΟΞΕΩΝ ΑΠΟ *CRYPTHOCODINIUM COHNII*

### 4.3.1 Ανάπτυξη και παραγωγή ω-3 λιπαρών οξέων με χρήση καθαρών σακχάρων

Σε πρώτο στάδιο, εξετάστηκε η ικανότητα ανάπτυξης του ετερότροφου μικροφύκου σε καλλιέργειες αναδεδυόμενης φιάλης με καθαρά σάκχαρα ως πηγή άνθρακα. Η επώαση έγινε σε θερμοκρασία 23°C, για 120 ώρες, σε μέσο με 2 g/L εκχύλισμα ζύμης και 25 g/L θαλασσινά άλατα. Ως πηγή άνθρακα για τις καλλιέργειες χρησιμοποιήθηκε γλυκόζη, ξυλόζη αραβινόζη και μαννόζη.

Η μέτρηση της κυτταρικής πυκνότητας με θολοσιμετρία έδειξε ότι ο μικροοργανισμός αναπτύσσεται καλά σε γλυκόζη. Το αποτέλεσμα αυτό συμφωνεί με προηγούμενες πειραματικές μελέτες στις οποίες έχει χρησιμοποιηθεί ως πηγή άνθρακα γλυκόζη (de Swaaf, et al., 1999; Vazhappilly & Chen, 1998). Μάλιστα, η ανάπτυξη σε γλυκόζη εμφάνισε σημαντική υπεροχή από την αντίστοιχη σε ξυλόζη. Η ανάπτυξη σε μαννόζη και αραβινόζη ήταν πολύ χαμηλή και ακολουθούσε και για τα δύο σάκχαρα τον ίδιο ρυθμό. Σύμφωνα με προηγούμενες πειραματικές μελέτες, ο μικροοργανισμός δεν μπορεί να αναπτυχθεί σε αραβινόζη και αλδόζη (Beam & Himes, 1980), επιβεβαιώνοντας το προηγούμενο συμπέρασμα.

Η παραλαμβανόμενη βιομάζα κυττάρων μετά το πέρας των 168 ωρών της επώασης ήταν 9,67 g/L για τη γλυκόζη, με λιπιαδικό περιεχόμενο 43,03% κ.β. και ποσοστό σε DHA 34,88% κ.β. Το αποτέλεσμα αυτό βρίσκεται εντός του πειραματικού εύρους που κυμαίνεται από 30-50% κ.β. (de Swaaf, et al., 1999). Όσον αφορά στις καλλιέργειες των υπόλοιπων καθαρών σακχάρων, οι παραλαμβανόμενες βιομάζες ήταν αρκετά χαμηλότερες και ξεπερνούσαν ελαφρώς το 1 g/L. Ωστόσο, το περιεχόμενο τους σε λιπαρά ήταν αρκετά υψηλό, πάνω από 45% κ.β. για τη μαννόζη και την αραβινόζη και 37,32% κ.β. για την ξυλόζη. Παρ' όλα αυτά, αποτελούν αναποτελεσματικές πηγές άνθρακα ως προς την παραγωγή DHA καθώς ευνοούν την παραγωγή άλλων λιπαρών οξέων, όπως C18 και C18:1, με τα ποσοστά του DHA να είναι αρκετά πιο χαμηλά από το θεωρητικό εύρος.

### 4.3.2 Ανάπτυξη και παραγωγή ω-3 λιπαρών οξέων σε γλυκόζη παρουσία άλλων ουσιών

Σε δεύτερο στάδιο μελετήθηκε η ικανότητα ανάπτυξης και παραγωγής DHA με ταυτόχρονη παρουσία γλυκόζης και ξυλόζης σε ίση ποσότητα στην καλλιέργεια. Τα αποτελέσματα έδειξαν ότι παρουσία πεντοζών, ο μικροοργανισμός μπορεί να αναπτύσσεται αποτελεσματικά και να καταναλώνει γλυκόζη, με μικρότερο όμως ρυθμό απ' ότι σε καθαρή γλυκόζη. Οι κυτταρικές βιομάζες που λαμβάνονται κατά το πέρας της επώασης είναι μεν κατά το ήμισυ χαμηλότερες από τις αντίστοιχες σε καθαρή

γλυκόζη (4,27 g/L), αλλά το ποσοστό τους σε λιπαρά και DHA παραμένει το ίδιο. Κατά συνέπεια, η ταυτόχρονη παρουσία εξοζών (γλυκόζης) και πεντοζών (ξυλόζης) δεν έχει καταβολική επίδραση στη ανάπτυξη του μικροφύκου, και άρα στην παραγωγή λιπαρών.

Ακόμη, η παρουσία φουρανίων σε καλλιέργεια γλυκόζης ανέστειλε την ανάπτυξη του μικροοργανισμού και την παραγωγή λιπαρών. Συγκεκριμένα, παρουσίας 0,5 g/L HMF, το σύστημα οδηγήθηκε σε 26,8% χαμηλότερη παραγωγή βιομάζας και 40,8% χαμηλότερα επίπεδα DHA.

Η παρουσία μικρής ποσότητας υγρού κλάσματος λιγνίνης, προερχόμενου από ήπια οργανολυτική οξείδωση, στο μέσο της καλλιέργειας δεν επηρέασε αρνητικά την κυτταρική ανάπτυξη και λιποσυσσώρευση. Αντίθετα, βάσει των πειραματικών αποτελεσμάτων που λήφθηκαν, η ανάπτυξη φαίνεται να ευνοείται παρουσία αυτής καθώς το σύστημα οδηγήθηκε σε αύξηση της βιομάζας κατά 12,3% στο πέρας της επώασης. Τα ποσοστά DHA παρέμειναν στα ίδια επίπεδα (περίπου 30% κ.β.), με παραλαβή, όμως, υψηλότερης τελικής συγκέντρωσης. Αναφορές έχουν δείξει ότι η λιγνίνη που προέρχεται από οργανολυτική προκατεργασία λιγνοκυτταρινούχου βιομάζας δρα ως αντιοξειδωτικό για διάφορες διεργασίες ζυμώνσεων (Pan, et al., 2006; Sannigrahi, et al., 2010). Ως εκ τούτου, είναι πιθανό να ενισχύεται ο μεταβολισμός του μικροφύκου, και άρα η παραγωγή DHA.

### 4.3.3 Επίδραση του λόγου C/N στην ανάπτυξη και συσσώρευση λιπαρών

Σε επόμενο στάδιο, εξετάστηκε η επίδραση της συγκέντρωσης εκχυλίσματος ζύμης στην ανάπτυξη και στο λιπιδιακό περιεχόμενο των κυττάρων *C.cohnii*. Η καλλιέργεια έγινε σε μέσο αποτελούμενο από 35 g/L καθαρή πηγή γλυκόζης και 25 g/L θαλασσινά άλατα, σε ένα εύρος συγκεντρώσεων εκχυλίσματος ζύμης (0,67, 1,33 και 2 g/L). Τα αποτελέσματα έδειξαν ότι με αύξηση της συγκέντρωσης του περιεχόμενου αζώτου στην καλλιέργεια αυξάνεται η κυτταρική ανάπτυξη (μεγαλύτερη θολοσιμότητα, εκφρασμένη σε OD). Συγκεκριμένα, σε συγκέντρωση 0,67 g/L η τελική συγκέντρωση ξηρής βιομάζας άγγιξε τα 5,28 g/L. Με εφαρμογή διπλάσιας αρχικής συγκέντρωσης εκχυλίσματος παρατηρείται αύξηση της τελικής βιομάζας κατά 56%, και για τριπλάσια συγκέντρωση, αύξηση κατά 96,6%. Κατά συνέπεια, αύξηση στην αναλογία C / N είχε αρνητική επίδραση στο ξηρό βάρος των κυττάρων. Τα αποτελέσματα αυτά συμφωνούν με προηγούμενες πειραματικές μελέτες, στις οποίες δεν εφαρμόζονται σχετικά υψηλές συγκεντρώσεις εκχυλίσματος ζύμης (de Swaaf, et al., 1999).

Όσον αφορά το περιεχόμενο των λιπαρών σε DHA, αυτό παρουσιάζεται πολύ υψηλό για τη χαμηλότερη συγκέντρωση εκχυλίσματος ζύμης (**40,21% κ.β.**) και παρεμφερές για τις δύο επόμενες συγκεντρώσεις, κοντά στο 27% κ.β. Για τα ολικά λιπαρά, μέγιστο λιπιδιακό περιεχόμενο σημειώνεται για τη συγκέντρωση 1,33 g/L (54% κ.β.), έπειτα για τα 2 g/L (43,96% κ.β.) και τέλος για τα 0,67 g/L (42,12% κ.β.). Σύμφωνα με προηγούμενες πειραματικές μελέτες, χαμηλή αρχική περιεκτικότητα σε άζωτο είναι

ανεπαρκής για να υποστηρίξει την ανάπτυξη του *C. cohnii*, αλλά ωστόσο ευνοϊκή για την αύξηση της συσσώρευσης λιπιδίων και του περιεχόμενου DHA στα λιπαρά (Liu, et al., 2018). Στην εν λόγω περίπτωση, υψηλότερο ποσοστό DHA σημειώνεται μεν για τη χαμηλότερη συγκέντρωση εκχυλίσματος ζύμης, όπως προβλέπει η θεωρία, αλλά αυτό δεν ισχύει για το εύρος συγκεντρώσεων 1.33-2 g/L. Όσον αφορά το περιεχόμενο των κυττάρων σε λιπαρά, αυτό ακολουθεί ακανόνιστη συμπεριφορά. Σαν γενικό συμπέρασμα, η συσσώρευση λιπιδίων στιγματίζεται όταν η πηγή άνθρακα βρίσκεται σε αφθονία και το άζωτο σε έλλειψη (de Swaaf, et al., 1999). Στις καλλιέργειες διαλείποντος έργου, αυτό είναι συνήθως μια διφασική διαδικασία. Η πρώτη φάση χαρακτηρίζεται από ταχεία ανάπτυξη των κυττάρων και ακολουθείται από τη φάση στρες, όπου ο υπόλοιπος άνθρακας κατανέμεται στην παραγωγή λιπιδίων (Taberna, 2008).

Σαν γενικό συμπέρασμα, η ενίσχυση του λόγου C/N αποτελεί μία αποδοτική στρατηγική για την αύξηση του περιεχόμενου DHA στα κύτταρα, αφού στην εν λόγω περίπτωση όταν χρησιμοποιείται υποτριπλάσια συγκέντρωση εκχυλίσματος ζύμης το ποσοστό των λιπαρών σε DHA αυξάνεται κατά 44,74%.

#### 4.3.4 Καλλιέργειες για παραγωγή ω-3 λιπαρών οξέων με χρήση υδρολυμάτων λιγνοκυτταρινούχου βιομάζας

Σε μετέπειτα στάδιο, επιχειρήθηκε η παραγωγή ω-3 λιπαρών οξέων από σάκχαρα, προερχόμενων από υδρολύσεις των καλύτερων υποστρωμάτων των λιγνοκυτταρινούχων βιομαζών. Τα αποτελέσματα έδειξαν ότι ο *C. cohnii* μπορεί να αναπτύσσεται ικανά σε μέσο με τέτοιες πηγές άνθρακα, με OD που σε γενικό μέσο όρο ξεπερνά το 6. Μάλιστα, σε κάποιες περιπτώσεις υποστρωμάτων η κυτταρική ανάπτυξη ήταν υψηλότερη από την αντίστοιχη της γλυκόζης, πιθανότατα λόγω παρουσίας λιγνίνης, που όπως αναφέρθηκε διαθέτει αντιοξειδωτική δράση και βοηθά στην ανάπτυξη. Ο μικροοργανισμός μπορούσε αποτελεσματικά να καταναλώνει ταυτόχρονα γλυκόζη και ξυλόζη, προερχόμενες από τα υδρολύματα των βιομαζών, με μικρότερη βέβαια προτίμηση στην ξυλόζη. Τα αποτελέσματα και για τις δύο σειρές υδρολυμάτων λιγνοκυτταρινούχου βιομαζών που χρησιμοποιήθηκαν ως πηγές άνθρακα συνοψίζονται παρακάτω.

Πίνακας 4.2 Συγκεντρωτικός πίνακας αποτελεσμάτων ζύμωσης για την καλλιέργεια *C. cohnii* σε σάκχαρα προκατεργασμένης οξιάς, πεύκου, απροκατεργαστής οξιάς και κρυσταλλικής κυτταρίνης (Avicel). Για σύγκριση παρατίθενται και τα αντίστοιχα αποτελέσματα για ανάπτυξη σε καθαρή πηγή γλυκόζης.

(#)	Συνθήκες Προκατεργασίας	Βιομάζα (g/lt)	mg βιομάζας/g καταναλωθέντων σακχάρων	% TFA (w/w)	TFA (g/lt)	% DHA (w/w)	DHA (g/lt)
4	H <sub>2</sub> O/THF (50/50%), O <sub>2</sub> 8 bar, 175°C, 120 min	8,74	353,29	61,76	5,40	26,62	1,44
5	H <sub>2</sub> O/ACO (50/50%), O <sub>2</sub> 12 bar, 175°C, 120 min	6,48	360,12	45,93	2,97	27,69	0,82



6	H <sub>2</sub> O/EtOH (50/50%), O <sub>2</sub> 12 bar, 175°C, 120 min	<b>8,57</b>	336,11	<b>54,81</b>	4,70	<b>28,62</b>	1,35
7	H <sub>2</sub> O/THF (50/50%), O <sub>2</sub> 12 bar, 175°C, 120min	<b>7,39</b>	320	<b>44,18</b>	3,27	<b>27,23</b>	0,89
8	H <sub>2</sub> O/ACO (50/50%), O <sub>2</sub> 25 bar, 175°C, 120min	<b>7,71</b>	312	<b>38,22</b>	2,95	<b>21,99</b>	0,65
9	H <sub>2</sub> O/ACO (50/50%), O <sub>2</sub> 12 bar, 175°C, 60min	<b>7,76</b>	304	<b>33,45</b>	2,60	<b>28,96</b>	0,75
10	H <sub>2</sub> O/EtOH (50/50%), O <sub>2</sub> 12 bar, 175°C, 60min	<b>8,72</b>	325	<b>39,06</b>	3,41	<b>28,24</b>	0,96
11	H <sub>2</sub> O/THF (50/50%), O <sub>2</sub> 12 bar, 175°C, 60min	<b>7,98</b>	328	<b>35,71</b>	2,85	<b>29,50</b>	0,84
12 (Πεύκο)	H <sub>2</sub> O/EtOH (50/50%), O <sub>2</sub> 16 bar, 175°C, 60min	<b>5,47</b>	294	<b>38,66</b>	2,12	<b>24,76</b>	0,52
19	H <sub>2</sub> O/THF (50/50%), O <sub>2</sub> 16 bar, 150°C, 120 min	<b>7,90</b>	372,52	<b>54,30</b>	4,29	<b>29,40</b>	1,26
20	H <sub>2</sub> O/EtOH (50/50%), O <sub>2</sub> 16 bar, 175°C, 60 min	<b>8,60</b>	345,32	<b>47,98</b>	4,13	<b>29,51</b>	1,22
Avicel	-	<b>5,57</b>	355,26	<b>23,33</b>	1,30	<b>45,68</b>	0,59
Untreated (Οξιά)	-	<b>0,99</b>	490,57	<b>35,96</b>	0,36	<b>14,70</b>	0,05
Γλυκόζη	-	<b>9,67</b>	306,38	<b>43,03</b>	4,16	<b>34,88</b>	1,45

Ανάλογα με την προκατεργασία της βιομάζας από την οποία προήλθαν τα σάκχαρα, λαμβάνονται και διαφορετικές κυτταρικές συγκεντρώσεις καθώς και διαφορετικά ποσοστά λιπαρών και DHA. Υδρολύματα με σχετικά υψηλή συγκέντρωση γλυκόζης και περιεχόμενο σε λιγνίνη, όπως το 4 (27,40 g/L γλυκόζη και 6,47% λιγνίνη στη στερεή πούλπα), το 10 (34,4 g/L γλυκόζη και 6,36% λιγνίνη στη στερεή πούλπα) και το 20 (32,34 g/L γλυκόζη και 5,5% λιγνίνη στη στερεή πούλπα) οδηγούν σε υψηλές κυτταρικές συγκεντρώσεις, επιβεβαιώνοντας το συμπέρασμα ότι η λιγνίνη ευνοεί την κυτταρική ανάπτυξη. Παρουσία υψηλού κλάσματος λιγνίνης στο υδρόλυμα ευνοείται και η παραγωγή DHA, όπως παρουσιάζεται για τις καλλιέργειες με τα υδρόλυματα 19 (6,4% λιγνίνη), 20 (5,5% λιγνίνη) και 11 (7,95% λιγνίνη), που παρουσιάζουν τα υψηλότερα ποσοστά DHA κ.β. Αξίζει να σημειωθεί ότι η χαμηλότερη παραγωγή DHA παρουσιάζεται σε υδρόλυμα βιομάζας που έχει προκατεργαστεί με την υψηλότερη πίεση O<sub>2</sub> (Υδρόλυμα 8), πιθανότατα λόγω δημιουργίας παραπροϊόντων οξειδωσης που δεν ευνοούν την παραγωγή DHA, αλλά ενός άλλου λιπαρού, του C18.

Σαν γενική εικόνα, για τα σάκχαρα προερχόμενα από υδρόλυση οξιάς (δείγματα 4-11), οι ξηρές βιομάζες κυττάρων που λήφθηκαν ήταν σχετικά υψηλές και κυμαίνονταν από 6,48-8,74 g/L, που είναι αρκετά κοντινές σε αυτές της γλυκόζης (9,67 g/L), υποδηλώνοντας ότι ο μικροοργανισμός μπορεί να αναπτύσσεται εξίσου καλά σε τέτοιου είδους πηγή άνθρακα.

Για τα σάκχαρα προερχόμενα από πεύκο, η ξηρή βιομάζα που λαμβάνεται είναι αρκετά χαμηλότερη, πιθανότατα λόγω της μικρότερης αρχικής συγκέντρωσης της γλυκόζης στο υδρόλυμα ή παρουσίας παρεμποδιστών.

Το περιεχόμενο σε λιπαρά οξέα ήταν επίσης αξιόλογο σε επίπεδα από 33,45-61,76% κ.β., με το χαμηλότερο να σημειώνεται για τα σάκχαρα από τη βιομάζα 9, και το υψηλότερο για εκείνα από τη 4. Ως προς την παραγωγή DHA, τα ποσοστά κυμαίνονται από 21,99% κ.β. που σημειώνεται για τα σάκχαρα της βιομάζας 8 μέχρι και 29,51% κ.β. για τη βιομάζα 20, που προσεγγίζει αρκετά τα επίπεδα της γλυκόζης.

Από τα παραπάνω αποτελέσματα συμπεραίνεται ότι υψηλό λιπιδιακό περιεχόμενο δεν συνεπάγεται απαραίτητα και υψηλό περιεχόμενο σε DHA. Το αποτέλεσμα αυτό συμφωνεί με προηγούμενες πειραματικές μελέτες (Chalima, et al., 2019). Η σχέση ποσότητας – ποιότητας λαδιού, μάλιστα, φαίνεται να είναι αντιστρόφως ανάλογη. Αυτό καθίσταται περισσότερο αισθητό για τα λιπαρά που προέρχονται από καλλιέργεια σε υδρόλυμα κρυσταλλικής κυτταρίνης, αφού τα TFA συνιστούν μόλις το 23,33% κ.β. της κυτταρικής βιομάζας, με τα ποσοστά DHA να ξεπερνάνε το 45% κ.β. των TFA.

Αξίζει να σημειωθεί ακόμη, η αναποτελεσματικότητα της διεργασίας με σάκχαρα προερχόμενα από απροκατέργαστο υλικό, αφού παρ' όλο που λαμβάνεται βιομάζα πλούσια σε λιπαρά, οι κυτταρικές συγκεντρώσεις είναι πολύ χαμηλές (<1 g/L) και τα ποσοστά DHA υποδιπλάσια από αυτά που επιτυγχάνονται από υδρολύματα προκατεργασμένων βιομαζών.

Σε γενικές γραμμές τα ποσοστά TFA και DHA που παράγονται από σάκχαρα υδρολυμάτων κυμαίνονται στο θεωρητικό εύρος, που προβλέπει ικανότητα παραγωγής TFA μέχρι και 70% της ξηρής βιομάζας σε κάποιες περιπτώσεις (Chalima, et al., 2019), ενώ για το DHA 25-60% κ.β. των ολικών λιπαρών (Mendes, et al., 2007). Μάλιστα, αξιόλογος αριθμός δειγμάτων παράγει ποσοστά DHA πάνω από 28% κ.β., με το υψηλότερο να φτάνει **29,51%** κ.β. από 32,34 g/L αρχική γλυκόζη υδρολύματος. Τα αποτελέσματα αυτά είναι αρκετά ικανοποιητικά, όσον αφορά τα πειράματα που έχουν πραγματοποιηθεί με εναλλακτικές πηγές άνθρακα για την παραγωγή DHA. Σε παρόμοια μελέτη που διεξήχθη στο Εργαστήριο Βιοτεχνολογίας με χρήση διαφόρων οργανικών οξέων, όπως οξικό, προπιονικό και βουτυρικό, τα υψηλότερα ποσοστά λιπαρών σε DHA ήταν 28,4 % κ.β. για αρχική συγκέντρωση οξικού οξέος 30 g / L, 38,6 % κ.β. για 10 g / L προπιονικό και 21,9 ± 5,1% κ.β. για 10 g / L βουτυρικό (Chalima, et al., 2019). Ωστόσο, τα αποτελέσματα αυτά παραμένουν χαμηλά σε σχέση με άλλων μελετών όπου χρησιμοποιήθηκαν εναλλακτικές πηγές άνθρακα για την καλλιέργεια του *C.cohnii*.

Σε δουλειά του Ratledge και της ομάδας του, το ίδιο στέλεχος αναπτύχθηκε σε διάφορες συγκεντρώσεις οξικού οξέος, με τα ολικά λιπαρά οξέα να ξεπερνούν το 40% κ.β. της βιομάζας, και το ποσοστό σε DHA να κυμαίνεται από 40-50% (Ratledge, et al., 2001). Σε άλλη μελέτη, ως πηγή άνθρακα χρησιμοποιήθηκε σιρόπι πολτού χαρουπιού, και τα αποτελέσματα από καλλιέργειες διαλείποντος έργου κατέδειξαν λιπιδιακό περιεχόμενο 63,1% κ.β., με το 52,9% κ.β. να συνίσταται από DHA (Mendes, et al., 2007). Μελέτες, επίσης, έχουν πραγματοποιηθεί με εμπορικό σιρόπι χουρμά ως πηγή άνθρακα, που υπό τις βέλτιστες συνθήκες, λήφθηκαν λιπαρά με 32% κ.β. DHA,

με χαμηλές ωστόσο συγκεντρώσεις λιπαρού οξέος, μόλις 0,42 g/L (Rumiani, et al., 2018).

Ωστόσο, οι περισσότερες μελέτες που αφορούν την παραγωγή DHA από εναλλακτικές πηγές άνθρακα, αφορούν διεργασίες ημιδιαλείποντος έργου, στις οποίες λαμβάνονται μεγαλύτερες κυτταρικές συγκεντρώσεις, και υψηλότερες συγκεντρώσεις DHA.

#### 4.3.5 Καλλιέργειες ημι-διαλείποντος έργου με χρήση σακχάρων από υδρολύματα βιομαζών

Για την ενίσχυση της παραγωγικότητας σε DHA πραγματοποιήθηκαν καλλιέργειες ημιδιαλείποντος χρησιμοποιώντας σάκχαρα βιομαζών που παρουσίαζαν καλό περιεχόμενο σε DHA στις καλλιέργειες διαλείποντος έργου (19 και 20). Τα αποτελέσματα έδειξαν ότι με την προσθήκη επιπλέον υδρολύματος στις 120 ώρες, ο μικροοργανισμός μπορεί αποτελεσματικά να αναπτύσσεται και να καταναλώνει τη γλυκόζη και ξυλόζη του υδρολύματος, χωρίς να παρουσιάζεται κάποια παρεμπόδιση στην ανάπτυξή του. Με επώαση για 220 ώρες, η κυτταρική συγκέντρωση αυξήθηκε κατά 30,1% στην καλλιέργεια με σάκχαρα υδρολύματος 19, και κατά 47,8% στην 20. Οι λαμβανόμενες κυτταρικές συγκεντρώσεις ήταν υψηλότερες από 10 g/L, φτάνοντας τα 10,28 και 12,71 g/L για τις καλλιέργειες με τα υδρολύματα 19 και 20 αντίστοιχα. Το λιπιδιακό περιεχόμενο ήταν χαμηλότερο από αυτό στις διαλείποντος έργου καλλιέργειες, όμως, πολύ πλουσιότερο σε DHA. Για την καλλιέργεια σε υδρολύμα βιομάζας 19, το ποσοστό DHA ενισχύθηκε κατά 47,8% ενώ για την 20, κατά 31%. Οι λαμβανόμενες συγκεντρώσεις ολικών λιπαρών και DHA ήταν επίσης υψηλότερες, με την υψηλότερη συγκέντρωση DHA να ξεπερνά τα 2,2 g/L (βιομάζα 20). Αξίζει να σημειωθεί ότι για ακόμη μία φορά, επιβεβαιώνεται η αντίστροφη σχέση ποιότητας – ποσότητας λαδιού αφού υψηλότερο περιεχόμενο σε DHA παρουσιάζεται για τα κύτταρα που είναι φτωχότερα σε συνολικά λιπαρά. Κατά αυτή τη διεργασία, λαμβάνεται υψηλής ποιότητας έλαιο, με το DHA να καταλαμβάνει σχεδόν το ήμισυ της ποσότητας των συνολικών λιπαρών (43,5% κ.β-βιομάζα 19). Αξίζει να σημειωθεί ότι τα επίπεδα αυτά ξεπερνούν τα αντίστοιχα με ανάπτυξη σε γλυκόζη, και είναι αρκετά κοντινά σε αυτά με ανάπτυξη σε κρυσταλλική κυτταρίνη.

Η αύξηση αυτή ως προς το περιεχόμενο των λιπαρών σε DHA συμφωνεί με προηγούμενες πειραματικές μελέτες σε ημιδιαλείποντος έργου καλλιέργειες. Επίσης, το αποτέλεσμα αυτό, όσον αφορά την ποιότητα των λιπαρών είναι πολύ ικανοποιητικό. Σε άλλες ημιδιαλείποντος έργου διεργασίες που έχουν πραγματοποιηθεί με χρήση εναλλακτικών πηγών άνθρακα για την ανάπτυξη του ίδιου στελέχους, το περιεχόμενο των λιπαρών σε DHA έφτασε το 33,3% κ.β. με ανάπτυξη σε οξικό οξύ για 144 ώρες, 35,8% κ.β. για ανάπτυξη σε προπιονικό οξύ για 96 ώρες και 31,1% κ.β. σε βουτυρικό για 72 ώρες (Chalima, et al., 2019). Με πηγή άνθρακα σιρόπι χουρμά, η ημιδιαλείποντος έργου διεργασία οδήγησε σε συγκεντρώσεις DHA 5.65 g/L, κατόπιν βελτιστοποίησης των συνθηκών καλλιέργειας (Rumiani, et al., 2018). Επίσης, παρόμοια ποσοστά DHA παρουσιάστηκαν και με χρησιμοποίηση σιρόπι πολτού χαρουπιού, με μέγιστες λαμβανόμενες συγκεντρώσεις DHA 1,9 g/L και ποσοστό λιπαρών σε DHA 48% (Mendes, et al., 2007). Ακόμη, ο de Swaaf και η ομάδα του σε μια αντιπροσωπευτική καλλιέργεια του *C. cohnii* με καθαρή αιθανόλη ως τροφή, αναφέρει λαμβανόμενα ποσοστά DHA 33% κ.β. μετά από 220 ώρες επώασης σε

ημιδιαλείποντος έργου καλλιέργεια (de Swaaf, et al., 2003). Σαν γενικό συμπέρασμα, λοιπόν, οι καλλιέργειες ημιδιαλείποντος έργου αποτελούν μία αποτελεσματική στρατηγική για την αύξηση του λιπιδιακού περιεχόμενου των κυττάρων σε DHA και την παραλαβή υψηλότερων ξηρών βιομαζών.

#### 4.3.6 Σύγκριση με αυτότροφα/μιξότροφα συστήματα

Επιτυχώς, έχουν χρησιμοποιηθεί υδρολύματα λιγνοκυτταρινούχου βιομάζας για την ανάπτυξη και την παραγωγή ω-3 λιπαρών οξέων αυτότροφων μικροφυκών. Χαρακτηριστική περίπτωση αποτελεί η ανάπτυξη του μικροφύκου *Phaeodactylum tricorutum* με πρώτη ύλη σάκχαρα προερχόμενα από προκατεργασμένη δασική βιομάζα από τον Patel και την ομάδα του (Patel, et al., 2019). Για την προκατεργασία της βιομάζας εφαρμόστηκε μία ολοκληρωμένη μέθοδος συνδυασμού οργανολυτικής - έκρηξης ατμού. Ως υποστρώματα χρησιμοποιήθηκαν υδρόλυμα ερυθρελάτης (*Picea abies*), αρχικής συγκέντρωσης γλυκόζης 64.70 g/L και υδρόλυμα σημύδας (*Betula pendula* και *Betula pubescens*), αρχικής συγκέντρωσης γλυκόζης 77.07 g/L. Η ανάπτυξη του μικροφύκου *Phaeodactylum tricorutum* φωτοαυτοατροφικά είχε ως αποτέλεσμα τη διαμόρφωση ενός προφίλ λιπαρών οξέων που συνίσταται από 13,43% EPA (C20: 5) και 1,65% DHA κ.β. . Σε μιξοτροφικές συνθήκες, με εκχύλισμα ζύμης ως πηγή αζώτου και γλυκόζη ως πηγή άνθρακα, υπό συνθήκες περιορισμένου αζώτου (C / N 60) το περιεχόμενο EPA και DHA αυξήθηκε περαιτέρω προς 18,38% και 3,56% κ.β. Υπό συνθήκες ελλιπούς αζώτου, λήφθηκαν συγκεντρώσεις DHA 0,054 g/L με πηγή άνθρακα υδρόλυμα συμήδας και 0,063 g/L με υδρόλυμα ερυθρελάτης. Η συγκέντρωση των ολικών λιπιδίων ήταν 1,26 και 1,29 g/L για κάθε περίπτωση υδρολύματος. Όπως μπορεί να παρατηρηθεί, τα αποτελέσματα αυτά είναι σαφώς πολύ μικρότερα από της παρούσας εργασίας, υποδεικνύοντας τα πλεονεκτήματα της ετεροτροφικής ανάπτυξης. Επιπλέον, η SHF διεργασία παραγωγής DHA με χρήση ετερότροφου μικροφύκου *C.cohnii* δεν οδηγεί στην παραγωγή EPA, το οποίο σύμφωνα με έρευνες θεωρείται επικίνδυνο για την ανάπτυξη των νεογνών (Pei, et al., 2017).

### 4.4 ΜΕΛΛΟΝΤΙΚΟΙ ΣΤΟΧΟΙ

Στα πλαίσια της παρούσας διπλωματικής εργασίας επιχειρήθηκε η παραγωγή προϊόντων προστιθέμενης αξίας, όπως γαλακτικό οξύ και ω-3 λιπαρά οξέα μέσω διαφορετικών ειδών ζυμώσεων, με πρώτη ύλη σάκχαρα λιγνοκυτταρινούχου βιομάζας. Σε πρώτο στάδιο, όσον αφορά την πρώτη ύλη, προτείνεται περαιτέρω διερεύνηση των συνθηκών προκατεργασίας, όπως η πίεση του οξυγόνου, η θερμοκρασία, η αναλογία των οργανικών διαλυτών, καθώς και ο χρόνος προκατεργασίας ως προς την παραγωγή πουλπών πλούσιων σε κυτταρίνη και με μεγάλη ευαισθησία στην υδρόλυση. Η εξέταση σε ένα μεγαλύτερο εύρος τιμών συνθηκών μπορεί να παράγει έναν αξιολογικό αριθμό πουλπών που δύνηται να παρέχουν αξιόπιστα αποτελέσματα ως προς την επίδραση της προκατεργασίας στην υδρολυσιμότητα. Συστήνεται, επίσης, η χρησιμοποίηση

μεγαλύτερης ποικιλίας λιγνοκυτταρινούχων υποστρωμάτων, όπως βιομάζα μαλακής και σκληρής ξυλείας, καθώς και αγροτικά και αστικά υπολείμματα.

Ακόμη, στην παρούσα εργασία πραγματοποιήθηκε ικανοποιητική παραγωγή γαλακτικού οξέος, μέσω ταυτόχρονης σακχαροποίησης και ζύμωσης, από γαλακτικά βακτήρια. Η παραγωγή, ωστόσο, αφορούσε συστήματα αναδεδυμένης φιάλης. Σε επόμενο στάδιο, προτείνεται να ερευνηθεί η περαιτέρω βελτιστοποίηση του συστήματος με τη μελέτη της επίδρασης άλλων παραμέτρων όπως το ενζυμικό φορτίο, η συγκέντρωση των στερεών, η συγκέντρωση  $\text{CaCO}_3$  στο μέσο, η ανάδευση, καθώς και η επίδραση διαφόρων παρεμποδιστών στην ανάπτυξη του βακτηρίου και την παραγωγή γαλακτικού οξέος. Τέτοιες μελέτες αφορούν τυχόν παρεμπόδιση από το τελικό προϊόν, το υπόστρωμα καθώς και από προϊόντα υδρόλυσης της λιγνοκυτταρινούχου βιομάζας. Σε αμέσως επόμενο στάδιο θα ήταν σκόπιμη η κλιμάκωση της διαδικασίας με επώαση σε βιοαντιδραστήρα και την αριστοποίηση της διεργασίας παραγωγής του γαλακτικού οξέος σε βιοαντιδραστήρα. Η χρήση του βιοαντιδραστήρα θα δώσει τη δυνατότητα για καλύτερο έλεγχο των συνθηκών της καλλιέργειας και μεγαλύτερη παραγωγή τελικού προϊόντος σε λιγότερο χρόνο. Ακόμη, για την ενίσχυση της παραγωγής του γαλακτικού οξέος ενδιαφέρουσα προοπτική αποτελεί η «κατασκευή» θερμοάντοχων γαλακτικών βακτηρίων, μέσω μεθόδων ανασυνδυασμένης γενετικής, που θα υπομένουν τις υψηλές θερμοκρασίες και τις χαμηλές τιμές pH που απαιτεί η υδρόλυση, έτσι ώστε το σύστημα να δουλεύει υπό τις βέλτιστες συνθήκες.

Επίσης, επιτεύχθηκαν υψηλές ξηρές βιομάζες κυττάρων *C. cohnii*, με καλλιέργεια του μικροφύκου σε σάκχαρα προερχόμενα από υδρόλυση προκατεργασμένων λιγνοκυτταρινούχων υποστρωμάτων. Ακόμη, λήφθηκαν ποσοστά DHA κοντινά σε αυτά με καλλιέργεια του μικροφύκου σε γλυκόζη και υψηλότερα για ημιδιαλείποντος έργου διεργασία. Σε επόμενο στάδιο, προτείνεται να ερευνηθεί η περαιτέρω βελτιστοποίηση του συστήματος με τη μελέτη της επίδρασης παραμέτρων όπως η σύσταση του θρεπτικού μέσου, η θερμοκρασία, το pH, η ανάδευση, ο αερισμός, ο λόγος C/N, η στρατηγική της ζύμωσης και άλλα. Ακόμη, περιθώρια βελτιστοποίησης επιδέχεται και η διαδικασία απομόνωσης των λιπαρών οξέων, με μελέτη της αναλογίας των διαφόρων οργανικών διαλυτών που χρησιμοποιούνται για την εκχύλιση αυτών. Σε αμέσως επόμενο στάδιο θα ήταν σκόπιμη η κλιμάκωση της διαδικασίας με επώαση σε βιοαντιδραστήρα και την αριστοποίηση της διεργασίας παραγωγής ω-3 λιπαρών οξέων σε βιοαντιδραστήρα. Η χρήση του βιοαντιδραστήρα θα δώσει τη δυνατότητα για καλύτερο έλεγχο των συνθηκών της καλλιέργειας και μεγαλύτερη παραγωγή τελικού προϊόντος σε λιγότερο χρόνο.

Τέλος, προτείνεται η χρήση του υγρού κλάσματος της προκατεργασίας προκειμένου να επιτευχθεί μια ολιστική προσέγγιση μηδενικής απόρριψης για την αξιοποίηση των ρευμάτων αποβλήτων λιγνοκυτταρινούχων βιομάζας.

## 5 ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

---

Abdel-Rahman, M. A. & Sonomoto, K., 2016. Opportunities to overcome the current limitations and challenges for efficient microbial production of optically pure lactic acid. *Journal of Biotechnology*, Τόμος 236, p. 176–192.

Abdel-Rahman, M. A., Tashiro, Y. & Sonomoto, K., 2013. Recent advances in lactic acid production by microbial fermentation processes. *Biotechnology Advances*, Τόμος 31, p. 877–902.

Adsul, M. G., Varma, A. J. & Gokhale, D. V., 2007. Lactic acid production from waste sugarcane bagasse derived cellulose. *Green Chemistry*, 9(1), pp. 58-62 .

Al-Battashi, H. S. και συν., 2019. Lignocellulosic biomass (LCB): a potential alternative biorefinery feedstock for polyhydroxyalkanoates production. *Reviews in Environmental Science and Bio/Technology*.

Alinia, R., Zabihi, S., Esmailzadeh, F. & Kalajahi, J. F., 2010. Pretreatment of wheat straw by supercritical CO<sub>2</sub> and its enzymatic hydrolysis for sugar production. *Biosystems Engineering*, 107(1), pp. 61-66.

Amidon, T. E. και συν., 2008. Biorefinery: Conversion of Woody Biomass to Chemicals, Energy and Materials. *Journal of Biobased Materials and Bioenergy*, Issue 2, p. 100–120.

Andrić, P., Meyer, A. S., Jensen, P. A. & Dam-Johansen, K., 2010. Effect and Modeling of Glucose Inhibition and In Situ Glucose Removal During Enzymatic Hydrolysis of Pretreated Wheat Straw. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, Τόμος 160, p. 280–297.

ATCC, χ.χ. s.l.: s.n.

Badhan, A., Chadha, B., Kaur, J. & Saini, H. S., 2007. Production of multiple xylanolytic and cellulolytic enzymes by thermophilic fungus *Myceliophthora* sp. IMI 387099. *Bioresource Technology*, 98(3), pp. 504-10.

Barkodia, M., Dahiya, S. & Goyal, S., 2016. Pretreatment of Lignocellulosic Biomass for Bioethanol Production: A Brief. *STM Journals*, 5(2), pp. 1-7.

Beam, A. C. & Himes, M., 1980. Utilization of carbon sources by different strains of *Cryptocodium cohnii* Seligo. *Journal of Protozoology*.

Biocyclopedia, χ.χ. *Estimation of Reducing Sugars by the Dinitro Salicylic Acid (DNS) Method*, s.l.: Biocyclopedia.

biosis, χ.χ. *ΣΑΚΧΑΡΟ GOD/PAP*, s.l.: s.n.

Bjerre, A. B. και συν., 1996. Pretreatment of wheat straw using combined wet oxidation and alkaline hydrolysis resulting in convertible cellulose and hemicellulose. *Biotechnology and Bioengineering*, Τόμος 49, pp. 568-577 .

- Boguta, A. M., Bringel, F., Martinussen, J. & Jensen, P. R., 2014. Screening of lactic acid bacteria for their potential as microbial cell factories for bioconversion of lignocellulosic feedstocks. *Microbial Cell Factories*, Τόμος 13.
- Borshchevskaya, L. N., Gordeeva, T. L., Kalinina, A. N. & Sineokii, S. P., 2016. Spectrophotometric Determination of Lactic Acid. *Journal of Analytical Chemistry*, 71(8), pp. 755-758.
- Buyondo, J. P. & Liu, S., 2011. Lactic acid production by lactobacillus pentosus from wood extract hydrolysate. *Journal of Science & Technology for Forest Products and Processes*, Τόμος 1, pp. 38-47.
- Chalima, A., Hatzidaki, A., Karnaouri, A. & Topakas, E., 2019. *Integration of a dark fermentation effluent in a microalgal-based biorefinery*. s.l.:Applied Energy.
- Chan-Blanco, Y., Bonilla-Leiv, R. A. & Velazquez, C. A., 2003. Using banana to generate lactic acid through batch process fermentation.. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 63(2), pp. 147-52.
- Chen, F., 1996. High cell density culture of microalgae in heterotrophic growth. *Trends In Biotechnology*, 14(11), pp. 421-426.
- Collection, A. T. C., χ.χ. *ATCC Product Sheet: Cryptocodium cohnii (ATCC® 30772™)*. [Ηλεκτρονικό].
- Collection, A. T. C., χ.χ. *ATCC Product Sheet: Lactobacillus delbrueckii subsp. bulgaricus (ATCC® 11842™)*. [Ηλεκτρονικό].
- Daful, A. G. & Görgens, J. F., 2017. Techno-economic analysis and environmental impact assessment of lignocellulosic lactic acid production. *Chemical Engineering Science*, Τόμος 162, p. 53–65.
- Dapía, S., Santos, V. & Parajó, J. C., 2002. Study of formic acid as an agent for biomass fractionation. *Biomass and Bioenergy*, 22(3), pp. 213-221.
- Dashtban, M. & Qin, W., 2012. Overexpression of an exotic thermotolerant β-glucosidase in trichoderma reesei and its significant increase in cellulolytic activity and saccharification of barley straw. *Microbial Cell Factories*, Τόμος 11.
- de Jong, E. & Gosselink, R. J., 2014. Lignocellulose-Based Chemical Products. Στο: *Bioenergy Research: Advances and Applications*. s.l.:Elsevier, p. 277–313.
- de Swaaf, M. E., de Rijk, T. C., Eggink, G. & Sijtsma, L., 1999. *Optimisation of docosaehaenoic acid production in batch*. s.l.:Journal of Biotechnology.
- de Swaaf, M. E., Pronk, J. T. & Sijtsma, L., 2003. Fed-batch cultivation of the docosaehaenoic-acid-producing marine alga *Cryptocodium cohnii* on ethanol. *Applied Microbiology and Biotechnology*, Τόμος 61, p. 40–43.
- Del Rio, L. F., Chandra, R. P. & Saddler, J. N., 2010. The Effect of Varying Organosolv Pretreatment Chemicals on the Physicochemical Properties and Cellulolytic Hydrolysis of Mountain Pine Beetle-Killed Lodgepole Pine. *Applied biochemistry and biotechnology*, Τόμος 161, pp. 1-21.

- Ezeilo, U. R., Zakaria, I. I., Huyop, F. & Wahab, R. A., 2017. Enzymatic breakdown of lignocellulosic biomass: the role of glycosyl hydrolases and lytic polysaccharide monoxygenases. *Biotechnology & Biotechnological Equipment*, Τόμος 31, p. 647–662.
- Garde, A., Jonsson, G., Schmidt, A. S. & Ahring, B. K., 2002. Lactic acid production from wheat straw hemicellulose hydrolysate by *Lactobacillus pentosus* and *Lactobacillus brevis*. *Bioresour Technol*, Τόμος 81, p. 217–23.
- Gaurav, N. και συν., 2017. Utilization of bioresources for sustainable biofuels: A Review. *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, Τόμος 73, p. 205–214.
- Gilarranz, M. A., Oliet, M., Rodriguez, F. & Tijero, J., 1999. Methanol-based pulping of eucalyptus globulus. *The Canadian Journal of Chemical Engineering*, 77(3), p. 515–521.
- Goncalves, C. και συν., 2010. Adaptation of dinitrosalicylic acid method to microtiter plates. *Analytical Methods*, 2(12), pp. 2046-2048.
- Gong, C., Goundalkar, M. J., Bujanovic, B. M. & Amidon, T. E., 2012. Evaluation of Different Sulfur-Free Delignification Methods for Hot-Water Extracted Hardwood. *Journal of Wood Chemistry and Technology*, Τόμος 32, p. 93–104.
- Gullon, B., Yanez, R., Alonso, L. J. & Parajo, C. J., 2008. L-Lactic acid production from apple pomace by sequential hydrolysis and fermentation. *Bioresour Technol*, Τόμος 99, p. 308–19.
- Hamilton, M. L., Powers, S., Napier, J. A. & Sayanova, O., 2016. Heterotrophic Production of Omega-3 Long-Chain Polyunsaturated Fatty Acids by Trophically Converted Marine Diatom *Phaeodactylum tricornutum*. *Marine Drugs*, 14(3).
- Huijgen, W. J. J., Reith, J. H. & den Uil, H., 2010. Pretreatment and Fractionation of Wheat Straw by an Acetone-Based Organosolv Process. *Industrial & Engineering Chemistry Research*, 49(20), p. 10132–10140.
- Irmak, S., 2017. Biomass as Raw Material for Production of High-Value Products. Στο: *Biomass Volume Estimation and Valorization for Energy*. s.l.:IntechOpen.
- Isikgor, F. H. & Becer, C. R., 2015. Lignocellulosic Biomass: A Sustainable Platform for Production of Bio-Based Chemicals and Polymers. *Polymer Chemistry*, p. 4497–4559.
- Iyer, P. V. & Lee, Y. Y., 1999. Product inhibition in simultaneous saccharification and fermentation of cellulose into lactic acid. *Biotechnology Letters*, 21(5), p. 371–373.
- Iyer, V. P. & Lee, Y. Y., 1999. Simultaneous saccharification and extractive fermentation of lignocellulosic materials into lactic acid in a two-zone fermentor-extractor system. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, 78(1-3), p. 409–419.
- John, P. R., Nampoothiri, M. K. & Pandey, A., 2006. Simultaneous saccharification and fermentation of cassava bagasse for L-(+)-lactic Acid production using *Lactobacilli*. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, 134(3), pp. 263-272.



- Kalogiannis, K. G. και συν., 2018. Acid Assisted Organosolv Delignification of Beechwood and Pulp Conversion towards High Concentrated Cellulosic Ethanol via High Gravity Enzymatic Hydrolysis and Fermentation. *Molecules*.
- Karnaouri, A. και συν., 2016. Development of Thermophilic Tailor-Made Enzyme Mixtures for the Bioconversion of Agricultural and Forest Residues. *Frontiers in Microbiology*.
- Katsimpouras, C. και συν., 2017. Production of high concentrated cellulosic ethanol by acetone/water oxidized pretreated beech wood. *Biotechnology for Biofuels*.
- Kim, S. & Kim, C. H., 2012. Production of cellulase enzymes during the solid-state fermentation of empty palm fruit bunch fiber. *Bioprocess and Biosystems Engineering*, 35(1–2), p. 61–67.
- Kralovec, J. A., Zhang, S., Zhang, W. & Barrow, C. J., 2012. A review of the progress in enzymatic concentration and microencapsulation of omega-3 rich oil from fish and microbial sources. *Food Chemistry*, Τόμος 131, p. 639–644.
- Kumar, A. K. & Sharma, S., 2017. Recent updates on different methods of pretreatment of lignocellulosic feedstocks: a review. *Bioresources and Bioprocessing*, Issue 4.
- Lenihan, P. και συν., 2010. Dilute acid hydrolysis of lignocellulosic biomass. *Chemical Engineering Journal*, Issue 156, p. 395–403.
- Liu, L. και συν., 2018. Nitrogen Feeding Strategies and Metabolomic Analysis To Alleviate High-Nitrogen Inhibition on Docosaheptaenoic Acid Production in *Cryptocodinium cohnii*. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, Τόμος 66, p. 10640–10650.
- Li, X. και συν., 2018. Oxygen-assisted ethanol organosolv pretreatment of sugarcane bagasse for efficient removal of hemicellulose and lignin. *Cellulose*, Τόμος 25, p. 5511–5522.
- Lu, X., Zhang, Y. & Angelidaki, I., 2009. Optimization of H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>-catalyzed hydrothermal pretreatment of rapeseed straw for bioconversion to ethanol: Focusing on pretreatment at high solids content. *Bioresource Technology*, 100(12), pp. 3048-3053.
- Maitan-Alfenas, G. P., Visser, E. M. & Guimarães, V. M., 2015. Enzymatic hydrolysis of lignocellulosic biomass: converting food waste in valuable products. *Current Opinion in Food Science*, Τόμος 1, pp. 44-49.
- Ma, L. και συν., 2011. Improvement of cellulase activity in *Trichoderma reesei* by heterologous expression of a beta-glucosidase gene from *Penicillium decumbens*. *Enzyme and Microbial Technology*, Τόμος 49 , p. 366–371.
- Marsden, W. L., Gray, P. P., Nippard, G. J. & Quinlan, M. R., 1982. Evaluation of the DNS Method for Analysing Lignocellulosic Hydrolysates. *Journal of Chemical Technology and Biotechnology*, Τόμος 32, pp. 1016-1022.
- Martinez, F. A. C. και συν., 2013. Lactic acid properties, applications and production: A review. *Trends in Food Science & Technology*, Τόμος 30 , pp. 70-83.

- MARTY-TEYSSET, C., DE LA TORRE, F. & GAREL, J.-R., 2000. Increased Production of Hydrogen Peroxide by *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* upon Aeration: Involvement of an NADH Oxidase in Oxidative Stress. *APPLIED AND ENVIRONMENTAL MICROBIOLOGY*, Τόμος 66, p. 262–267.
- Mazzoli, R. και συν., 2014. Towards lactic acid bacteria-based biorefineries. *Biotechnology Advances*, Τόμος 32, pp. 1216-1236.
- Mendes, A. και συν., 2007. Study of docosahexaenoic acid production by the heterotrophic microalga *Cryptocodinium cohnii* CCMP 316 using carob pulpas a promising carbon source. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*.
- Mendes, A. και συν., 2009. *Cryptocodinium cohnii* with emphasis on DHA production: a review. *Journal of Applied Phycology*, 21(2), p. 199–214.
- Mohanram, S. και συν., 2013. Novel perspectives for evolving enzyme cocktails for lignocellulose hydrolysis in biorefineries. *Sustainable Chemical Processes*.
- Moldes, A. B., Torrado, A., Converti, A. & Dominguez, J. M., 2006. Complete bioconversion of hemicellulosic sugars from agricultural residues into lactic acid by *Lactobacillus pentosus*.. *Appl.Biochem.Biotechnol.*, Τόμος 135, pp. 219-227.
- Monrroy, M. και συν., 2010. Bioorganosolv pretreatments of *P. radiata* by a brown rot fungus (*Gloeophyllum trabeum*) and ethanolysis. *Enzyme and Microbial Technology*, 47(1-2), pp. 11-16.
- Mosier, N. και συν., 2005. Features of promising technologies for pretreatment of lignocellulosic biomass. *Bioresource Technology*, Τόμος 96, p. 673–686.
- Nakano, S., Ugwu, C. U. & Tokiwa, Y., 2012. Efficient production of D-(-)-lactic acid from broken rice by *Lactobacillus delbrueckii* using Ca(OH)<sub>2</sub> as a neutralizing agent. *Bioresource Technology*, Τόμος 104, p. 791–794.
- Nazir, Y. και συν., 2018. Optimization of Culture Conditions for Enhanced Growth, Lipid and Docosahexaenoic Acid (DHA) Production of *Aurantiochytrium* SW1 by Response Surface Methodology. *Nature: Scientific reports*.
- Nguyen, T.-A. D. και συν., 2010. Pretreatment of rice straw with ammonia and ionic liquid for lignocellulose conversion to fermentable sugars. *Bioresource Technology*, 101(19), pp. 7432-7438.
- Nguyen, T. Y., Cai, C. M., Kumar, R. & Wyman, C. E., 2015. Co-solvent pretreatment reduces costly enzyme requirements for high sugar and ethanol yields from lignocellulosic biomass. *ChemSusChem*, 8(10), pp. 1716-25.
- Nomiyama, T., Aihara, N., Chitose, A. & Yamada, M., 2014. Biomass as Local Resource. Στο: *Research Approaches to Sustainable Biomass Systems*. s.l.:Elsevier Inc, pp. 7-17.
- Obeng, E. M. και συν., 2017. Lignocellulases: a review of emerging and developing enzymes, systems, and practices. *Bioresources and Bioprocessing*.

- Palmqvist, E. & Hahn-Hägerdal, B., 2000. Fermentation of lignocellulosic hydrolysates. II: inhibitors and mechanisms of inhibition. *Bioresource Technology*, Τόμος 74, pp. 25-33.
- Pan, X. και συν., 2006. Organosolv ethanol lignin from hybrid poplar as a radical scavenger: relationship between lignin structure, extraction conditions, and antioxidant activity.. *Journal of Agriculture and Food Chemistry*, 54(16), pp. 5806-5813.
- Pan, X. και συν., 2007. Pretreatment of Lodgepole Pine Killed by Mountain Pine Beetle Using the Ethanol Organosolv Process: Fractionation and Process Optimization. *Industrial & Engineering Chemistry Research*, Τόμος 46, pp. 2609-2617.
- Pan, X. και συν., 2006. Bioconversion of hybrid poplar to ethanol and co-products using an organosolv fractionation process: optimization of process yields. *Biotechnology and Bioengineering*, 94(5), pp. 851-861.
- Park, N. και συν., 2010. Organosolv pretreatment with various catalysts for enhancing enzymatic hydrolysis of pitch pine (*Pinus rigida*). *Bioresource Technology*, Τόμος 101, p. 7046–7053.
- Patel, A. και συν., 2019. Biosynthesis of Nutraceutical Fatty Acids by the Oleaginous Marine Microalgae *Phaeodactylum tricornutum* Utilizing Hydrolysates from Organosolv-Pretreated Birch and Spruce Biomass. *Marine Drugs*, Τόμος 17.
- Patel, M. A., Ou, M. S., Ingram, L. O. & Shanmugam, K. T., 2005. Simultaneous Saccharification and Co-Fermentation of Crystalline Cellulose and Sugar Cane Bagasse Hemicellulose Hydrolysate to Lactate by a Thermotolerant Acidophilic *Bacillus* sp.. *Biotechnology Progress*, Τόμος 21, pp. 1453-1460.
- Pei, G. και συν., 2017. De novo transcriptomic and metabolomic analysis of docosahexaenoic acid (DHA)-producing *Cryptocodinium cohnii* during fed-batch fermentation. *Algal Research*, Τόμος 26, p. 380–391.
- Ramos, P. L., 2003. The Chemistry Involved in the Steam Treatment of Lignocellulosic Materials. *Química Nova*, Τόμος 26, pp. 863-871.
- Ratledge, C. και συν., 2001. Production of docosahexaenoic acid by *Cryptocodinium cohnii* grown in a pH-auxostat culture with acetic acid as principal carbon source.. *Lipids*, 36(11), pp. 1241-1246.
- Rodrigues, A. C. και συν., 2015. Celluclast and Cellic® CTec2: Saccharification/fermentation of wheat straw, solid-liquid partition and potential of enzyme recycling by alkaline washing.. *Enzyme and Microbial Technology*, Τόμος 79–80, p. 70–77.
- Rosgaard, L. και συν., 2007. Evaluation of minimal *Trichoderma reesei* cellulase mixtures on differently pretreated Barley straw substrates. *Biotechnology Progress*, 23(6), p. 1270–1276.
- Rumiani, L. A., Jalili, H. & Amrane, A., 2018. Enhanced docosahexaenoic acid production by *Cryptocodinium cohnii* under combined stress in two-stage cultivation with date syrup based medium. *Algal Research*, Τόμος 34, pp. 75-81.

- Ryan, L. & Symington, A. M., 2015. Algal-oil supplements are a viable alternative to fish-oil supplements in terms of docosahexaenoic acid (22:6n-3; DHA). *Journal of functional foods*, Τόμος 19, p. 852–858.
- Salapa, I., Katsimpouras, C., Topakas, E. & Sidoras, D., 2017. Organosolv pretreatment of wheat straw for efficient ethanol production using various solvents. *Biomass and Bioenergy*, Issue 100, pp. 10-16.
- Sannigrahi, P., Ragauskas, A. & Miller, S. J., 2010. Lignin Structural Modifications Resulting from Ethanol Organosolv Treatment of Loblolly Pine. *Energy Fuels*, Τόμος 24, p. 683–689.
- Saxena, R. C., Adhikari, D. K. & Goyal, H. B., 2009. *Biomass-based energy fuel through biochemical routes: A review*. s.l.:Elsevier.
- Sharma, A. και συν., 2016. Cellulases: Classification, Methods of Determination and Industrial Applications. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, Τόμος 179, p. 1346–1380.
- Snelders, J. και συν., 2014. Biorefining of wheat straw using an acetic and formic acid based organosolv fractionation process. *Bioresource Technology*, Τόμος 156, pp. 275-282.
- Soni, S. K., Sharma, . A. & Soni, R., 2018. Cellulases: Role in Lignocellulosic Biomass Utilization. Στο: *Methods in Molecular Biology*. 1796 επιμ. s.l.:Springer Science+Business Media, LLC, part of Springer Nature, pp. 3-23.
- Sreenath, H. K., Moldes, A. B., Koegel, R. G. & Straub, R. J., 2001. Lactic acid production by simultaneous saccharification and fermentation of alfalfa fiber. *Journal of Bioscience and Bioengineering*, 92(6), pp. 518-523.
- Srivastava, A. K., Tripathi, A. D., Jha, A. & Sharma, N., 2015. Production, optimization and characterization of lactic acid by *Lactobacillus delbrueckii* NCIM 2025 from utilizing agro-industrial byproduct (cane molasses). *Journal of Food Science and Technology*, Τόμος 52, p. 3571–3578.
- Studer, M. H. και συν., 2011. Lignin content in natural *Populus* variants affects sugar release. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 108(15), p. 6300–6305.
- Sun, F. F. και συν., 2015. Accessory enzymes influence cellulase hydrolysis of the model substrate and the realistic lignocellulosic biomass. *Enzyme and Microbial Technology*, Τόμος 79-80, p. 42–48.
- Sun, F. F. και συν., 2015. The impact of glycerol organosolv pretreatment on the chemistry and enzymatic hydrolyzability of wheat straw. *Bioresource Technology*, Τόμος 187, pp. 354-361.
- Sun, S., Sun, S., Cao, X. & Sun, R., 2016. The role of pretreatment in improving the enzymatic hydrolysis of lignocellulosic materials. *Bioresource Technology*, Τόμος 199, p. 49–58.

- Taberna, E. G., 2008. *Heterotrophic cultivation of microalgae as a source of docosahexaenoic acid for aquaculture*, s.l.: University of Las Palmas de Gran Canaria.
- Tandon, G. D., 2014. Bioproducts From Residual Lignocellulosic Biomass. Στο: *Advances in Biotechnology*. s.l.:Internal Publishing House, pp. 52-75.
- Vazhappilly, R. & Chen, F., 1998. Eicosapentaenoic acid and docosahexaenoic acid production potential of microalgae and their heterotrophic growth. *Journal of the American Oil Chemists' Society*, 75(3), pp. 393-397.
- Wynn, J. και συν., 2010. Single cell oils: microbial and algal oils. Στο: *Production of Single Cell Oils by Dinoflagellates*. s.l.:s.n.
- Xiros, C., Topakas, E. & Christakopoulos, P., 2013. Hydrolysis and fermentation for cellulosic ethanol production. *WIREs Energy and Environment*, Τόμος 2.
- Yang, B., Dai, Z., Ding, S.-Y. & Wyman, C. E., 2011. Enzymatic hydrolysis of cellulosic biomass. *Biofuels*, 2(4), pp. 421-449.
- Yang, J. και συν., 2017. Evaluation of Commercial Cellulase Preparations for the Efficient Hydrolysis of Hydrothermally Pretreated Empty Fruit Bunches. *BioResources: Commercial cellulases action*, 12(4), pp. 7834-7840.
- Zabed, H. M. και συν., 2019. Recent advances in biological pretreatment of microalgae and lignocellulosic biomass for biofuel production. *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, Issue 105 , p. 105–128.
- Zhao, X., Cheng, K. & Liu, D., 2009. Organosolv pretreatment of lignocellulosic biomass for enzymatic hydrolysis. *Applied Microbiology and Biotechnology*, Issue 82, p. 815–827.

## 6 ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ

Πίνακας 6.1 Σύσταση του μέσου ATCC 460 A2E6 που χρησιμοποιήθηκε στις stock καλλιέργειες του μικροφύκου *Cryptosporidium parvum*, όπως αυτή υποδεικνύεται από την American Type Culture Collection

### **Base Medium**

NaCl.....	23.48 g
MgCl <sub>2</sub> x 6H <sub>2</sub> O.....	10.63 g
Na <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> .....	3.92 g
CaCl <sub>2</sub> (anhydrous).....	1.11 g
KCl.....	0.66 g
NaHCO <sub>3</sub> .....	0.19 g
KBr.....	0.1 g
H <sub>3</sub> BO <sub>3</sub> .....	0.03 g
SrCl <sub>2</sub> x 6H <sub>2</sub> O.....	0.04 g
Metal Mixture (see below).....	3.0 ml
FeCl <sub>3</sub> x 6H <sub>2</sub> O.....	0.01 g
Na <sub>2</sub> Glycerophosphate.....	0.15 g
(NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> .....	0.05 g
Tris Buffer.....	3.0 g
Vitamin Solution (see below).....	1.0 ml
K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> .....	0.01 g
Glucose.....	3.0 g
Glutamic Acid.....	1.5 g
DI Water.....	1000 ml

### **Metal Mixture**

Na <sub>2</sub> EDTA.....	1.0 g
FeCl <sub>3</sub> x 6H <sub>2</sub> O.....	0.05 g
H <sub>3</sub> BO <sub>3</sub> .....	1.0 g
MnCl <sub>2</sub> x 4H <sub>2</sub> O.....	0.15 g
ZnCl <sub>2</sub> .....	0.01g
CoCl <sub>2</sub> x 6H <sub>2</sub> O.....	0.005 g
DI Water.....	100 ml

### **Vitamin Solution**

Biotin.....	0.003 g
Thiamine.....	1.0 g
DI Water.....	1000 ml

Πίνακας 6.2 Μετατροπή κυτταρίνης (%), συγκέντρωση γλυκόζης και mg γλυκόζης ανά g βιομάζας, που επιτυγχάνονται ύστερα από 72 ώρες ενζυμικής υδρόλυσης για όλες τις προκατεργασμένες και ακατέργαστες πούλπες οξιάς και πεύκου σε 9% (w/v) DM, 9 mg/g ενζυμικό φορτίο, 100 mM ρυθμιστικού διαλύματος κιτρικού-φωσφορικού άλατος, pH=5.0 και ανάδευση 160 rpm.

Δείγμα Οξιάς	Προκατεργασία βιομάζας	%Κυτταρίνη	%Ημικυτταρίνη	%Λιγνίνη	%Μετατροπή κυτταρίνης	Συγκέντρωση γλυκόζης (mg/mL)	mg γλυκόζης / g βιομάζας
#					72 h		
1	H <sub>2</sub> O/EtOH (50/50%), O <sub>2</sub> 16 bar, 175°C, 120 min	82,58	14,46	2,13	77,11	63,67	707,41
2	H <sub>2</sub> O/THF (50/50%), O <sub>2</sub> 16 bar, 175°C, 120 min	85,16	10,62	2,64	71,11	60,55	672,80
3	H <sub>2</sub> O/EtOH (50/50%), O <sub>2</sub> 8 bar, 175°C, 120 min	75,63	16,38	3,85	81,08	61,32	681,30
4	H <sub>2</sub> O/THF (50/50%), O <sub>2</sub> 8 bar, 175°C, 120 min	76,36	13,58	6,47	78,66	60,06	667,34
5	H <sub>2</sub> O/ACO (50/50%), O <sub>2</sub> 12 bar, 175°C, 120 min	79,5	13,2	1,46	74,46	59,19	657,62
6	H <sub>2</sub> O/EtOH (50/50%), O <sub>2</sub> 12 bar, 175°C, 120 min	80,14	14,36	2,86	79,79	63,94	710,45
7	H <sub>2</sub> O/THF (50/50%), O <sub>2</sub> 12 bar, 175°C, 120 min	80,11	11,39	5,77	97,24	77,89	865,49
8	H <sub>2</sub> O/ACO (50/50%), O <sub>2</sub> 25 bar, 175°C, 120 min	80,28	12,26	1,58	99,69	80,02	889,10
9	H <sub>2</sub> O/ACO (50/50%), O <sub>2</sub> 12 bar, 175°C, 60 min	73,82	16,31	3,86	107,39	79,27	880,77
10	H <sub>2</sub> O/EtOH (50/50%), O <sub>2</sub> 12 bar, 175°C, 60 min	71,6	17,98	6,36	124,87	89,40	993,29
11	H <sub>2</sub> O/THF (50/50%), O <sub>2</sub> 12 bar, 175°C, 60 min	73,5	14,64	7,95	91,61	67,33	748,10
Untreated	-	82,58	14,46	2,13	26,26	10,34	114,93
Δείγμα Πεύκου	Προκατεργασία βιομάζας	%Κυτταρίνη	%Ημικυτταρίνη	%Λιγνίνη	%Μετατροπή κυτταρίνης	Συγκέντρωση γλυκόζης (mg/mL)	mg γλυκόζης / g βιομάζας
#					72 h		
12	H <sub>2</sub> O/EtOH (50/50%), O <sub>2</sub> 16 bar, 175°C, 60 min	77,6	13,23	7,18	70,50	54,70	607,78
13	H <sub>2</sub> O/ACO (50/50%), O <sub>2</sub> 16 bar, 175°C, 60 min	82,75	10,13	4,23	48,13	39,82	442,47
14	H <sub>2</sub> O/THF (50/50%), O <sub>2</sub> 16 bar, 175°C, 60 min	60,8	6,69	26,82	31,48	19,14	212,63
15	H <sub>2</sub> O/THF (50/50%), O <sub>2</sub> 16 bar, 175°C, 120 min	71,31	6,78	17,59	40,69	29,01	322,39
16	H <sub>2</sub> O/EtOH (50/50%), O <sub>2</sub> 16 bar, 175°C, 120 min	79,57	9,74	6,38	58,57	46,60	517,77

17	<b>H<sub>2</sub>O/THF (50/50%), O<sub>2</sub> 16 bar, 150°C, 120 min</b>	62,26	11,98	23,94	30,16	18,77	208,60
18	<b>H<sub>2</sub>O/THF (50/50%), O<sub>2</sub> 16 bar, 160°C, 120 min</b>	60,61	8,61	30,46	33,54	20,33	225,84
Untreated	-	40,00	18,4	29,51	5,63	2,25	25,01



Πίνακας 6.3 Συγκέντρωση ολικών σακχάρων (TRS) και mg ολικών σακχάρων ανά g βιομάζας, που επιτυγχάνονται ύστερα από 72 ώρες ενζυμικής υδρόλυσης για όλες τις προκατεργασμένες και ακατέργαστες πούλπες οξιάς και πεύκου σε 9% (w/v) DM, 9 mg/g ενζυμικό φορτίο, 100 mM ρυθμιστικού διαλύματος κιτρικού-φωσφορικού άλατος, pH=5.0 και ανάδευση 160 rpm

Δείγμα Οξιάς	Προκατεργασία βιομάζας	%Κυτταρίνη	%Ημικυτταρίνη	%Λιγνίνη	Συγκέντρωση ολικών σακχάρων (mg/mL)	mg ολικών σακχάρων / g βιομάζας
#						
1	H <sub>2</sub> O/EtOH (50/50%), O <sub>2</sub> 16 bar, 175°C, 120 min	82,58	14,46	2,13	80,19	890,95
2	H <sub>2</sub> O/THF (50/50%), O <sub>2</sub> 16 bar, 175°C, 120 min	85,16	10,62	2,64	74,40	826,67
3	H <sub>2</sub> O/EtOH (50/50%), O <sub>2</sub> 8 bar, 175°C, 120 min	75,63	16,38	3,85	84,22	935,80
4	H <sub>2</sub> O/THF (50/50%), O <sub>2</sub> 8 bar, 175°C, 120 min	76,36	13,58	6,47	75,34	837,14
5	H <sub>2</sub> O/ACO (50/50%), O <sub>2</sub> 12 bar, 175°C, 120 min	79,5	13,2	1,46	78,30	870,03
6	H <sub>2</sub> O/EtOH (50/50%), O <sub>2</sub> 12 bar, 175°C, 120 min	80,14	14,36	2,86	89,74	997,09
7	H <sub>2</sub> O/THF (50/50%), O <sub>2</sub> 12 bar, 175°C, 120 min	80,11	11,39	5,77	94,18	1046,42
8	H <sub>2</sub> O/ACO (50/50%), O <sub>2</sub> 25 bar, 175°C, 120 min	80,28	12,26	1,58	99,96	1110,70
9	H <sub>2</sub> O/ACO (50/50%), O <sub>2</sub> 12 bar, 175°C, 60 min	73,82	16,31	3,86	103,06	1145,08
10	H <sub>2</sub> O/EtOH (50/50%), O <sub>2</sub> 12 bar, 175°C, 60 min	71,6	17,98	6,36	125,12	1390,25
11	H <sub>2</sub> O/THF (50/50%), O <sub>2</sub> 12 bar, 175°C, 60 min	73,5	14,64	7,95	90,55	1006,06
Untreated	-	82,58	14,46	2,13	12,47	138,58
Δείγμα Πεύκου	Προκατεργασία βιομάζας	%Κυτταρίνη	%Ημικυτταρίνη	%Λιγνίνη	Συγκέντρωση ολικών σακχάρων (mg/mL)	mg ολικών σακχάρων / g βιομάζας
#						
12	H <sub>2</sub> O/EtOH (50/50%), O <sub>2</sub> 16 bar, 175°C, 60 min	77,6	13,23	7,18	67,81	753,42
13	H <sub>2</sub> O/ACO (50/50%), O <sub>2</sub> 16 bar, 175°C, 60 min	82,75	10,13	4,23	46,69	518,73
14	H <sub>2</sub> O/THF (50/50%), O <sub>2</sub> 16 bar, 175°C, 60 min	60,8	6,69	26,82	19,37	215,26
15	H <sub>2</sub> O/THF (50/50%), O <sub>2</sub> 16 bar, 175°C, 120 min	71,31	6,78	17,59	30,41	337,84
16	H <sub>2</sub> O/EtOH (50/50%), O <sub>2</sub> 16 bar, 175°C, 120 min	79,57	9,74	6,38	51,39	571,05
17	H <sub>2</sub> O/THF (50/50%), O <sub>2</sub> 16 bar, 150°C, 120 min	62,26	11,98	23,94	20,45	227,22

---

18	<b>H<sub>2</sub>O/THF (50/50%), O<sub>2</sub> 16 bar, 160°C, 120 min</b>	60,61	8,61	30,46	20,05	222,74
Untreated	-	40,00	18,4	29,51	4,55	50,53

---

Πίνακας 6.4 Ποιοτική και ποσοτική σύσταση, κατά βάρος, των παραγόμενων λιπαρών οξέων από καλλιέργειες *C. cohnii* με χρήση καθαρών σακχάρων ως πηγή άνθρακα. C14: Τετραδεκανοϊκό οξύ, C16: Εξαδεκανοϊκό οξύ, C18:1: Βακσενικό οξύ, C18: Οκταδεκανοϊκό οξύ, DHA: Εικοσιδυαεξανοϊκό οξύ. Γλυκόζη/Λιγνίνη: Καλλιέργεια σε καθαρή πηγή άνθρακα γλυκόζης παρουσίας 0,5 g/lt λιγνίνης, Γλυκόζη/HMF: Καλλιέργεια σε καθαρή πηγή άνθρακα γλυκόζης παρουσίας 0,5 g/lt HMF, Γλυκόζη/Ξυλόζη: Καλλιέργεια σε 15 g/lt γλυκόζης και 15 g/lt ξυλόζης.

<b>Σάκχαρο</b>	<b>C14 %</b>	<b>C16 %</b>	<b>C18:1 %</b>	<b>C18 %</b>	<b>DHA %</b>
Γλυκόζη	16,71	15,91	8,05	24,44	34,88
Ξυλόζη	3,41	14,43	0,00	76,51	5,66
Μαννόζη	8,20	10,77	14,66	48,48	17,90
Αραβινόζη	5,85	3,04	30,43	49,32	11,36
Γλυκόζη/Λιγνίνη	14,01	19,68	11,11	25,23	29,98
Γλυκόζη/HMF	35,55	19,28	8,03	16,50	20,64
Γλυκόζη/Ξυλόζη	9,06	13,32	10,21	32,46	34,95

Πίνακας 6.5 Ποιοτική και ποσοτική σύσταση, κατά βάρος, των παραγόμενων λιπαρών οξέων από καλλιέργειες *C. cohnii* με καθαρή πηγή γλυκόζης και διάφορες συγκεντρώσεις εκχυλίσματος ζύμης στο θρεπτικό. C14: Τετραδεκανοϊκό οξύ, C16: Εξάδεκανοϊκό οξύ, C18:1: Βακσενικό οξύ, C18: Οκταδεκανοϊκό οξύ, DHA: Εικοσιδυαεξαενοϊκό οξύ.

Συγκέντρωση εκχυλίσματος ζύμης στο μέσο (g/L)	C14 %	C16 %	C18:1 %	C18 %	DHA %
<b>2</b>	23,94	24,92	4,56	18,80	27,78
<b>1,33</b>	27,41	24,82	4,85	15,74	27,18
<b>0,66</b>	19,87	22,25	5,01	12,66	40,21

Πίνακας 6.6 Ποιοτική και ποσοτική σύσταση, κατά βάρος, των παραγόμενων λιπαρών οξέων από καλλιέργειες *C. cohnii* με χρήση υδρολυμάτων λιγνοκυτταρινούχου βιομάζας οξιάς και πένκου ως πηγή άνθρακα. C14: Τετραδεκανοϊκό οξύ, C16: Εξάδεκανοϊκό οξύ, C18:1: Βακσενικό οξύ, C18: Οκταδεκανοϊκό οξύ, DHA: Εικοσιδυαεξαενοϊκό οξύ. Το σύμβολο (\*) αντιπροσωπεύει τις καλλιέργειες στις οποίες έγινε επανατροφοδότηση υδρολύματος στις 120 ώρες. Untreated: Ακατέργαστο δείγμα οξιάς, Avicel: Κρυσταλλική κυτταρίνη

Υδρόλυμα	C14 %	C16 %	C18:1 %	C18 %	DHA %
<b>4</b>	15,87	18,01	4,52	34,98	26,62
<b>5</b>	21,68	27,51	6,35	16,77	27,69
<b>6</b>	18,69	20,70	5,34	26,65	28,62
<b>7</b>	15,04	25,16	3,55	29,02	27,23
<b>8</b>	18,74	21,46	3,35	34,46	21,99
<b>9</b>	16,52	12,89	11,76	29,88	28,96
<b>10</b>	15,03	20,35	3,71	32,68	28,24
<b>11</b>	15,29	26,92	3,58	24,71	29,50
<b>12</b>	10,27	19,60	2,68	42,69	24,76
<b>19</b>	17,03	22,16	5,16	26,25	29,40
<b>20</b>	29,51	26,37	5,45	18,64	29,51
<b>Untreated</b>	7,17	15,85	0,00	62,29	14,70
<b>19*</b>	14,27	25,42	5,44	11,39	43,47
<b>20*</b>	15,16	21,91	5,35	18,91	38,67
<b>Avicel</b>	13,29	26,10	4,18	10,75	45,68