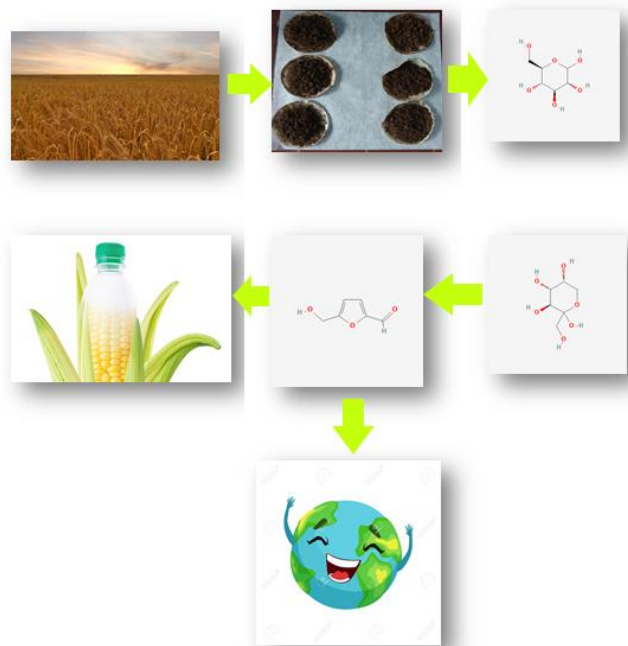




Εθνικό Μετσόβιο Πολυτεχνείο
Σχολή Χημικών Μηχανικών
Τομέας IV: Σύνθεσης και Ανάπτυξης Βιομηχανικών Διαδικασιών
Εργαστήριο Βιοτεχνολογίας

Διπλωματική Εργασία

**Μελέτη της ενζυμικής μετατροπής της λιγνινοκυτταρινούχου βιομάζας
σε φρουκτόζη**



Χαμπεσή Πηνελόπη

Επιβλέπων καθηγητής
Τόπακας Ευάγγελος, Αναπληρωτής Καθηγητής Ε.Μ.Π

ΑΘΗΝΑ 2020

Ευχαριστίες

Η παρούσα διπλωματική εργασία εκπονήθηκε στο εργαστήριο Βιοτεχνολογίας της σχολής Χημικών Μηχανικών του Εθνικού Μετσόβιου Πολυτεχνείου.

Αρχικά, θα ήθελα να ευχαριστήσω τον αναπληρωτή καθηγητή του Ε.Μ.Π, κύριο Ευάγγελο Τόπακα, που με εμπιστεύτηκε και μου ανέθεσε ένα τόσο ενδιαφέρον και καινοτόμο θέμα για να κλείσω τον κύκλο των σπουδών μου στη σχολή. Το ευρύ φάσμα γνώσεων του αλλά και η ερευνητική του δράση στον τομέα της Βιοτεχνολογίας αποτελούν ένα παράδειγμα προς μίμηση για όλους τους ακαδημαϊκούς.

Συνεχίζοντας, οφείλω ένα μεγάλο ευχαριστώ στον υποψήφιο διδάκτορα του Ε.Μ.Π, Γρηγόριο Δέδε, που με στήριξε καθ'όλη τη διάρκεια της παραμονής μου στο εργαστήριο. Το συνεχές ενδιαφέρον του, η μεθοδικότητά του αλλά και οι πολύτιμες γνώσεις που μου μετέδωσε, με βοήθησαν στην ολοκλήρωση της συγγραφής της παρούσας διπλωματικής εργασίας. Θα ήθελα να τον ευχαριστήσω για την προθυμία του να μου λύσει τυχόν απορίες που είχα και που συνέβαλε σημαντικά στη δημιουργία ενός φιλικού και ευχάριστου περιβάλλοντος.

Επιπλέον, θα ήθελα να ευχαριστήσω τα μέλη του εργαστηρίου της Βιοτεχνολογίας για το όμορφο κλίμα συνεργασίας που δημιούργησαν και την βοήθεια που μου προσέφεραν κατά την εκπόνηση της διπλωματικής μου εργασίας.

Τέλος, θα ήθελα να ευχαριστήσω τους γονείς μου, Κωνσταντίνο και Σοφία, την αδερφή μου, Βασιλική, αλλά και το κοντινό μου φιλικό περιβάλλον, για τη συνεχή στήριξη που μου παρείχαν όλα τα χρόνια των σπουδών μου στο Ε.Μ.Π. Χωρίς την διαρκή συμπαράστασή τους και τις όμορφες στιγμές που μου χάρισαν, η φοιτητική μου ζωή δε θα ήταν το ίδιο.

Αφιερωμένη στους γονείς μου και την αδερφή μου

Περίληψη

Σκοπός της παρούσας διπλωματικής εργασίας είναι η μελέτη της παραγωγής φρουκτόζης από λιγνινοκυτταρινούχο βιομάζα με διαφορετικές συστάσεις κυτταρίνης.

Σε πρώτο στάδιο, μελετήθηκαν οι βέλτιστες συνθήκες ενζυμικής υδρόλυσης της λιγνινοκυτταρινούχου βιομάζας. Για την μελέτη αυτή έγιναν δύο σειρές πειραμάτων σε καθαρή πηγή κυτταρίνης σε ίδιες συνθήκες θερμοκρασίας και pH. Η πρώτη σειρά ήταν για διαφορετικό ενζυμικό φορτίο, από 5 έως 30 mg/g DM, και σταθερή συγκέντρωση στερεών (10% w/w), ενώ η δεύτερη για σταθερό ενζυμικό φορτίο (15 mg/g DM) και διαφορετική συγκέντρωση στερεών, από 6% w/w έως 16% w/w. Από τα παραπάνω πειράματα, η μεγαλύτερη τιμή που προέκυψε για την γλυκόζη ήταν 100.3 g/L για το ενζυμικό φορτίο 30 mg/g DM, όμως από τις αποδόσεις και την τιμή του ενζύμου θεωρήθηκε ως βέλτιστη τιμή ενζυμικού φορτίου η 15 mg/g DM. Όσον αφορά τη δεύτερη σειρά υδρολύσεων, η μέγιστη μετατροπή κυτταρίνης σε γλυκόζη βρέθηκε να είναι 72.9% και προέκυψε για 10% w/w συγκέντρωση στερεών με 15 mg/g DM συγκέντρωση ενζύμου .

Ακολούθησαν πειράματα υδρόλυσης σε λιγνινοκυτταρινούχο βιομάζα διαφορετικής περιεκτικότητας σε κυτταρίνη, στις βέλτιστες συνθήκες που βρέθηκαν από την προηγούμενη μελέτη. Η μεγαλύτερη μετατροπή κυτταρίνης σε γλυκόζη προέκυψε για το υλικό No.17, που περιείχε κυτταρίνη σε ποσοστό 68.99% και επιτεύχθηκε μετατροπή ποσοστού 93.3% αλλά και το υλικό No.18, που περιείχε κυτταρίνη σε ποσοστό 76.6%, και επιτεύχθηκε μετατροπή ποσοστού 92.8%. Ωστόσο, καλύτερο όλων των υλικών θεωρήθηκε το No.25 διότι το ποσοστό κυτταρίνης που περιείχε ήταν περισσότερο από τα δύο παραπάνω υλικά (81.3%) και η μετατροπή της κυτταρίνης σε γλυκόζη που επιτεύχθηκε ήταν 84.3%.

Όσον αφορά τα υλικά που είχαν υποστεί υδροθερμική προκατεργασία με 0.3% v/v οξικό οξύ (CH_3COOH) και προκατεργασία με μίγμα ακετόνη-νερό σε θερμοκρασία 220 °C για 15 min, με νερό στους 170 °C για 180 min και με νερό στους 220 °C για 15 min δεν υδρολύθηκαν σε μεγάλο βαθμό, το οποίο θα μπορούσε να αποδοθεί στον τύπο προκατεργασίας που είχαν υποβληθεί.

Στη συνέχεια, όσα υλικά είχαν μια ικανοποιητική απόδοση στο πείραμα της υδρόλυσης οδηγήθηκαν για ισομερείωση της γλυκόζης σε φρουκτόζη. Όμοια με παραπάνω, αν και τα υλικά No.17 και No.18, με προκατεργασία νερό-THF στους 160 °C και νερό-ακετόνη στους 160 °C αντίστοιχα, εμφανίζουν την μεγαλύτερη ποσοστιαία μετατροπή της κυτταρίνης σε φρουκτόζη (74.8% και 74.1% αντίστοιχα), περιέχουν λιγότερη κυτταρίνη συγκριτικά με το υλικό No.25, που έχει υποστεί

προκατεργασία με νερό-αιθανόλη στους 175 °C, και η μετατροπή του σε φρουκτόζη είναι αρκετά ικανοποιητική (64%). Γι' αυτό και το υλικό No.25 επιλέχθηκε για το πείραμα της υδρόλυσης σε μεγάλη κλίμακα, όπου η συγκέντρωση της γλυκόζης έφτασε την τιμή 162.3 g/L.

Σε δεύτερο στάδιο, παράχθηκε μέσω ετερόλογης έκφρασης στη μεθυλότροφη ζύμη *Pichia pastoris*, μια ξυλανάση της οικογένειας 11 των γλυκοζιδικών υδρολασών από το μύκητα *Fusarium oxysporum*, με σκοπό να χρησιμοποιηθεί για την παραγωγή ξυλοολιγοσακχαριτών από προκατεργασμένη βιομάζα. Μετά την παραγωγή του ενζύμου ακολούθησε υδρόλυση των προκατεργασμένων στελεχών και το υγρό κλάσμα που ήταν εμπλουτισμένο με τους ξυλοολιγοσακχαρίτες οδηγήθηκε σε σύστημα χρωματογραφίας εναλλαγής ανιόντων, όπου επαληθεύτηκε και η ύπαρξη τους.

Abstract

The aim of this diploma thesis is to examine the production of fructose from lignocellulosic biomass with different cellulose compositions.

At first, two series of experiments were performed on pure cellulose source in order to find the optimum conditions for enzymatic hydrolysis of lignocellulosic biomass. The first series was for different enzyme concentrations, from 5 to 30 mg/g DM, and specific solids concentration (10% w/w), while the second one was for specific enzyme concentration (15 mg/g DM) and different solids concentrations, from 6% w/w to 16% w/w. From the above experiments, the highest glucose concentration was 100.3 g/L for the enzyme concentration 30 mg/g DM. However, based on the hydrolysis yield and the cost of the enzyme, it is considered that the best enzyme concentration is 15 mg/g DM. For the second series, the maximum conversion of cellulose to glucose was found to be 72.9% and achieved when solids concentration was 10% w/w and enzyme concentration was 15 mg/g DM.

Afterwards, enzymatic hydrolysis experiments were performed on lignocellulose biomass of different cellulose content, in the optimum conditions found from the previous study. The highest conversion of cellulose to glucose was 93.9% and occurred for material No. 17, which contained 69.0% cellulose, and also for the material No. 18, which contained 76.6% cellulose, was 92.8%. However, the best material was found to be No.25 as it contains higher percentage of cellulose (81.3%) and the conversion of cellulose to glucose was 84.3%.

For the materials that were hydrothermally pretreated with 0.3% v/v acetic acid (CH₃COOH) and with a mixture of acetone-water at 220 °C for 15 min, with water at 170 °C for 180 min and with water at 220 °C for 15 min the results of enzymatic hydrolysis were not satisfying, and it could be attributed to the type of pretreatment they have been submitted.

The materials that had a satisfactory enzymatic hydrolysis yield was led to isomerization of glucose to fructose. Similar to the above, although materials No.17 and No.18, with water-THF pretreatment at 160 °C and water-acetone at 160 °C respectively, exhibit the highest percentage conversion of cellulose to fructose (74.8% and 74.1%, respectively), they contain less cellulose than material No. 25, which has been pretreated with water-ethanol at 175 °C, and its conversion to fructose is satisfactory (64%). Therefore, material No.25 was found to be the best and selected for large-scale hydrolysis experiment, where the glucose concentration reached to 162.3 g/L.

In a second step, a xylanase of the glycosidic hydrolase family 11 from *Fusarium oxysporum* (GH11) was produced by heterologous expression in *Pichia pastoris*, in order to be used for the production of xyloligosaccharides by pretreated biomass.

After the production of the enzyme was finished, the pretreated corn stover underwent hydrolysis step. The xylooligosaccharides present in the liquid fraction were verified and identified by high performance anion exchange chromatography.

Περιεχόμενα

Κεφάλαιο 1: Λιγνινοκυτταρινούχος βιομάζα	1
1.1 Πηγές λιγνινοκυτταρινούχου βιομάζας	1
1.1.1 Αγρωστώδη (grasses)	2
1.1.2 Μαλακό ξύλο (softwood)	2
1.1.3 Σκληρό ξύλο (hardwood)	3
1.2 Σύσταση λιγνινοκυτταρινούχου βιομάζας	3
Κεφάλαιο 2: Μετατροπή βιομάζας σε φρουκτόζη	9
2.1 Προκατεργασία λιγνινοκυτταρινούχου βιομάζας	9
2.1.1 Αλκαλική προκατεργασία	10
2.1.2 Μηχανικές μέθοδοι	11
2.1.3 Βιολογικές μέθοδοι	12
2.1.4 Οξειδωτικές	12
2.1.5 Έκρηξη αμμωνίας (AFEX)	13
2.1.7 Έκρηξη ατμού	13
2.1.7 Έκρηξη διοξειδίου του άνθρακα (CO ₂)	14
2.1.8 Υδροθερμική προκατεργασία	15
2.1.9 Οζονόλυση	15
2.1.10 Προκατεργασία με αραιό οξύ σε ήπιες συνθήκες	15
2.2 Υδρόλυση βιομάζας	16
2.2.1 Χημική υδρόλυση	17
2.2.2 Ενζυμική υδρόλυση	18
2.3 Μετατροπή της παραγόμενης γλυκόζης σε φουράνια	21
2.3.1 Ισομερείωση της γλυκόζης προς παραγωγή φρουκτόζης	21
2.3.2 Χημειοκαταλυτική μετατροπή της φρουκτόζης σε φουράνια	23
Κεφάλαιο 3: Ξυλοολιγοσακχαρίτες στη βιομηχανία των τροφίμων	26
3.1 Πρεβιοτικά	26
3.2 Ξυλοολιγοσακχαρίτες	27
3.3 Οφέλη ξυλοολιγοσακχαριτών	28
Κεφάλαιο 4: Υλικά και Μέθοδοι	33
4.1 Υλικά	33
4.1.1 Ένζυμα	33

4.1.2	Θρεπτικά υλικά.....	33
4.1.3	Ρυθμιστικά διαλύματα	33
4.1.4	Μικροοργανισμοί.....	34
4.1.5	Στήλες χρωματογραφίας	35
4.1.6	Συσκευές και όργανα.....	35
4.1.7	Χημικά αντιδραστήρια	35
4.2	Μέθοδοι	36
4.2.1	Μέτρηση αναγωγικών σακχάρων (DNS).....	36
4.2.3	Μέτρηση γλυκόζης (Glucotest)	38
4.2.4	Υπολογισμός συγκέντρωσης πρωτεϊνών με την μέθοδο Bradford	39
4.2.5	Παραγωγή ξυλανάσης GH-11 από <i>Fusarium oxysporum</i> (FoXγη)	40
4.2.6	Υδρόλυση βιομάζας.....	41
4.2.7	Υδροθερμική προκατεργασία βιομάζας με καταλύτη οξικό οξύ.....	46
4.2.8	Ισομερείωση γλυκόζης προς φρουκτόζη	47
4.2.9	Προσδιορισμός ουσιών με χρωματογραφία εναλλαγής ανιόντων υψηλής απόδοσης (HPAEC)	48
4.2.9.1	Προσδιορισμός της παραγόμενης φρουκτόζης από την ισομερείωση των υδρολυμένων υλικών	50
4.2.9.2	Προσδιορισμός των παραγόμενων ξυλοολιγοσακχαριτών	50
4.2.10	Ηλεκτροφόρηση πήγματος πολυακρυλαμιδίου παρουσία δωδεκυλοθειικού νατρίου (SDS-PAGE).....	50
Κεφάλαιο 5: Προσδιορισμός της παραγόμενης πρωτεΐνης και των ξυλοολιγοσακχαριτών		55
5.1	Προσδιορισμός των παραγόμενων ξυλοολιγοσακχαριτών.....	55
5.2	Προσδιορισμός του μοριακού βάρους της παραγόμενης πρωτεΐνης	56
Κεφάλαιο 6: Ενζυμική υδρόλυση		57
6.1	Υδρόλυση καθαρής κυτταρίνης (AVICEL) για διαφορετικές συγκεντρώσεις ενζύμου	57
6.2	Υδρόλυση καθαρής κυτταρίνης (AVICEL) για διαφορετικές συγκεντρώσεις στερεών.....	60
6.3	Υδρόλυση υλικών διαφορετικής περιεκτικότητας κυτταρίνης	63
6.4	Υδρόλυση βιομάζας επεξεργασμένης με ξυλανάση	74
6.5	Υδρόλυση βιομάζας σε αναμεικτήρα ελεύθερης πτώσης (free-fall mixer).....	77
6.6	Υδρόλυση βιομάζας με μεταβαλλόμενη τροφοδοσία	78

Κεφάλαιο 7: Ισομερείωση παραγόμενης γλυκόζης προς φρουκτόζη	84
7.1 Ισομερείωση των 16 υλικών διαφορετικής περιεκτικότητας σε κυτταρίνη	85
7.2 Ισομερείωση του υλικού που υδρολύθηκε σε αναμεικτήρα ελεύθερης πτώσης (free-fall mixer)	86
Κεφάλαιο 8: Ποιοτικός προσδιορισμός της παραγόμενης φρουκτόζης με την μέθοδο χρωματογραφίας εναλλαγής ανιόντων υψηλής απόδοσης (HPLC)	87
Κεφάλαιο 9: Συζήτηση των αποτελεσμάτων και μελλοντικές προκλήσεις	89
Βιβλιογραφία	

ΘΕΩΡΗΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ

Κεφάλαιο 1: Λιγνινοκυτταρινούχος βιομάζα

Στη σύγχρονη εποχή, οι ορυκτοί πόροι (άνθρακας, φυσικό αέριο και πετρέλαιο) έχουν τον πρωτεύοντα ρόλο ως πηγές ενέργειας και χημικών, προσφέροντας περίπου το 86% της ενέργειας και το 96% των οργανικών χημικών ουσιών. Οι συνεχώς όμως αυξανόμενες ανάγκες σε ενέργεια, οι εκπομπές που παράγονται από την καύση των ορυκτών καυσίμων και άλλες περιβαλλοντικές επιπτώσεις οδήγησαν στην ανάγκη εύρεσης μιας πηγής ενέργειας και χημικών προϊόντων που θα είναι ανανεώσιμη, οικονομική και φιλική προς το περιβάλλον. Με την πρόοδο της τεχνολογίας, μια ανανεώσιμη πηγή που αποτελεί καλή εναλλακτική χάρη στην αφθονία της είναι η βιομάζα. Στη παγκόσμια ενεργειακή κατανομή, οι ανανεώσιμες πηγές ενέργειας αποτελούν μόλις το 10.9% ενώ το 50% αυτών σχετίζεται με την βιομάζα. Για την αξιοποίησή της ως πηγή ενέργειας και χημικών θα πρέπει να εκμεταλλευτεί μόνο το μη εδώδιμο κλάσμα της φυτικής βιομάζας που είναι η λιγνινοκυτταρίνη καθώς το εδώδιμο όπως είναι το άμυλο και η ζάχαρη μπορεί να κλονίσει την τροφική αλυσίδα. Συνεπώς, η λιγνινοκυτταρινούχος βιομάζα αξιοποιεί τα παραπροϊόντα από τις γεωργικές δραστηριότητες χωρίς να επηρεάζει τον τομέα των τροφίμων ενώ ταυτόχρονα ενισχύει την οικονομία με τη ανάπτυξη νέων τεχνολογιών και θέσεων εργασίας.



Εικόνα 1-Χρήσεις της λιγνινοκυτταρινούχου βιομάζας στη βιομηχανία

1.1 Πηγές λιγνινοκυτταρινούχου βιομάζας

Η λιγνινοκυτταρινούχος βιομάζα προέρχεται κυρίως από αστικά οργανικά απόβλητα, αγροτικά και δασικά κατάλοιπα. Ανάλογα την πηγή προέλευσής της, η δομή και η χημική της σύσταση διαφέρει, τα ποσοστά της κυτταρίνης, ημικυτταρίνης και λιγνίνης ποικίλλουν, καθιστώντας έτσι κάποια είδη βιομάζας πιο εύκολα αποικοδομίσιμα.

Οι πηγές της λιγνινοκυτταρινούχου βιομάζας μπορούν να χωριστούν σε διάφορες κατηγορίες. Πιο συγκεκριμένα, μπορεί να προέρχεται από ενεργειακές καλλιέργειες, υδατικά φυτά, δασικά και αγροτικά υπολείμματα και οργανικά κλάσματα στερεών αστικών αποβλήτων (Saini, Saini, and Tewari 2015). Στη παρούσα διπλωματική εργασία χρησιμοποιήθηκε βιομάζα δασικής και αγροτικής προέλευσης.

Η πλειονότητα των αγροτικών υπολειμμάτων προέρχεται κυρίως από τέσσερα είδη καλλιεργειών, καλαμποκιού, σιταριού, ρυζιού και σακχαροκάλαμου ενώ οι υπόλοιπες αγροτικές καλλιέργειες συνεισφέρουν σε πολύ μικρό βαθμό στη συνολική παγκόσμια βιομάζα. Μια από τις πιο υποσχόμενες πηγές λιγνινοκυτταρινούχου βιομάζας είναι το στέλεχος αραβοσίτου, που χρησιμοποιήθηκε και στην παρούσα διπλωματική. Πρόκειται για το κατάλοιπο από τη συγκομιδή του καλαμποκιού που περιέχει τον μίσχο, τα φύλλα και τον φλοιό. Οι κυριότερες λοιπόν πηγές βιομάζας είναι από στελέχη αραβοσίτου, άχυρο (ή καλάμι) σιταριού και ρυζιού και βαγάσση, η οποία προέρχεται από σακχαροκάλαμο. (Zabed et al. 2016)

Όσον αφορά την δασικής προέλευσης βιομάζα προέρχεται κυρίως από ξύλο, πιο συγκεκριμένα μαλακό (softwood) και σκληρό ξύλο (hardwood) και αγρωστώδη (grasses).

1.1.1 Αγρωστώδη (grasses)

Σε αυτή την κατηγορία ανήκουν πολυετή και μονοετή αγρωστώδη όπως είναι switch-grass και miscanthus (πολυετή), μίσχος καλαμποκιού, σακχαροκάλαμο και ρύζι, κριθάρι και σιτάρι (μονοετή). Χάρη στην ευκολία της λιγνίνης να απομακρύνεται σε αυτό το είδος βιομάζας και της ημικυτταρίνης να αποικοδομείται κυρίως σε ξυλόζη, τα αγρωστώδη αποτελούν καλή πηγή βιομάζας και χρησιμοποιούνται κυρίως στην παραγωγή βιοκαυσίμων. Παρόλο που τα πολυετή αγρωστώδη εμφανίζουν μεγαλύτερη παραγωγικότητα από τα μονοετή είναι πιο δύσκολα στην διαχείριση.

Χάρη στο παχύ κυτταρικό τοίχωμα που διαθέτουν παραμένουν σταθερά κατά την έκθεσή τους σε συμπύεση και τάση. Τα αγρωστώδη αποτελούν την πιο κατάλληλη πηγή λιγνινοκυτταρινούχου βιομάζας λόγω της χαμηλής περιεκτικότητάς τους σε λιγνίνη και της εύκολης αποδόμησης της ημικυτταρίνης. (De Bhowmick, Sarmah, and Sen 2018)

1.1.2 Μαλακό ξύλο (softwood)

Το μαλακό ξύλο (softwood) βρίσκεται κυρίως στο βόρειο ημισφαίριο και αποτελεί μια προσβάσιμη πηγή βιομάζας για εκείνες τις χώρες. Αυτός ο τύπος ξύλου περιέχει υψηλά ποσοστά λιγνίνης και ημικυτταρίνης με αποτέλεσμα να θεωρείται μια δύσκολα διαχειρίσιμη βιομάζα και να απαιτεί έντονες συνθήκες για την

προκατεργασία της. Επιπλέον προσοχή θα πρέπει να δίνεται όταν είναι επιθυμητή η ανάκτηση της λιγνίνης μετά το πέρας της προκατεργασίας κατά την επανασυμπύκνωσή της. Σε αυτή την κατηγορία ξύλων ανήκουν το έλατο και το πεύκο. Η κύρια δομή της ημικυτταρίνης στα ξύλα τύπου softwood είναι μόρια μαννόζης που ακολουθούνται από ξυλόζες ενώ η λιγνίνη εκτός του β-O-4 δεσμού που είναι ο πιο ισχυρός μεταξύ των θραυσμάτων της λιγνίνης. (De Bhowmick, Sarmah, and Sen 2018)

1.1.3 Σκληρό ξύλο (hardwood)

Το σκληρό ξύλο (hardwood) αποτελείται από μεγάλους πόρους που επιτρέπουν την διέλευση του νερού και σε αυτή την κατηγορία εντάσσονται η βελανιδιά, η καρυδιά και η ιτιά. Με το softwood διαφέρει ως προς τη χημική σύσταση καθώς η ημικυτταρίνη, που βρίσκεται σε ποσοστό 15-30%, έχει ως κύριο δομικό μόριο την ξυλόζη ενώ στο softwood είναι και η μαννόζη. (De Bhowmick, Sarmah, and Sen 2018)

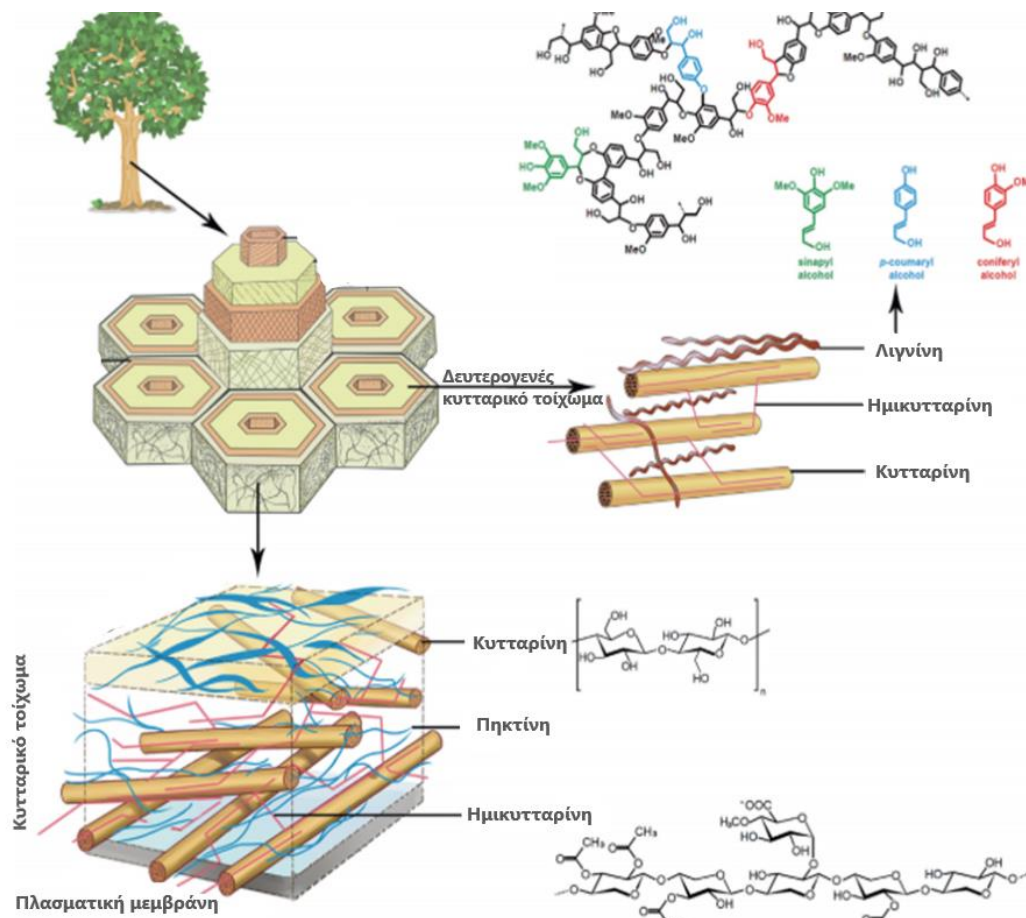
1.2 Σύσταση λιγνινοκυτταρινούχου βιομάζας

Με τον όρο λιγνινοκυτταρίνη περιγράφονται σαν σύνολο τα τρία κύρια συστατικά των κυτταρικών τοιχωμάτων των φυτών, η κυτταρίνη, η ημικυτταρίνη και η λιγνίνη. Μια γενική σύσταση της λιγνινοκυτταρινούχου βιομάζας είναι κυτταρίνη σε ποσοστό 38-50%, ανάλογα την πηγή της φυτικής βιομάζας, ημικυτταρίνη σε ποσοστό 23-32% και λιγνίνη σε ποσοστό 12-25%. Η λιγνίνη μαζί με την ημικυτταρίνη αποτελεί το 40 με 70% της φυτικής βιομάζας και συναντώνται στο σχηματισμό του δευτερεύοντος κυτταρικού τοιχώματος αλληλεπιδρώντας μεταξύ τους ενώ η κυτταρίνη στο κυτταρικό τοίχωμα (Limayem and Ricke 2012).

Η ύπαρξη του κυτταρικού τοιχώματος των φυτών αποτελεί έναν μηχανισμό προστασίας του εσωτερικού τους από τους μικροοργανισμούς που προσπαθούν να εισβάλλουν, καθώς οι πόροι του έχουν τέτοιο μέγεθος έτσι ώστε να μην είναι εφικτή η διείσδυσή τους. Η χημική σύστασή του ποικίλλει ανάλογα το είδος του φυτού και τα κύτταρα του ίδιου φυτού. Κατά κανόνα όμως αποτελείται από υψηλού μοριακού βάρους πολυσακχαρίτες που είναι κυρίως η κυτταρίνη, ημικυτταρίνη και λιγνίνη. Πιο συγκεκριμένα, μικροϊνίδια κυτταρίνης, ένας πολυσακχαρίτης της γλυκόζης, ενσωματώνονται μέσα σε μια μάζα από πρωτεΐνες και ημικυτταρίνες, πολυσακχαρίτες με κύρια δομική μονάδα πεντόζες και εξόζες.

Σε ορισμένα κύτταρα, δημιουργείται και ένα δευτερογενές κυτταρικό τοίχωμα, μεταξύ της κυτταρικής μεμβράνης και του πρωτογενούς κυτταρικού τοιχώματος, το οποίο αποτελείται από λιγνίνη, ένα πολύπλοκο πολυμερές με βασική μονάδα το φαινυλοπροπάνιο. Το δευτερογενές κυτταρικό τοίχωμα αποτελεί το 80% του κυτταρικού τοιχώματος και ο σχηματισμός του λαμβάνει χώρα μετά την ανάπτυξη του κυττάρου. Η ύπαρξη του δευτερογενούς τοιχώματος είναι για περαιτέρω μηχανική υποστήριξη του φυτού καθώς η κυτταρίνη είναι αυτή που προσδίδει την

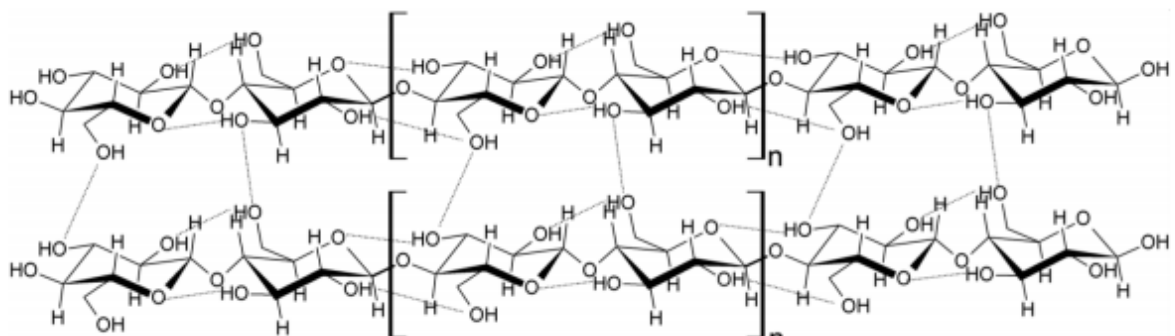
ακαμψία αλλά η ημικυτταρίνη και η λιγνίνη την αντοχή σε κρούση, θλίψη και κάμψη (Χριστακόπουλος n.d).



Εικόνα 2-Απεικόνιση του κυτταρικού τοιχώματος(Y. Zhao et al. 2019)

Κυτταρίνη

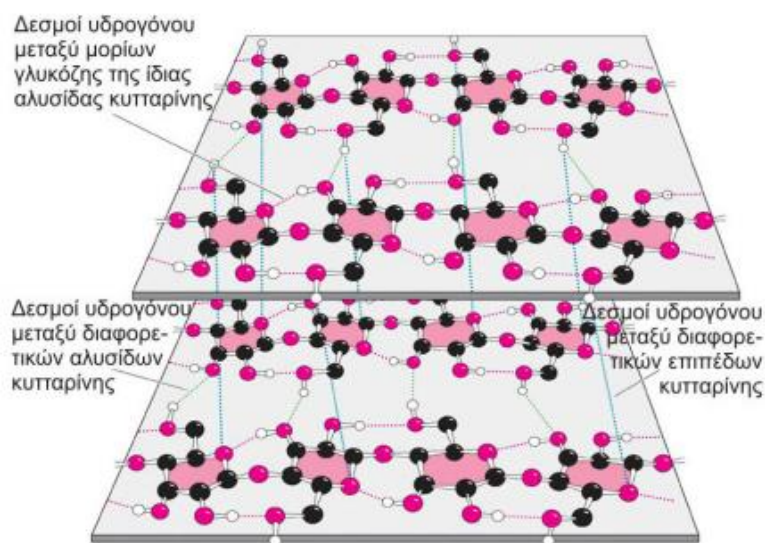
Η κυτταρίνη είναι ένας γραμμικός οργανικός πολυσακχαρίτης με χημικό τύπο $(C_6H_{10}O_5)_n$ που αποτελείται από πολλά μονομερή της D-γλυκόζης συνδεδεμένα μεταξύ τους με β -1,4 γλυκοζιδικό δεσμό. Ο δεσμός αυτός απαντάται στον δισακχαρίτη κελλοβιόζη, γι' αυτό και η κελλοβιόζη αποτελεί την επαναλαμβανόμενη δομική μονάδα της κυτταρίνης, όπως φαίνεται και στην Εικόνα 3.



Εικόνα 3-Δομική μονάδα της κυτταρίνης. Εντός των αγκυλών απεικονίζεται η κελλοβιόζη

Η κυτταρίνη βρίσκεται σε μεγάλες ποσότητες στην φύση καθώς αποτελεί το κύριο δομικό συστατικό των κυτταρικών τοιχωμάτων των φυτικών κυττάρων και μπορεί να αποκτηθεί από γεωργικά παραπροϊόντα όπως ο βλαστός του καλαμποκιού, στάχυ ρυζιού, σιταριού και βρώμης. Πρόκειται για μια άγευστη, άοσμη, υδρόφιλη και βιοδιασπώμενη ένωση με βαθμό πολυμερισμού από 7000 έως 15000 μονάδες γλυκόζης. Είναι αδιάλυτη στο νερό και τους περισσότερους οργανικούς διαλύτες ενώ διαλύεται πλήρως σε θειικό, υδροχλωρικό και φωσφορικό οξύ.

Η κύρια λειτουργία της κυτταρίνης είναι να εξασφαλίσει την ακαμψία του κυτταρικού τοιχώματος των φυτών χάρη στην ικανότητά της να σχηματίζει κρυσταλλικές περιοχές. Οι δεσμοί υδρογόνου που σχηματίζονται μεταξύ των μορίων γλυκόζης στην ίδια αλυσίδα κυτταρίνης (έσω) και σε διαφορετικές αλυσίδες (έξω) οδηγούν τις αλυσίδες κυτταρίνης σε μια παράλληλη επίπεδη διάταξη μεταξύ παράλληλων επιπέδων, δημιουργώντας με αυτό τον τρόπο συμπαγείς και άκαμπτες κρυσταλλικές περιοχές, με βαθμό κρυσταλλικότητας περίπου 70%. Στις αλυσίδες κυτταρίνης ανάμεσα στις κρυσταλλικές περιοχές παρεμβάλλονται και άμορφες περιοχές που προσδίδουν σε αυτήν υγροσκοπικές ιδιότητες (Χριστακόπουλος n.d.) .



Εικόνα 4-Δεσμοί υδρογόνου που σχηματίζονται στην κυτταρίνη

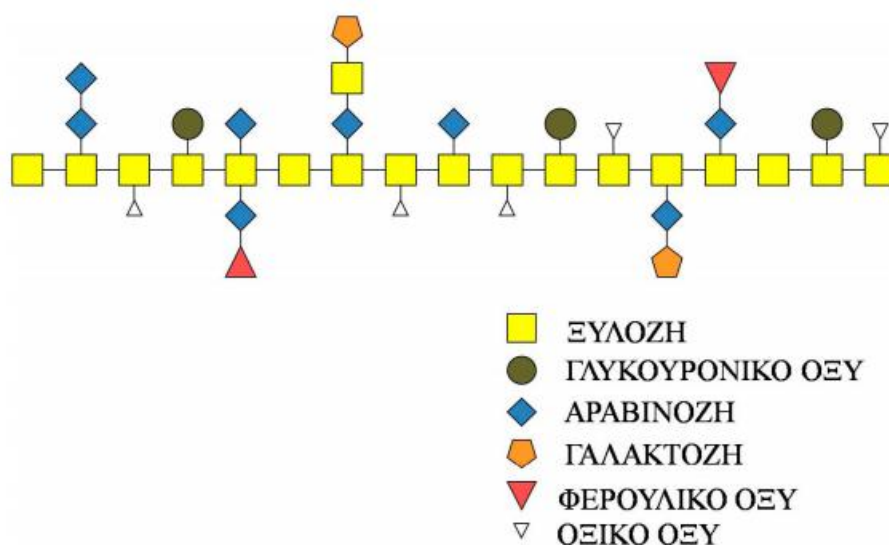
Ημικυτταρίνη

Η ημικυτταρίνη είναι ένα πλέγμα διασταυρούμενων φυτικών μη-κυτταρινικών πολυσακχαριτών που αποτελούνται από πεντόζες όπως είναι η D-ξυλόζη, L-αραβινόζη, L-ραμνόζη και L-φουκόζη, από εξόζες όπως η D-μαννόζη, D-γλυκόζη, D-γαλακτόζη και ουρονικά οξέα όπως το D-γλυκουρονικό οξύ, D-4-O-μεθυλ-γλυκουρονικό οξύ και D-γαλακτουρονικό οξύ. Το ποσοστό εμφάνισής της στα φυτά

ποικίλλει ανάλογα το είδος, για παράδειγμα τα ξύλα κωνοφόρων δέντρων περιέχουν 30% λιγότερες ημικυτταρίνες από τα ξύλα των πλατύφυλλων.

Σε αντίθεση με την κυτταρίνη, η ημικυτταρίνη είναι άμορφη χωρίς καθόλου κρυσταλλικές περιοχές και έχει χαμηλό βαθμό πολυμερισμού, από 150 έως 300. Επιπλέον, παρουσιάζουν υψηλή χημική δραστηριότητα και είναι έντονα υγροσκοπικές. Υπάρχουν πολλοί διαφορετικοί τύποι ημικυτταρινών και η κατηγοριοποίησή τους γίνεται με βάση το κυριότερο μονομερές σάκχαρο, αν και στη φύση σπάνια αποτελούνται από έναν μόνο τύπο μονοσακχαρίτη. Έτσι διακρίνονται σε αραβινάνες, γαλακτάνες, γλυκάνες, μαννάνες και ξυλάνες, με τις τελευταίες να αποτελούν το κυριότερο συστατικό της ημικυτταρίνης.

Η ξυλάνη αποτελείται από μια κεντρική αλυσίδα μορίων D-ξυλοπυρανόζης ενωμένων με β -1,4-γλυκοζιδικό δεσμό και η δομή της ποικίλλει ανάλογα την πηγή προέλευσης της. Αποτελεί τον δεύτερο πιο άφθονο πολυσακχαρίτη στη φύση μετά από την κυτταρίνη και χάρη στην ικανότητά της να συνδέεται με ομοιοπολικούς δεσμούς μέσω φαινολικών οξέων με την λιγνίνη και δεσμών υδρογόνου με την κυτταρίνη, λειτουργεί σαν συνδετικός κρίκος ανάμεσα στην κυτταρίνη και την λιγνίνη εξασφαλίζοντας την συνεκτικότητα και την ακεραιότητα των κυτταρικών τοιχωμάτων (Χριστακόπουλος n.d.).



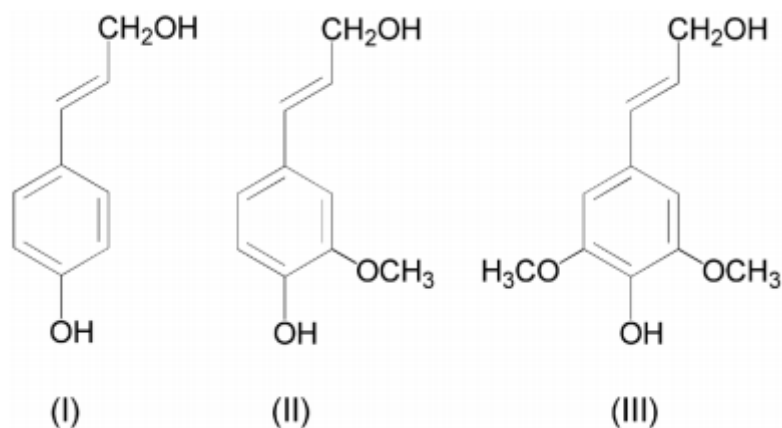
Εικόνα 5-Απεικόνιση της ξυλάνης των ημικυτταρινών

Λιγνίνη

Η λιγνίνη είναι ένα πολύπλοκο τρισδιάστατο πολυμερές με βασική δομική μονάδα το φαινυλοπροπάνιο και αποτελεί ένα από τα πιο άφθονα συστατικά της φυτικής βιομάζας. Αν και η παρουσία της είναι στενά συνδεδεμένη με την κυτταρίνη δεν εμφανίζεται σε όλα τα φυτικά είδη, με το ποσοστό της στα είδη που εμφανίζεται να ποικίλλει από 17 έως 35%. Ομοίως με την ημικυτταρίνη, η λιγνίνη είναι άμορφη όμως εμφανίζει εξαιρετικά υψηλό βαθμό πολυμερισμού, από 100.000 έως 300.000.

Ενώνεται με χημικούς δεσμούς και με τις ημικυτταρίνες και την κυτταρίνη, είναι υδρόφοβη επομένως και αδιάλυτη στο νερό και έχει χαμηλή διόγκωση. Υδρολύεται δύσκολα κυρίως με αλκαλικά διαλύματα σε υψηλές θερμοκρασίες (150-180°C) και προσδίδει υψηλή αντοχή σε κάμψη, θλίψη και κρούση (Terrett and Dupree 2019).

Τα τρία διαφορετικά φαινυλοπροπάνια που υπάρχουν σε αυτήν και παρουσιάζονται στο Σχήμα 1.4.4 συγκρατούνται με αιθερικούς δεσμούς και δεσμούς άνθρακα-άνθρακα και είναι ο λόγος που εμφανίζονται χημικές διαφορές στα φυτικά κύτταρα.



Εικόνα 6-Τα τρία φαινυλοπροπάνια της λιγνίνης

Στον παρακάτω πίνακα αναφέρονται ενδεικτικά κάποια είδη βιομάζας και τα ποσοστά που απαντώνται τα συστατικά τους.

Πίνακας 1-Σύσταση διαφορετικών λιγνινοκυτταρινούχων βιομαζών (Limayem and Ricke 2012)

Βιομάζα	Κυτταρίνη	Ημικυτταρίνη	Λιγνίνη	Άλλα συστατικά
Αγροτικά υπολείμματα	37-50	25-50	5-15	12-16
Σκληρό ξύλο	45-47	25-40	20-25	0.80
Μαλακό ξύλο	40-45	25-29	30-60	0.50
Αγρωστώδη	25-40	35-50	-	-
Switchgrass	40-45	30-35	12	-
Στέλεχος καλαμποκιού	35.1-39.5	20.7-24.6	11.0-19.1	16.8-33.2

Κεφάλαιο 2: Μετατροπή βιομάζας σε φρουκτόζη

2.1 Προκατεργασία λιγνινοκυτταρινούχου βιομάζας

Για την παραγωγή χημικών και καυσίμων από λιγνινοκυτταρινούχο βιομάζα απαραίτητη είναι η υδρόλυση των περιεχόμενων πολυσακχαριτών σε σάκχαρα που μπορούν να υποστούν περαιτέρω μετατροπές και να δώσουν το επιθυμητό προϊόν. Η μετατροπή όμως της βιομάζας είναι μια πολύπλοκη διαδικασία που ακολουθεί κάποια στάδια. Στην περίπτωση της ενζυμικής υδρόλυσης, κατά την οποία χρησιμοποιούνται ένζυμα για την σακχαροποίηση της κυτταρίνης, είναι αναγκαίο να προηγηθεί μια προκατεργασία, χημική ή φυσική. Σε μελέτες που έχουν διεξαχθεί, η λιγνινοκυτταρινούχος βιομάζα όταν υδρολύεται χωρίς να έχει υποστεί κάποια προκατεργασία πρώτα φτάνει σε μετατροπή της κυτταρίνης σε γλυκόζη έως και 20%. Πρόκειται για ένα χαμηλό ποσοστό ειδικά όταν συγκριθεί με την μετατροπή της βιομάζας που έχει υποστεί επεξεργασία, που αγγίζει μέχρι και 80%. Σε πρώτη φάση μπορεί η προσθήκη μίας επιπλέον διεργασίας να φαίνεται ότι επιφέρει κόστος αλλά χωρίς την προκατεργασία η απόδοση της διεργασίας μειώνεται και κατ'επέκταση το κόστος αυξάνεται. (Van Dyk and Pletschke 2012).

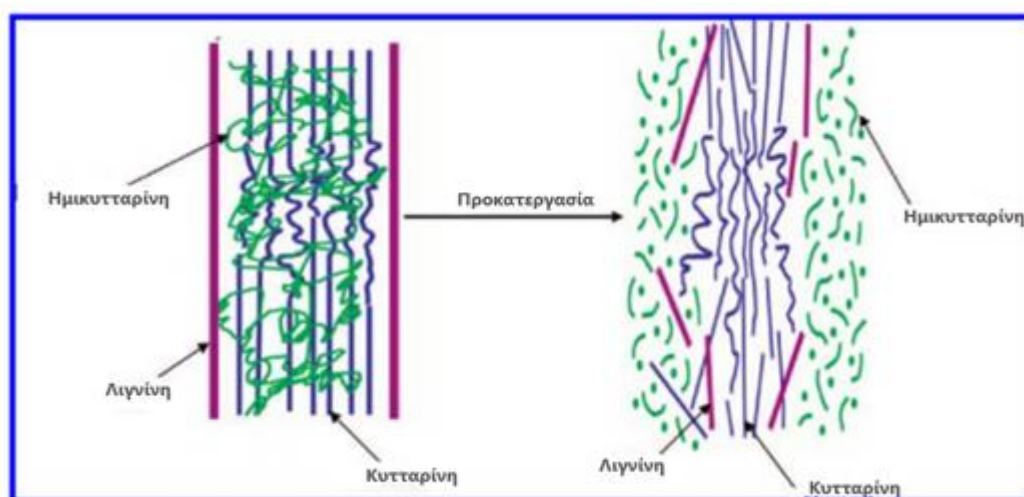
Ο κύριος στόχος της προκατεργασίας είναι η απομάκρυνση ενός μέρους της ημικυτταρίνης και της λιγνίνης που αποτελούν εμπόδια για την αποικοδόμηση της κυτταρίνης. Η ύπαρξη της λιγνίνης μειώνει την απόδοση της υδρόλυσης καθώς αποτελεί ένα φυσικό εμπόδιο που δυσκολεύει την πρόσβαση των ενζύμων (κυτταρινάσες και ημικυτταρινάσες) στο υπόστρωμά τους και ένα μέρος των κυτταρινασών απορροφάται από την λιγνίνη. Με την απομάκρυνση της λιγνίνης και της ημικυτταρίνης αλλά και την μείωση της κρυσταλλικότητας της κυτταρίνης, που επιτυγχάνεται κατά την προκατεργασία, διευκολύνεται η υδρόλυση των κλασμάτων της βιομάζας.

Το αποτέλεσμα της προκατεργασίας είναι η παραγωγή δύο ρευμάτων, το στερεό κλάσμα που είναι υψηλής περιεκτικότητας σε κυτταρίνη και το υγρό κλάσμα που ανάλογα την προακτεργασία περιέχει λιγνίνη και ημικυτταρίνη σε διαφορετικές περιεκτικότητες. Το υγρό κλάσμα, λόγω των οργανικών οξέων και φαινολικών προϊόντων που περιέχει, φιλτράρεται και μπορεί να βρει εφαρμογή στην βιομηχανία τροφίμων ως πρόσθετο ζωοτροφών. Το στερεό ρεύμα, που είναι και το επιθυμητό προϊόν της διεργασίας, είναι εμπλουτισμένο σε κυτταρίνη συγκριτικά με το αρχικό υλικό λόγω απομάκρυνσης της ημικυτταρίνης και λιγνίνης στο υγρό κλάσμα και οδηγείται για ενζυμική υδρόλυση ώστε να μετατραπεί σε γλυκόζη.

Για να θεωρηθεί αποτελεσματική η προκατεργασία της βιομάζας θα πρέπει να τηρεί κάποιες προϋποθέσεις. Το πιο σημαντικό είναι να μην αυξάνει σε μεγάλο βαθμό το κόστος, που εξαρτάται κυρίως από τις ενεργειακές και χημικές ανάγκες της προκατεργασίας. Για να θεωρηθεί κερδοφόρα η διεργασία θα πρέπει πέρα από οικονομική να είναι ενεργειακά και χημικά αποτελεσματική. Πιο συγκεκριμένα, με τον όρο χημικά αποτελεσματική εννοείται η μετατροπή των πολυσακχαριτών στα

επιθυμητά σάκχαρα σε τέτοιο βαθμό ώστε να προκύπτει μια διεργασία υψηλής απόδοσης (Bułkowska and Klimiuk 2016).

Καθώς κύριος στόχος της προκατεργασίας είναι η βελτιστοποίηση της ενζυμικής υδρόλυσης, θα πρέπει να αποφεύγεται ο σχηματισμός ανασταλτικών προϊόντων στον μεταβολισμό των κυττάρων ή στη λειτουργία των ενζύμων αλλά και η πλύση του προκατεργασμένου υλικού. Μέσα από μελέτες που έχουν διεξαχθεί έχει βρεθεί ότι προκατεργασμένα υλικά που έχουν πλυθεί πριν την ενζυμική υδρόλυση παρουσιάζουν υψηλές απώλειες σακχάρων οδηγώντας σε μείωση της απόδοσης της διεργασίας (Bułkowska and Klimiuk 2016).



Εικόνα 7-Σχηματική απεικόνιση του ρόλου της προκατεργασίας

Αν και έχουν αναπτυχθεί αρκετές μέθοδοι για την προκατεργασία της λιγνινοκυτταρινούχου βιομάζας, κάποιες από αυτές έχουν αποδειχθεί αποτελεσματικές. Έτσι, χωρίζονται σε 2 μεγάλες κατηγορίες, μηχανικές και θερμοχημικές, με τις δεύτερες να χωρίζονται σε αλκαλικές, βιολογικές, οξειδωτικές και όξινες.

2.1.1 Αλκαλική προκατεργασία

Το μεγάλο πλεονέκτημα αυτής της μεθόδου είναι η πλήρης απομάκρυνση της λιγνίνης και ενός μέρους της ημικυτταρίνης, γι' αυτό και η επιλογή των βάσεων εξαρτάται από το ποσοστό της λιγνίνης που περιέχεται στη βιομάζα. Συγκριτικά με τις άλλες μεθόδους προκατεργασίας, εδώ συναντώνται χαμηλές θερμοκρασίες και πιέσεις όμως ο χρόνος προκατεργασίας είναι πολύ μεγαλύτερος, ώρες με ημέρες. Οι πιο συνηθισμένες βάσεις που χρησιμοποιούνται είναι το καυστικό νάτριο, κάλιο, το υδροξείδιο του ασβεστίου και του αμμωνίου, με το πρώτο να αποτελεί το πιο σύνηθες στην χρήση του. Το καυστικό νάτριο προκαλεί διόγκωση της βιομάζας, αυξάνοντας έτσι την επιφάνεια της κυτταρίνης και μειώνοντας την κρυσταλλικότητά

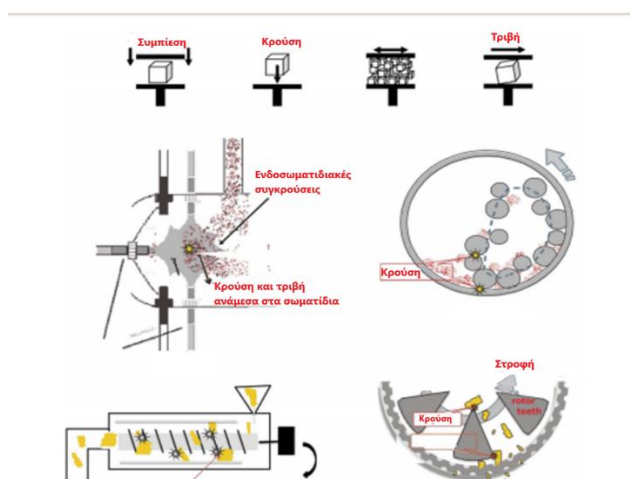
της με αποτέλεσμα την καταστροφή της δομής της λιγνίνης άρα και την πιο εύκολη πρόσβαση του ενζύμου στην κυτταρίνη για την υδρόλυση που θα ακολουθήσει.

Αν και κυρίως η μέθοδος χρησιμοποιείται με καυστικό νάτριο και το υδροξείδιο του ασβεστίου έχει αποδειχθεί αρκετά αποτελεσματικό και είναι το πιο φθηνό συγκριτικά με τα άλλα. Στην προκατεργασία με υδροξείδιο του ασβεστίου αναμειγνύεται το υδροξείδιο του ασβεστίου με νερό, ψεκάζεται στην βιομάζα και αποθηκεύεται για μερικές ώρες με ημέρες. Με την χρήση αυτής της βάσης παρατηρείται και απομάκρυνση άμορφων συστατικών, λιγνίνη ενώ αν είναι επιτυχής η προκατεργασία απομακρύνονται οι ακετυλομάδες με αποτέλεσμα την αύξηση της επιδεκτικότητας της κυτταρίνης και της ημικυτταρίνης.

Μετά το πέρας της προκατεργασίας ένα μεγάλο μέρος των βάσεων μπορεί να ανακτηθεί μειώνοντας έτσι το κόστος της διεργασίας. Έχει βρεθεί ότι οι αλκαλικές προκατεργασίες είναι πιο αποτελεσματικές σε γεωργικά υπολείμματα παρά σε είδη ξύλου (Bułkowska and Klimiuk 2016).

2.1.2 Μηχανικές μέθοδοι

Όλες οι μέθοδοι προκατεργασίας έχουν ένα αρχικό στάδιο άλεσης με σκοπό τον θρυμματισμό της βιομάζας ώστε να μειωθεί το μέγεθος και η κοκκομετρία της (Bułkowska and Klimiuk 2016). Με αυτό τον τρόπο η βιομάζα είναι πιο εύκολη στη διαχείρισή της αλλά επηρεάζεται και η μοριακή δομή της κάνοντας την πιο προσβάσιμη σε ένζυμα. Με την μηχανική προκατεργασία επιτυγχάνεται μείωση της κρυσταλλικότητας της κυτταρίνης αυξάνοντας την παραγωγικότητα των ενζύμων, μείωση του μεγέθους των μορίων και αύξηση του μεγέθους των πόρων τους. Η μείωση του μεγέθους επιτυγχάνεται με τη μέθοδο της άλεσης για διαφορετικές μηχανικές καταπονήσεις όπως είναι η συμπίεση, κρούση και η τριβή που φαίνονται και στην Εικόνα 8.



Εικόνα 8-Σχηματική απεικόνιση της μεθόδου άλεσης για διαφορετικές μηχανικές καταπονήσεις (Barakat et al. 2014)

2.1.3 Βιολογικές μέθοδοι

Σε αντίθεση με όλες τις προαναφερθείσες μεθόδους, οι βιολογικές είναι διεργασίες ήπιες, με μικρή εξάρτηση από χημικά και φιλικές προς το περιβάλλον που χρησιμοποιούν μικροοργανισμούς, κυρίως βακτήρια και μύκητες λευκής και μαλακής σήψης. Η λειτουργία των μικροοργανισμών είναι να παράγουν τα απαιτούμενα ένζυμα, όπως οι λακκάσες και οι υπεροξειδάσες, ώστε να πραγματοποιηθεί αποικοδόμηση της λιγνίνης με την χρήση ενζύμων και να μειωθεί ο βαθμός πολυμερισμού της κυτταρίνης. Χαρακτηριστικά παραδείγματα τέτοιων μικροοργανισμών είναι οι *Phanerochaete chrysosporium*, *Lentinus edodes*, *Pleurotes spp.*, *Penicillium camemberti*. Ως ήπιες διεργασίες έχουν μικρές ενεργειακές απαιτήσεις όμως η ενζυμική υδρόλυση από τα παραγόμενα ένζυμα των μικροοργανισμών γίνεται σε πολύ αργούς ρυθμούς και τα προϊόντα της λιγνίνης λειτουργούν ως παρεμποδιστές για την ανάπτυξη των μικροοργανισμών. Προς το παρόν, οι βιολογικές μέθοδοι θεωρούνται πιο αποδοτικές σε συνδυασμό με άλλες μεθόδους ενώ γίνονται έρευνες για την χρήση μικροοργανισμών ταχύτερης και πιο αποτελεσματικής αποικοδόμησης (Saritha, Arora, and Lata 2012).

2.1.4 Οξειδωτικές

Επεξεργασία με οργανικό διαλύτη (Organosolv)

Η μέθοδος αυτή χρησιμοποιεί οργανικούς διαλύτες για την εξαγωγή της λιγνίνης από την βιομάζα και είναι μια διαλείπωντος έργου διεργασία κατά την οποία παράγονται δύο ρεύματα, ένα υγρό που αποτελείται από λιγνίνη και ημικυτταρίνη και ένα στερεό με καθαρή κυτταρίνη. Οι οργανικοί διαλύτες που συναντώνται σε αυτή την μέθοδο είναι συνήθως η μεθανόλη, αιθανόλη, ακετόνη, οργανικά οξέα κυρίως το φορμικό και οξικό οξύ, υπεροξικό οξύ (PAA).

Αν και είναι εύκολη η ανάκτηση των οργανικών διαλυτών μέσω απόσταξης ώστε να επαναχρησιμοποιηθούν για την επόμενη προκατεργασία, λόγω του υψηλού κόστους τους θα πρέπει να ανακτηθεί όσο το δυνατόν μεγαλύτερη ποσότητα οδηγώντας σε υψηλές ενεργειακές απαιτήσεις. Επιπλέον, λόγω της υψηλής ανάφλεξης των οργανικών διαλυτών θα πρέπει η προκατεργασία με οργανικό διαλύτη να γίνεται κάτω από αυστηρά ελεγχόμενες συνθήκες ώστε να μην προκληθούν περιστατικά πυρκαγιάς και έκρηξης. Τα στερεά προϊόντα της προκατεργασίας θα πρέπει να ξεπλυθούν πριν την πλύση με νερό και με οργανικά διαλύματα ώστε να αποφευχθεί η επανακαταβύθιση της διαλυτής λιγνίνης στο στερεό κλάσμα. Το μεγαλύτερο πλεονέκτημα αυτής της μεθόδου είναι η παραλαβή καθαρής λιγνίνης (X. Zhao, Cheng, and Liu 2009) .

Υγρή οξείδωση

Σε αυτή την μέθοδο χρησιμοποιείται νερό με αέρα ή καθαρό οξυγόνο σε θερμοκρασίες πάνω από 120 °C. Σε υλικά με χαμηλή περιεκτικότητα σε λιγνίνη η βιομάζα κατεργάζεται για 10-15 min σε περίπου 10 bar και θερμοκρασία 170-200 °C. Για θερμοκρασίες μέχρι 160 °C ευνοούνται οι αντιδράσεις υδρόλυσης με αποτέλεσμα να επιτυγχάνεται μερική διαλυτοποίηση της λιγνίνης και της ημικυτταρίνης. Με αύξηση της πίεσης μπορεί να επιτευχθεί αύξηση του ρυθμού της υδρόλυσης και της αποικοδόμησης της λιγνίνης ενώ περαιτέρω αύξηση της θερμοκρασίας ευνοεί τις αντιδράσεις οξείδωσης και καταστρέφει τα σάκχαρα της ημικυτταρίνης ενώ προκαλεί και υδρόλυση της κυτταρίνης (Alvira et al. 2010).

2.1.5 Έκρηξη αμμωνίας (AFEX)

Κατά την προκατεργασία με έκρηξη αμμωνίας, η βιομάζα πρώτα κατεργάζεται με υγρή αμμωνία σε αναλογία 2kg NH₃ ανά 1kg ξηρής βιομάζας, για 10-60 min ώστε να μπορέσει η αμμωνία να διαβρέξει όλο το υλικό. Η παραμονή της βιομάζας στην αμμωνία γίνεται σε μικρούς χρόνους καθώς η αμμωνία έχει χαμηλότερο ιξώδες συγκριτικά με το νερό και η διείδυσή της στην βιομάζα γίνεται σχετικά γρήγορα. Σε αυτή τη μέθοδο χρησιμοποιούνται ήπιες θερμοκρασίες, μικρότερες των 100 °C, αλλά υψηλές πιέσεις που ξεπερνούν και τα 3MPa και στο τέλος της προκατεργασίας πραγματοποιείται αποσυμπίεση και η αμμωνία ανακυκλώνεται.

Σαν μέθοδος εμφανίζει πολλά πλεονεκτήματα καθώς δεν δημιουργούνται παρεμποδιστές και μόνο ένα μικρό ποσοστό της στερεής βιομάζας διαλύεται ενώ η ημικυτταρίνη και η λιγνίνη μένουν ανέπαφες. Επιπλέον, παρατηρείται αύξηση της ελεύθερης ειδικής επιφάνειας λόγω της έντονης αποσυμπίεσης στο τέλος της προκατεργασίας, με αποτέλεσμα να αυξάνεται η δραστηριότητα της κυτταρίνης. Ως μειονέκτημα της μεθόδου θα μπορούσε να θεωρηθεί το κόστος συμπίεσης που με την σειρά του επηρεάζει τα λειτουργικά κόστη της όλης διεργασίας. Ωστόσο αν γίνει αποτελεσματική και επαρκής ανάκτηση της αμμωνίας αυτό το κόστος μπορεί να μειωθεί σημαντικά. Τέλος, σαν μέθοδος είναι αποτελεσματική για υλικά με μικρό ποσοστό λιγνίνης περιορίζοντας έτσι την χρήση της (Bułkowska and Klimiuk 2016; P. Kumar et al. 2009).

2.1.7 Έκρηξη ατμού

Η προκατεργασία με την έκρηξη ατμού αποτελεί την πιο διαδεδομένη μέχρι στιγμής μέθοδο. Η λογική της μεθόδου είναι πως η βιομάζα υποβάλλεται σε ατμό υπό πίεση για δευτερόλεπτα έως μερικά λεπτά και ξαφνικά αποσυμπιέζεται. Η όλη διαδικασία διαρκεί όσο χρειάζεται ώστε η ημικυτταρίνη να αποικοδομηθεί και λόγω της υψηλής θερμοκρασίας μετασχηματίζεται και η λιγνίνη. Η βιομάζα εκτίθεται σε υψηλής θερμοκρασίας ατμού, 190-240 °C, ώστε τα μόρια του νερού να εισέλθουν στην βιομάζα και μετά από λίγα λεπτά, 3-8 min, γίνεται αποσυμπίεση προκαλώντας ρήξη

στην δομή της βιομάζας και αύξηση στην ελεύθερη ειδική επιφάνεια αυξάνοντας έτσι την διαθεσιμότητα της κυτταρίνης για την ενζυμική υδρόλυση που θα ακολουθήσει (Srinivasan and Ju 2010).

Όταν γίνεται σε συνδυασμό με αυτοϋδρόλυση, η οποία προκαλείται από τον σχηματισμό οργανικών οξέων από τα ήδη υπάρχοντα οξέα που έχει η βιομάζα, παρατηρείται μερική υδρόλυση της ημικυτταρίνης. Ένας τρόπος ώστε να αυξηθεί περαιτέρω η δυνατότητα υδρόλυσης της κυτταρίνης είναι η προσθήκη κάποιου όξινου καταλύτη όπως το θειικό οξύ (H_2SO_4) ή το διοξείδιο του θείου (SO_2), πριν την προκατεργασία. Συνήθως προτιμάται η χρήση του SO_2 γιατί εμποτίζεται καλύτερα και ταχύτερα το υλικό. Οι βέλτιστες συνθήκες για αυτήν την διεργασία είναι εμποτισμός της βιομάζας σε 0.5-6% w/w καταλύτη, θερμοκρασία ατμού 175-215°C και παραμονή για 2-10 min. Όταν πραγματοποιείται υπό αυτές τις συνθήκες επιτυγχάνεται ανάκτηση 65-80% των μονοσακχαριτών της ημικυτταρίνης, πεντόζες και εξόζες (Limayem and Ricke 2012).

Πλεονέκτημα αυτής της μεθόδου, πέρα από το ότι είναι οικονομικά αποδοτική, είναι η αποφυγή δημιουργίας παρεμποδιστών αλλά και η αύξηση του ποσοστού ανάκτησης των σακχάρων όταν προηγηθεί της εκτόνωσης του ατμού, θέρμανση του υλικού σε ήπιες συνθήκες, 150-180 °C, ώστε να διαλυτοποιηθεί η ημικυτταρίνη και η λιγνίνη. Ωστόσο, λόγω της υψηλής θερμοκρασίας που επικρατεί καταστρέφεται ένα κομμάτι της ξυλάνης που έχει προέλθει από την ημικυτταρίνη, δεν απομακρύνεται πλήρως η λιγνίνη λόγω της ατελούς διαλυτοποίησής της. Τέλος στην περίπτωση που δημιουργηθούν παρεμποδιστές, θα πρέπει η προκατεργασμένη βιομάζα να ξεπλυθεί με νερό ώστε να παρασυρθούν τα ανασταλτικά προϊόντα. Με αυτό τον τρόπο όμως παρασύρονται και τα σάκχαρα που έχουν προκύψει από την υδρόλυση της ημικυτταρίνης.

2.1.7 Έκρηξη διοξειδίου του άνθρακα (CO_2)

Πρόκειται για μια εναλλακτική μέθοδο της έκρηξης ατμού και αμμωνίας καθώς πραγματοποιείται σε χαμηλότερες θερμοκρασίες από την πρώτη και εμφανίζει μειωμένο κόστος συγκριτικά με την δεύτερη. Για πρώτη φορά χρησιμοποιήθηκε ως αντικαταστάτης της έκρηξης ατμού και αμμωνίας σε τριφύλλι χωρίς να έχει ικανοποιητικά αποτελέσματα καθώς για υψηλότερες πιέσεις παρουσίαζε μικρότερη απόδοση. Έπειτα, όμως από μελέτες που έγιναν διαπιστώθηκε ότι παρουσίας ατμού ή διαβρεγμένης βιομάζας η μέθοδος εμφάνιζε μεγαλύτερη αποτελεσματικότητα. Ο λόγος είναι πως το CO_2 σε υψηλές θερμοκρασίες αντιδρά με το συμπύκνωμα του ατμού παράγοντας H_2CO_3 ενισχύοντας έτσι την αυτοϋδρόλυση (Bułkowska and Klimiuk 2016).

Σαν μέθοδος βασίζεται στην χρήση του CO_2 ως υπερκρίσιμο ρευστό ώστε να γίνει αποτελεσματική απομάκρυνση της λιγνίνης και λειτουργεί σε πολύ υψηλές πιέσεις ενώ αποτρέπει και τον σχηματισμό παρεμποδιστών (Zheng et al. 1995).

2.1.8 Υδροθερμική προκατεργασία

Η υδροθερμική προκατεργασία ή αλλιώς υδροθερμόλυση ανήκει στις φυσικοχημικές μεθόδους και είναι παρόμοια με την έκρηξη ατμού. Σε αυτόν τον τύπο προκατεργασίας αντί ατμού χρησιμοποιείται νερό υψηλής θερμοκρασίας, από 170 έως 230 °C, και στοχεύει στην υδρόλυση της ημικυτταρίνης κυρίως σε μίγματα μονομερών με ολιγομερή. Αυτό έχει ως αποτέλεσμα την παραγωγή οξικού οξέος, από τους οξικούς εστέρες της ημικυτταρίνης που υδρολύθηκαν, το οποίο λειτουργεί ως καταλύτης στην όλη διεργασία ελαττώνοντας το pH των υγρών (Saritha, Arora, and Lata 2012).

Σαν μέθοδος είναι παρόμοια με την έκρηξη ατμού που αναλύθηκε παραπάνω. Η διαφορά της όμως είναι οι χαμηλότερες θερμοκρασίες νερού και η μικρότερη συγκέντρωση βιομάζας που απαιτείται δίνοντας της πλεονέκτημα έναντι της έκρηξης ατμού με την αυξανόμενη ανάκτηση των σχηματιζόμενων σακχάρων. Ωστόσο, λόγω της υψηλότερης περιεκτικότητας σε νερό, το διάλυμα των σακχάρων που προκύπτει είναι αραιωμένο και χρειάζεται επιπλέον διεργασίες περισσότερο ενεργοβόρες.

Είναι μια ιδιαίτερα ελκυστική μέθοδος διότι δεν απαιτεί την χρήση εξοπλισμού ανθεκτικού στην διάβρωση, όπως γίνεται στην προκατεργασία με τα οξέα, και επειδή το εύρος θερμοκρασιών που χρησιμοποιούνται είναι πάνω από το σημείο ζέσεως του νερού, ευνοείται η υδρόλυση.

2.1.9 Οζονόλυση

Το όζον είναι ένα ισχυρό οξειδωτικό με την ικανότητα να απομακρύνει ένα μεγάλο ποσοστό της λιγνίνης και αντίθετα με όλες τις άλλες χημικές προκατεργασίες να μην παράγει τοξικές ουσίες. Σαν μέθοδος επικεντρώνεται στην διάσπαση της λιγνίνης καθώς αποικοδομεί τον αρωματικό δακτύλιο της και όχι τόσο της ημικυτταρίνης αν και αυτή επηρεάζεται σε ένα μικρό βαθμό. Οι συνθήκες που πραγματοποιείται η προκατεργασία είναι ήπιες, θερμοκρασία δωματίου και χαμηλές πιέσεις. Το όζον έχει το πλεονέκτημα ότι μπορεί να αποσυντεθεί με αύξηση της θερμοκρασίας ή τη χρήση ενός καταλύτη, οδηγώντας έτσι στο σχεδιασμό διεργασιών που θα ελαχιστοποιούν την ρύπανση του περιβάλλοντος. Ένα μεγάλο μειονέκτημα όμως αυτής της μεθόδου είναι η ποσότητα όζοντος που χρειάζεται καθιστώντας την όλη διεργασία οικονομικά μη αποδοτική (Alvira et al. 2010; Saritha, Arora, and Lata 2012).

2.1.10 Προκατεργασία με αραιό οξύ σε ήπιες συνθήκες

Η όξινη υδρόλυση με αραιό ή πυκνό οξύ είναι η αρχαιότερη μέθοδος για την μετατροπή της βιομάζας σε καύσιμα και άλλα προϊόντα. Ωστόσο, μέσα από έρευνες που έχουν διεξαχθεί έχει βρεθεί πως μπορεί να χρησιμοποιηθεί και ως προκατεργασία αλλά μόνο στην περίπτωση του αραιού οξέος.

Αν και με την χρήση πυκνών οξέων επιτυγχάνονται μεγάλα ποσοστά στην ενζυμική υδρόλυση, είναι επικίνδυνα, τοξικά και διαβρωτικά με αποτέλεσμα να χρειάζεται εξοπλισμός ανθεκτικός στη διάβρωση, αυξάνοντας με αυτό τον τρόπο το κόστος της διεργασίας. Συνεπώς, η προκατεργασία αυτή αφορά συγκεντρώσεις οξέων 0,5-1,2% w/w και θερμοκρασίες 170-190 °C.

Το πιο σύνηθες αντιδραστήριο είναι αραιωμένο θειικό οξύ λόγω της αποτελεσματικότητας και του μειωμένου κόστους του. Κατά την εμβάπτιση του υλικού στο θειικό οξύ υδρολύεται η ημικυτταρίνη αρχικά σε ξυλόζη και άλλα σάκχαρα και στη συνέχεια παράγεται φουρφουράλη, που λειτουργεί παρεμποδιστικά σε περίπτωση ανάπτυξης κάποιου επιθυμητού μικροοργανισμού, όπως γίνεται στη ζύμωση. Η εξουδετέρωση του οξέος είναι απαραίτητη για τις μετέπειτα υδρολύσεις γι' αυτό προστίθεται υδροξείδιο του ασβεστίου ώστε το pH να γίνει ουδέτερο και επομένως παράγεται CaSO₄ ως παραπροϊόν της αντίδρασης ανάμεσα στο οξύ και την βάση. Σαν μέθοδος έχει βρεθεί ότι αυξάνει σημαντικά το ποσοστό της υδρόλυσης όμως συγκριτικά με τις μεθόδους έκρηξης ατμού και αμμωνίας είναι πιο ακριβή (Alvira et al. 2010).

2.2 Υδρόλυση βιομάζας

Με τον όρο υδρόλυση της βιομάζας περιγράφεται η διεργασία μετατροπής της κυτταρίνης και ημικυτταρίνης στα μονομερή τους σάκχαρα, γλυκόζη και ξυλόζη. Χωρίζεται σε δύο κατηγορίες, την χημική και την ενζυμική υδρόλυση.

Η μετατροπή της λιγνινοκυτταρινούχου βιομάζας στα παραπάνω σάκχαρα εξαρτάται από τις συνθήκες διεξαγωγής της υδρόλυσης και τον τύπο της βιομάζας που χρησιμοποιείται. Στην περίπτωση της ενζυμικής υδρόλυσης, που χρησιμοποιήθηκε και στην παρούσα διπλωματική εργασία, οι παράγοντες που την επηρεάζουν μπορούν να χωριστούν σε δύο μεγάλες ομάδες, στους παράγοντες που σχετίζονται με το ένζυμο και στους παράγοντες που σχετίζονται με το υπόστρωμα. Ανάλογα τον τύπο προκατεργασίας που επιλέγεται, την ποσότητα και την ενεργότητα του ενζύμου η μετατροπή σε σάκχαρα διαφέρει.

Στην περίπτωση του υποστρώματος είναι διάφοροι οι παράγοντες που μπορούν να επηρεάσουν την μετατροπή της βιομάζας και συνδέονται άμεσα με τον τύπο προκατεργασίας που έχει προηγηθεί. Μερικοί από αυτούς είναι η σύνθεση και η δομή της βιομάζας, η κρυσταλλικότητα της κυτταρίνης και ο βαθμός πολυμερισμού της, η διαθέσιμη ελεύθερη επιφάνεια του υποστρώματος και το πορώδες του και το ποσοστό της λιγνίνης και της ημικυτταρίνης που περιέχεται (Zabed et al. 2016).

Πιο συγκεκριμένα :

- η σύνθεση και δομή υποστρώματος
- η κρυσταλλικότητα της κυτταρίνης
- ο βαθμός πολυμερισμού της κυτταρίνης
- η διαθέσιμη επιφάνεια του υποστρώματος
- η παρουσία της λιγνίνης στη βιομάζα που λειτουργεί ως φυσικό εμπόδιο εμποδίζοντας την ενζυμική υδρόλυση
- το περιεχόμενο σε ημικυτταρίνη. Πιο συγκεκριμένα, απομονώνοντας την ημικυτταρίνη αυξάνει το μέγεθος των πόρων του υποστρώματος οδηγώντας σε αύξηση της προσβασιμότητας της κυτταρίνης
- το μέγεθος των σωματιδίων του υποστρώματος. Μειώνοντας το μέγεθος αυξάνεται η ειδική επιφάνεια και κατά συνέπεια η προσβασιμότητα της κυτταρίνης
- το πορώδες καθώς το μέγεθος των πόρων της βιομάζας σε σχέση με το μέγεθος των ενζύμων μπορεί να αποτελέσει βασικό παράγοντα παρεμπόδισης στην υδρόλυση της βιομάζας
- το πάχος του κυτταρικού τοιχώματος της βιομάζας που εμποδίζει τη διείσδυση του υγρού σε αυτή
- τυχόν μεταβολές στην προσβασιμότητα των ενζύμων

Η προσβασιμότητα του υποστρώματος από τα ένζυμα είναι από τους πιο σημαντικούς παράγοντες που επηρεάζουν την υδρόλυση γι' αυτό και ένας από τους κύριους στόχους της προκατεργασίας είναι η αύξηση της διαθέσιμης ελεύθερης επιφάνειας του υποστρώματος.

2.2.1 Χημική υδρόλυση

Κατά την υδρόλυση με χρήση οξέος δεν είναι απαραίτητη κάποια προκατεργασία της βιομάζας ώστε να απομακρυνθεί η λιγνίνη και να είναι εύκολη η πρόσβαση στην κυτταρίνη και την ημικυτταρίνη, χάρη στην δυνατότητα του οξέος να διαπερνά την λιγνίνη. Σε αυτό τον τύπο υδρόλυσης μπορούν να χρησιμοποιηθούν συμπυκνωμένα είτε αραιωμένα διαλύματα οξέος με τα πιο συνηθισμένα να είναι το θειικό και υδροχλωρικό οξύ. Όταν η υδρόλυση γίνεται με συμπυκνωμένο διάλυμα οξέος (10-30%) λαμβάνει χώρα σε χαμηλές θερμοκρασίες και έχει υψηλή απόδοση έως και 90%. Ωστόσο, η ποσότητα οξέος που απαιτείται για την διεργασία είναι οικονομικά ασύμφορη διότι προκαλεί προβλήματα στον εξοπλισμό, όπως η διάβρωση των μετάλλων. Έτσι, η υδρόλυση με αραιό οξύ είναι μια τεχνική που έχει αποκτήσει μεγαλύτερη αναγνώριση, χάρη στο πλεονέκτημα που δίνει με την χρήση μικρής ποσότητας οξέος (2-5%) (Verardi et al. 2012). Βέβαια δεν πρόκειται για μια τεχνική

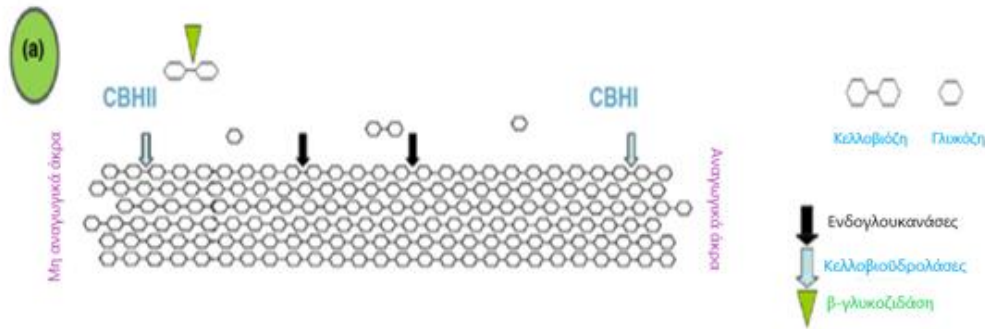
χωρίς μειονεκτήματα καθώς για την επίτευξη υψηλής απόδοσης απαιτούνται υψηλές θερμοκρασίες αποδομώντας τα σάκχαρα της ημικυτταρίνης και οδηγώντας στον σχηματισμό τοξικών παραγώγων τους, όπως είναι η φουρφουράλη και το HMF. Ο σχηματισμός αυτών οδηγεί σε μείωση των αναγωγικών σακχάρων ενώ οι υψηλές θερμοκρασίες που χρησιμοποιούνται αυξάνουν την διάβρωση του εξοπλισμού.

Η χρήση των ενζύμων έναντι των χημικών στην υδρόλυση της κυτταρίνης προσφέρει περισσότερα πλεονεκτήματα χάρη στην υψηλή εκλεκτικότητά τους και την δυνατότητά τους να λειτουργούν σε ήπιες συνθήκες. Ωστόσο, σε αντίθεση με την χημική υδρόλυση, η ενζυμική δεν έχει εφαρμοστεί σε βιομηχανική κλίμακα με την ίδια επιτυχία. Το υψηλό κόστος των ενζύμων, ο χρόνος που απαιτείται για να ολοκληρωθεί η υδρόλυση αλλά και η μικρή ποσότητα βιομάζας που πρέπει να χρησιμοποιηθεί ώστε να είναι αποτελεσματική η υδρόλυση είναι κάποιοι από τους περιορισμούς προκύπτουν κατά την ενζυμική υδρόλυση σε βιομηχανική κλίμακα. Όταν είναι λοιπόν επιθυμητή μία τέτοια διεργασία θα πρέπει να γίνει βελτιστοποίηση της ώστε να βρεθεί η ποσότητα ενζύμου και ο χρόνος της υδρόλυσης που διατηρούν το κόστος της διεργασίας στο επιθυμητό πλαίσιο (Taha et al. 2016).

2.2.2 Ενζυμική υδρόλυση

Κατά την ενζυμική υδρόλυση η διάσπαση των πολυσακχαριτών στα μονομερή τους σάκχαρα γίνεται με την χρήση ενζύμων. Τα κυριότερα ένζυμα που χρησιμοποιούνται είναι οι κυτταρινάσες, ημικυτταρινάσες και τα ένζυμα που αποικοδομούν την λιγνίνη.

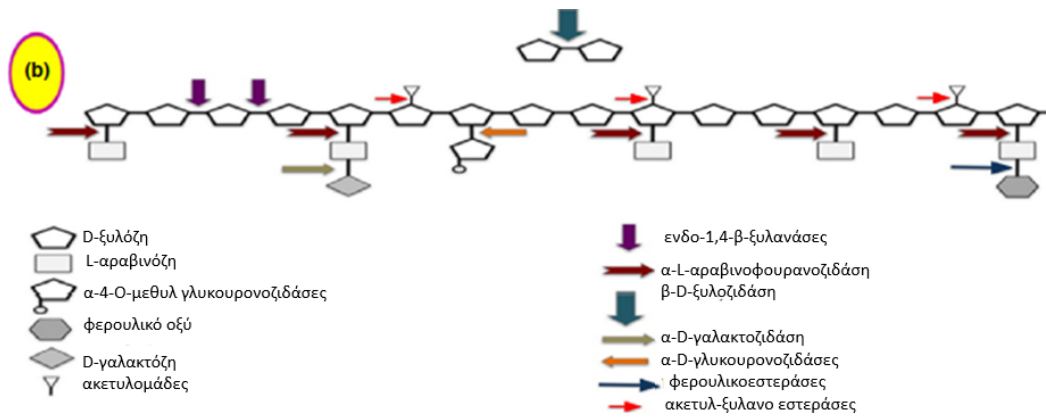
Η μετατροπή της κυτταρίνης σε γλυκόζη πραγματοποιείται με την χρήση ενζυμικού κοκτεϊλ κυτταρινασών, (τουλάχιστον 3 κυτταρινάσες). Αποτελούνται από ενδο-1-4-β-γλουκανάσες, εξωγλουκανάσες ή κελλοβιοϋδρολάσες και β-γλυκοζιδάσες. Η δράση των ενδογλουκανασών γίνεται σε άμορφες περιοχές της κυτταρίνης, χτυπώντας σε τυχαία σημεία την αλυσίδα δημιουργώντας αλυσίδες μικρότερου μήκους. Οι αλυσίδες που έχουν προκύψει αποτελούνται από αναγωγικά και μη αναγωγικά άκρα στα οποία χτυπάνε οι κελλοβιοϋδρολάσες. Πιο συγκεκριμένα, η κελλοβιοϋδρολάση I (CBHI) χτυπά τα αναγωγικά άκρα και η κελλοβιοϋδρολάση II (CBHII) τα μη αναγωγικά παράγοντας τον δισακχαρίτη κελλοβιόζη. Στο τελευταίο στάδιο γίνεται η διάσπαση του δισακχαρίτη κελλοβιόζη στο μονομερές του, την γλυκόζη. Η υδρόλυση της κελλοβιόζης επιτυγχάνεται με την δράση της β-γλυκοζιδάσης φέροντας εις πέρας την υδρόλυση της λιγνινοκυτταρινούχου βιομάζας. Στην όλη διεργασία παρατηρείται συνεργισμός των κυτταρινασών με μια άλλη οικογένεια ενζύμων, LPMOs, ώστε να δημιουργηθούν περισσότερα ελεύθερα άκρα για μετέπειτα υδρολύσεις. (Saini, Saini, and Tewari 2015; Taha et al. 2016)



Εικόνα 9-Δράση των κυτταρινασών στην αποικοδόμηση της κυτταρίνης(Taha et al. 2016)

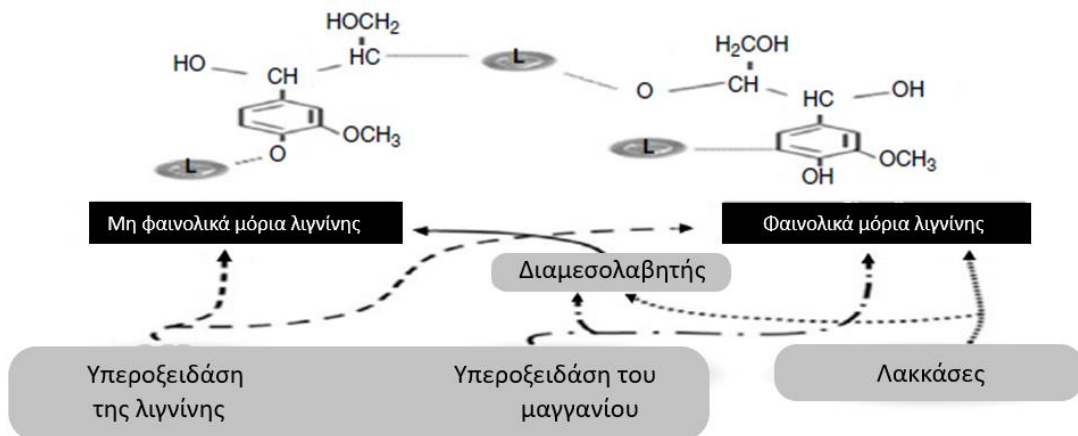
Όταν επιδιώκεται υδρόλυση της ημικυτταρίνης, λόγω της πιο περίπλοκης δομής της, το κοκτέιλ ενζύμων που πρέπει να χρησιμοποιηθεί για να την διασπάσει σε πεντόζες, εξόζες και ουρονικό οξύ, αποτελείται από περισσότερα ένζυμα. Για την ακρίβεια, για μια ολοκληρωμένη αποδόμηση της ημικυτταρίνης το ενζυμικό κοκτέιλ θα πρέπει να περιέχει ενδο-1,4-β-ξυλανάσες, 1,4-β εστεράσες της ξυλάνης, εστεράσες του φερουλικού και κουμαρικού οξέος, α-1-αραβινοφουρανοζιδάσες, α-γλυκουρονιδάσες, εστεράσες που χτυπάνε τις ακετυλομάδες της ξυλάνης, και α-4-Ο-μεθυλ γλυκουρονοζιδάσες. (Taha et al. 2016)

Καθένα από τα παραπάνω ένζυμα συμβάλλει διαφορετικά στην αποδόμηση της ημικυτταρίνης. Όπως έχει προαναφερθεί, το κύριο συστατικό της είναι η ξυλάνη που θα πρέπει κατά την αποδόμηση της ημικυτταρίνης να διασπαστεί στο μονομέρες της, την ξυλόζη. Αυτό επιτυγχάνεται με τη δράση των ενδοξυλανασών και της β-ξυλοζιδάσης. Σε πρώτο στάδιο οι ενδοξυλανάσες χτυπούν το μόριο της ξυλάνης διασπώντας την σε ολιγοσακχαρίτες και στη συνέχεια ακολουθεί η β-ξυλοζιδάση διασπώντας τους ολιγοσακχαρίτες σε ξυλόζη. Κατά αντιστοιχία με την ξυλάνη γίνεται και η διάσπαση της μαννάνης. Οι ενδομαννάσες την διασπούν σε ολιγοσακχαρίτες και η β-μαννοζιδάση με τη σειρά της, τους διασπά σε μαννόζη. Ωστόσο αυτή η διαδικασία παρουσιάζει κάποιες δυσκολίες καθώς τα μόρια της ξυλάνης και της μαννάνης είναι συνδεδεμένα στην αλυσίδα με άλλα μόρια όπως της αραβινοζης, γαλακτόζης, γλυκόζης και ακετυλομάδες. Το γεγονός αυτό οδηγεί στη χρήση κάποιων άλλων ενζύμων που έχουν ως στόχο την απόσπαση αυτών των μορίων από την κύρια αλυσίδα ώστε να διευκολυνθεί η πρόσβαση στο υπόστρωμα από τα κύρια ένζυμα που αποδομούν την ημικυτταρίνη στα μονομερή της σάκχαρα.



Εικόνα 10-Δράση των ημικυτταρινασών στην αποικοδόμηση (Taha et al. 2016)

Όσον αφορά την αποικοδόμηση της λιγνίνης, λόγω της περίπλοκης δομής της, απαιτείται η χρήση ενζυμικού κοκτέιλ οξειδωτικών ενζύμων που δρουν συνεργιστικά με τα ένζυμα της υδρόλυσης. Τα οξειδωτικά ένζυμα σπάνε τα φυσικά φράγματα των πολυσακχαριτών δίνοντας πρόσβαση στα υδρολυτικά ένζυμα στο υπόστρωμα προκειμένου να ξεκινήσει η αποδόμηση. Τα κυριότερα ένζυμα που χρησιμοποιούνται σε αυτή την διαδικασία είναι η υπεροξειδάση της λιγνίνης, υπεροξειδάση του μαγγανίου και οι λακκάσες (Taha et al. 2016).



Εικόνα 11-Δράση των ενζύμων αποικοδόμησης της λιγνίνης (Taha et al. 2016)

Το υψηλό κόστος των ενζύμων που χρησιμοποιούνται για την σακχαροποίηση της βιομάζας είναι ο κύριος λόγος που η ενζυμική υδρόλυση δεν έχει τόση αναγνώριση όσο η χημική. Τα τελευταία χρόνια όμως, χάρη στην έρευνα που έχει γίνει στην βελτιστοποίηση των ενζύμων, μεγάλος αριθμός τους παράγεται σε λογική τιμή. Παρόλ' αυτά, για την βιομηχανική κλίμακα, που όπως προαναφέρθηκε προτιμάται η χημική από την ενζυμική υδρόλυση.

Η χρήση των κυτταρινασών έναντι των χημικών θα είχε μεγαλύτερη αναγνωρισιμότητα αν βελτιωθεί η σταθερότητά τους σε χρονοβόρες διεργασίες και επιτευχθεί ανάκτηση αλλά και επαναχρησιμοποίησή τους μέσα στην διεργασία. Ένας τρόπος να συμβεί αυτό είναι ακινητοποιώντας τα ένζυμα. Βασικά πλεονεκτήματα των ακινητοποιημένων ενζύμων είναι:

- η ευκολία στο χειρισμό τους όταν βρίσκονται σε αυτή τη μορφή
- ο εύκολος διαχωρισμός τους από το προϊόν
- η πιθανή ανάκτηση και ανακύκλωσή τους
- η ελάχιστη έως μηδαμινή ύπαρξη πρωτεΐνης στο προϊόν
- η διατήρηση της σταθερότητάς τους κατά τις διεργασίες και όταν αποθηκεύονται

Στην περίπτωση που είναι επιθυμητή η ακινητοποίηση των κυτταρινασών δεν υπάρχουν πολλές μελέτες που να έχουν διεξαχθεί, καθώς κάποιες από τις τεχνικές ακινητοποίησης εμποδίζουν την πρόσδεση του ενζύμου στο υπόστρωμα και η κυτταρίνη είναι αδιάλυτη. Όμως υπάρχουν τεχνικές, όπως η δημιουργία ομοιοπολικών δεσμών, που μπορεί να επιτευχθεί η ακινητοποίησή τους. Έπειτα από έρευνες που διεξήχθησαν, βρέθηκε ότι σταθερότητα των κυτταρινασών αυξήθηκε χωρίς μάλιστα να υπάρξει σημαντική μείωση στη λειτουργικότητά τους.

2.3 Μετατροπή της παραγόμενης γλυκόζης σε φουράνια

2.3.1 Ισομερείωση της γλυκόζης προς παραγωγή φρουκτόζης

Η τεχνική ισομερείωσης της γλυκόζης εμφανίστηκε πρώτη φορά στις Η.Π.Α το 1978 για τις ανάγκες παραγωγής σιροπιών υψηλής περιεκτικότητας σε φρουκτόζη. Η πρώτη ύλη τους ήταν αμυλούχα βιομάζα κυρίως καλαμπόκι και σιτάρι και η όλη διεργασία μπορούσε να γίνει είτε ενζυμικά είτε χημικά.

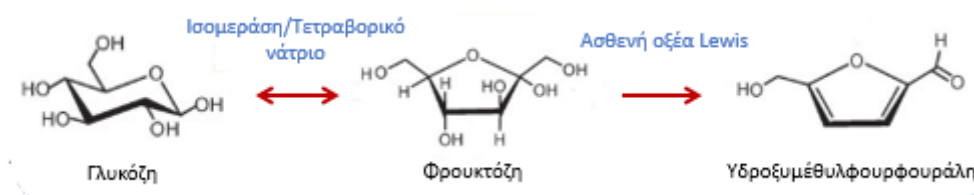
Στην περίπτωση της αλκαλικής ισομερείωσης η μέθοδος εμφάνιζε προβλήματα που μεγάλωναν το κόστος της διεργασίας, καθώς για παραγωγή φρουκτόζης πάνω από 40% σχηματίζονταν προϊόντα αποδόμησης της φρουκτόζης, που επηρέαζαν κάποιες επιθυμητές ιδιότητες του τελικού προϊόντος, όπως ήταν η γλυκύτητα του σιροπιού, το χρώμα του αλλά και η γεύση του. Συνεπώς, η αλκαλική ισομερείωση δεν είχε μεγάλη απήχηση ως μέθοδος μετατροπής της γλυκόζης σε φρουκτόζη (Antrim, Colilla, and Schnyder 1979).

Συγκριτικά με την αλκαλική ισομερείωση, η ενζυμική παρουσιάζει αρκετά πλεονεκτήματα λόγω της υψηλής εκλεκτικότητάς της αλλά και ότι σαν διεργασία είναι φιλική για το περιβάλλον. Πιο συγκεκριμένα, χάρη στο ένζυμο που την καταλύει, ισομεράση της γλυκόζης, το οποίο στοχεύει στην μετατροπή της γλυκόζης σε φρουκτόζη, δεν προκαλείται ο σχηματισμός ανεπιθύμητων προϊόντων όταν αυξάνεται η παραγωγή της φρουκτόζης.

Παρόλο που ο ρόλος των ενζύμων στην υδρόλυση είχε από νωρίς αναγνωριστεί, η χρήση τους για την παραγωγή σιροπιών με υψηλή περιεκτικότητα σε σάκχαρα δεν έγινε γνωστή μέχρι και τα τέλη του 1950. Το ένζυμο που καταλύει την μετατροπή της γλυκόζης σε φρουκτόζη είναι η ισομεράση της γλυκόζης που κατά κόρον βρίσκεται

σε ακινητοποιημένη μορφή. Ο λόγος είναι κυρίως οικονομικός, καθώς σε διαλυτοποιημένη μορφή δεν είναι εφικτή η επαναχρησιμοποίησή του με μη κοστοβόρους τρόπους.

Στις αρχές, η χρήση αυτού του ενζύμου επικεντρωνόταν για την παραγωγή σιροπιών με υψηλής περιεκτικότητας φρουκτόζη αλλά στη συνέχεια βρήκε εφαρμογή και σε άλλους κλάδους εκτός της βιομηχανίας τροφίμων. Τα πρώτα χρόνια εφαρμογής αυτής της μεθόδου είχε παρατηρηθεί ότι τα ποσοστά της παραγόμενης φρουκτόζης άγγιζαν το 50%, ενώ το επιθυμητό τελικό προϊόν, HMF, το 28%. Συνεπώς, έπρεπε να βρεθεί ένας μηχανισμός ώστε η αντίδραση να μετατοπιστεί προς την παραγωγή της φρουκτόζης και κατ'έπείτα του HMF. Αυτό έγινε με την προσθήκη του τετραβορικού νατρίου ($\text{Na}_2\text{B}_4\text{O}_7 \cdot 10\text{H}_2\text{O}$), όπου παρατηρήθηκε πως τα ποσοστά της φρουκτόζης και του HMF έφτασαν στο 87.8% και 65% αντίστοιχα. Η βέλτιστη αναλογία τετραβορικού νατρίου-γλυκόζης ήταν 1:2, διότι σε μεγαλύτερες συγκεντρώσεις τετραβορικού νατρίου παρεμποδιζόταν η μετατροπή της γλυκόζης σε φρουκτόζη και δεν έφτανε στη μέγιστη απόδοση (Antrim, Colilla, and Schnyder 1979; Huang et al. 2010).



Εικόνα 12-Σχηματική απεικόνιση της μετατροπής της γλυκόζης σε φρουκτόζη και HMF

Ο κύριος λόγος που είναι επιθυμητά μεγάλα ποσοστά φρουκτόζης είναι η μετέπειτα επεξεργασία που επιδέχονται για την παραγωγή υδρομεθυλφουρφουράλης (HMF). Από την στιγμή που θα παραχθεί υψηλή ποσότητα φρουκτόζης από την ισομερείωση, η παραγωγή του HMF δεν εμφανίζει δυσκολίες. Έχοντας διεξαχθεί αρκετές μελέτες για την παραγωγή του HMF από φρουκτόζη, βρέθηκε πως με το σύστημα αραιό υδροχλωρικό οξύ (HCl) και διάλυμα με χαμηλές θερμοκρασίες βρασμού για την παραλαβή του τελικού προϊόντος (low boiling extraction solvent), παράγονταν HMF σε υψηλά ποσοστά χωρίς να απαιτείται αρκετή ενέργεια αυξάνοντας με αυτό τον τρόπο το κόστος της διεργασίας (Huang et al. 2010).

2.3.2 Χημειοκαταλυτική μετατροπή της φρουκτόζης σε φουράνια

Τα τελευταία χρόνια, το ενδιαφέρον έχει στραφεί στην παραγωγή των χημικών που προέρχονται από βιομάζα και ένας τρόπος είναι η μετατροπή των πεντόζων (ξυλόζη) και εξόζων (γλυκόζη, φρουκτόζη) σε φουράνια. Οι πεντόζες και οι εξόζες είναι οι πιο άφθονοι μονοσακχαρίτες στη φύση, καθώς αποτελούν δομικά στοιχεία της ημικυτταρίνης και κυτταρίνης αντίστοιχα.

Όσον αφορά, τις πεντόζες και πιο συγκεκριμένα την ξυλόζη, έχει βρεθεί ότι με χρήση διάφορων χημικών καταλυτών μετατρέπεται σε φουρφουράλη (FF) με ικανοποιητική απόδοση. Όσο αυξάνεται η συγκέντρωση της ξυλόζης, η παραγωγή της φουρφουράλης συνεχίζει να είναι υψηλή και το πλεονέκτημά της έναντι του HMF είναι πως στις ίδιες συνθήκες εμφανίζει μεγαλύτερα ποσοστά παραγωγής αλλά και περισσότερη ευκολία στην όλη διεργασία (J. Wang et al. 2014). Η φουρφουράλη στη συνέχεια μπορεί είτε να οξειδωθεί σε 2-φουρανοκαρβοξυλικό οξύ (2-FCA) και να χρησιμοποιηθεί ως μονομερές σε πολυεστέρες προσδίδοντάς τους νέες ιδιότητες (Delidovich et al. 2016), είτε να μετατραπεί σε 2-φουρφουρυλαμίνη (FFA) και να χρησιμοποιηθεί σε συστήματα για να ενισχύσει περαιτέρω τη θερμική σταθερότητά τους (Wang et al.).

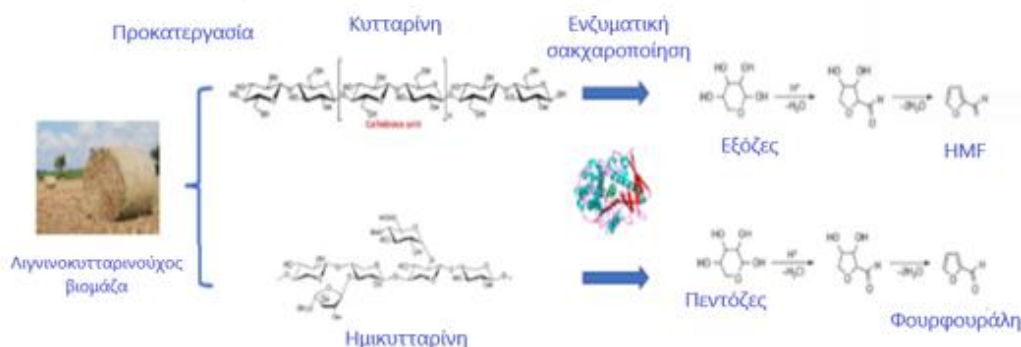
Όσον αφορά τις εξόζες, η γλυκόζη και φρουκτόζη αποτελούν οικονομικές πρώτες ύλες για την παραγωγή χημικών. Κατά την μετατροπή τους, παράγονται διάφορα φουρανικά προϊόντα, που με την σειρά τους μπορούν να αξιοποιηθούν ως πρώτες ύλες για την δημιουργία νέων προϊόντων ή για την αντικατάσταση παλαιών. Το πιο σημαντικό από τα παράγωγα είναι η υδρομεθυλφουρφουράλη (HMF) που αποτελεί μια ανανεώσιμη πρώτη ύλη για την σύνθεση φαρμακευτικών ουσιών αλλά και θερμοάντοχων πολυμερών. Πρόκειται για μια εναλλακτική πρόταση στον τομέα των πολυμέρων χάρη στην υψηλή αντοχή της σε θερμικές κατεργασίες (Kazi et al. 2011; Tong, Ma, and Li 2010). Η παραγωγή της μπορεί να γίνει είτε απευθείας από γλυκόζη είτε να μεσολαβήσει μια διεργασία κατά την οποία η γλυκόζη μετατρέπεται σε φρουκτόζη (ισομερείωση γλυκόζης) και να ακολουθήσει μετατροπή της φρουκτόζης σε HMF. Αν και φαίνεται πιο χρονοβόρα διαδικασία η μετατροπή της γλυκόζης σε φρουκτόζη και στη συνέχεια η παραγωγή του HMF, από μελέτες που έχουν διεξαχθεί βρέθηκε ότι όταν η παραγωγή γινόταν απευθείας από γλυκόζη ήταν λιγότερο αποδοτική (Tong, Ma, and Li 2010). Ανάμεσα στη γλυκόζη και τη φρουκτόζη, η δεύτερη, λόγω της δομής της διευκολύνει την παραγωγή HMF, αφού η αφυδάτωση του σακχάρου είναι πιο ευθύς. Γι αυτό το λόγο, είναι προτιμότερη η χρήση της φρουκτόζης σαν πρώτη ύλη για μια διεργασία παραγωγής HMF ικανοποιητικής απόδοσης.

Η παραγωγή του HMF από φρουκτόζη γίνεται σε δύο στάδια. Σε πρώτη φάση, η λιγνινοκυτταρινούχος βιομάζα υδρολύεται σε γλυκόζη, ακολουθεί ισομερείωση της γλυκόζης σε φρουκτόζη και στη συνέχεια η φρουκτόζη μετατρέπεται σε HMF. Έχει βρεθεί μέσα από μελέτες πως μεταξύ διάφορων μεταλλικών καταλυτών για την μετατροπή των σακχάρων, ο κασσίτερος (Sn) έχει υψηλότερη δραστηριότητα χάρις την

δυνατότητά του να ενώνεται με το άτομο του οξυγόνου στο καρβονύλιο (που σχηματίζεται όταν ο δακτύλιος της γλυκόζης είναι ανοιγμένος) και να chelate με τα άτομα του οξυγόνου από τις αλκοολές (Marianou et al. 2018). Οι πιο συχνοί και οικονομικοί καταλύτες είναι το θειικό (H_2SO_4), το φωσφορικό (H_3PO_4) και το υδροχλωρικό οξύ (HCl) (Tong, Ma, and Li 2010).

Προτιμάται η χρήση στερεών από υγρών καταλυτών καθώς :

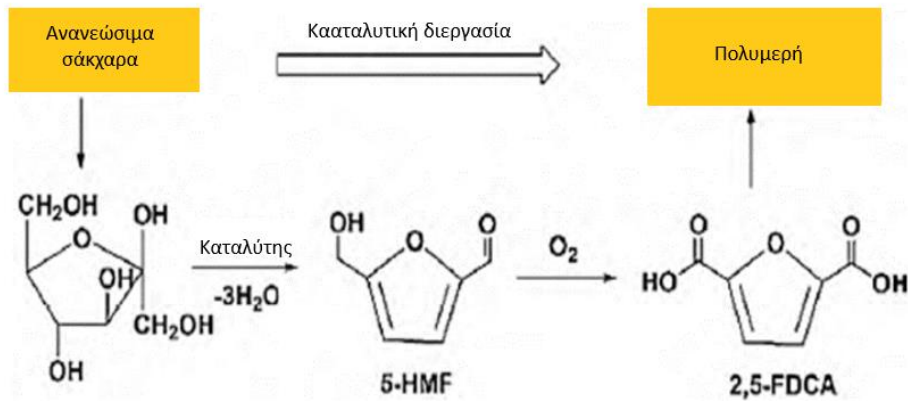
- ανακυκλώνονται και διευκολύνουν τον μετέπειτα διαχωρισμό των προϊόντων
- αντέχουν σε υψηλές θερμοκρασίες που είναι το επιθυμητό διότι για υψηλές θερμοκρασίες μειώνεται ο χρόνος που χρειάζεται για να πραγματοποιηθεί η αντίδραση και ευνοείται ο σχηματισμός του HMF, ενώ αντίθετα, για μεγάλους χρόνους αντίδρασης ευνοείται η αποσύνθεση του HMF και η παραγωγή ανεπιθύμητων οργανικών οξέων όπως το φορμικό οξύ
- ρυθμίζουν την οξύτητα της επιφάνειας που πραγματοποιείται η αντίδραση βελτιώνοντας έτσι την επιλεκτικότητα του HMF, που χρειάζεται στη μετατροπή της βιομάζας



Εικόνα 13-Σχηματική απεικόνιση όλων των σταδίων μετατροπής της λιγνινοκυτταρινούχου βιομάζας σε φουράνια

Η παραγόμενη υδροξυμεθυλφουρφουράλη (5-HMF) μπορεί να οξειδωθεί σε 2,5-FDCA φουρανδικαρβοξυλικό οξύ, που τα τελευταία χρόνια έχει αποκτήσει μεγάλη αναγνωρισιμότητα καθώς η δομή του στο τερεφθαλικό οξύ δείχνει πως θα μπορούσε να χρησιμοποιηθεί ως δομικό στοιχείο για την σύνθεση πολυμερών όπως το φουρανοϊκό πολυαιθυλένιο (PEF), που θεωρείται η πράσινη εναλλακτική στο PET, που γίνεται από την πετροχημική βιομηχανία (Sousa et al. 2015; Werpy and Petersen 2004). Οι εφαρμογές του όμως δεν σταματούν εκεί, μπορεί να χρησιμοποιηθεί και για την παραγωγή πολυαμίνων και πολυουρεθανών (Moreau, Belgacem, and Gandini 2004). Στόχος για τα επόμενα χρόνια είναι η οξείδωση του HMF σε FDCA να σταματήσει να πραγματοποιείται με χημικές μεθόδους, διότι απαιτούν οργανικούς διαλύτες, και υψηλές πιέσεις και θερμοκρασίες, με αποτέλεσμα η διεργασία να μην

είναι φιλική προς το περιβάλλον και να απαιτεί υψηλές τιμές ενέργειας για να διεκπεραιωθεί (Gorbanev et al. 2009). Αντ' αυτού επιδιώκεται η βιομετατροπή του HMF σε FDCA με την χρήση ενζύμων, μετατρέποντας την διεργασία σε φιλική προς το περιβάλλον καθώς θα διεξάγεται σε χαμηλές πιέσεις με ήπιες θερμοκρασίες ενώ τα τοξικά απόβλητα θα μειωθούν σε μεγάλο βαθμό (Thomas, DiCosimo, and Nagarajan 2002).



Εικόνα 14-Σχηματική απεικόνιση της μετατροπής σακχάρων σε FDCA

Κεφάλαιο 3: Ξυλοολιγοσακχαρίτες στη βιομηχανία των τροφίμων

Στη σημερινή εποχή όλο και αυξάνεται η ευαισθητοποίηση του καταναλωτή για μια υγιεινή διατροφή, με τους περισσότερους να προτιμούν τρόφιμα με πρόσθετα χαρακτηριστικά μαζί με τις συνήθεις θρεπτικές ιδιότητες. Αυτά τα τρόφιμα περιέχουν κάποια βιοδραστικά μόρια με τα πιο δημοφιλή να είναι τα πρεβιοτικά χάρη στις ευεργετικές τους ιδιότητες στον ανθρώπινο οργανισμό.

3.1 Πρεβιοτικά

Με τον όρο πρεβιοτικά αναφέρονται συστατικά τροφίμων που δεν πέπτονται από τον ανθρώπινο οργανισμό και έχουν οφέλη για τον ξενιστή βοηθώντας επιλεκτικά την ανάπτυξη και την δράση ορισμένων βακτηρίων του εντέρου. Σύμφωνα με τον Food and Agricultural Organization (FAO), το πρεβιοτικό θα πρέπει να πληρεί τρία κριτήρια (Samanta et al. 2015):

1. Να είναι χημική ουσία και όχι μικροοργανισμός ή φάρμακο
2. Τα οφέλη που έχει για την υγεία του ανθρώπου να είναι μετρήσιμα και όχι λόγω της απορρόφησης του συστατικού στο αίμα ή της δράσης της ουσίας από μόνη της
3. Να προκαλούν αλλαγές στη σύνθεση και στη δράση των μικροοργανισμών του ξενιστή

Με το πέρασμα των χρόνων ένα πρεβιοτικό δε φτάνει να πληρεί τα κριτήρια του FAO αλλά για να θεωρείται ιδανικό θα πρέπει :

- Να μπορεί να ζυμώνεται επιλεκτικά από την ωφέλιμη μικροχλωρίδα του εντέρου
- Να ρυθμίζει την ομοιόσταση της εντερικής μικροχλωρίδας αυξάνοντας έτσι τον πληθυσμό ή τις μεταβολικές δραστηριότητες
- Να διασφαλίζει την υγεία του ξενιστή
- Να προέρχεται από φυτά ή να συντίθενται από μικροοργανισμούς ή τα ένζυμά τους
- Να διατηρεί τη δομή του καθώς διέρχεται στο έντερο
- Να μην μένουν υπολείμματα
- Ιδανικά να βρίσκει εφαρμογή ως τρόφιμο ή πρόσθετο τροφίμου
- Να είναι συμβατό με άλλα τρόφιμα ή συστατικά τροφίμων

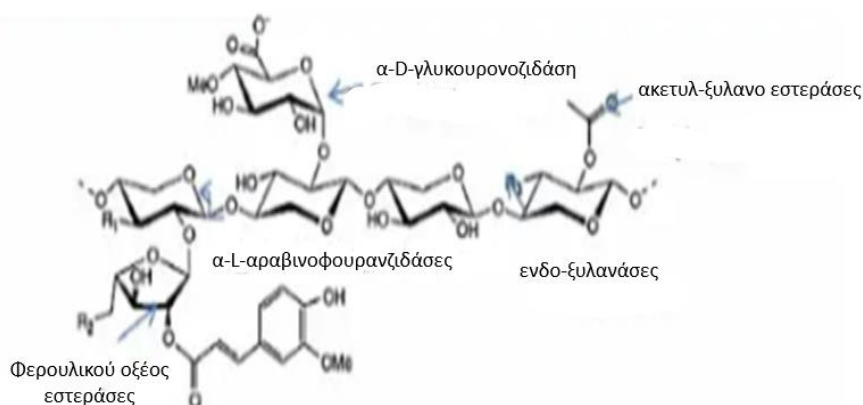
Τα πιο γνωστά πρεβιοτικά είναι οι φρουκτοολιγοσακχαρίτες, γαλακτοολιγοσακχαρίτες ενώ οι ισομαλτοολιγοσακχαρίτες (ΙΜΟ) και οι ξυλοολιγοσακχαρίτες (ΧΟΣ) είναι ανερχόμενα πρεβιοτικά που μπορούν να λειτουργήσουν αποτελεσματικά στη βιομηχανία των τροφίμων. Μεταξύ αυτών, οι ξυλοολιγοσακχαρίτες αποτελούν μια πολλά υποσχόμενη πρόταση χάρη στην

προέλευσή τους από αγροτικά υπολείμματα, που είναι οικονομικά, ανανεώσιμα αλλά και άφθονα.

3.2 Ξυλοολιγοσακχαρίτες

Οι ξυλοολιγοσακχαρίτες είναι προϊόντα υδρόλυσης της ξυλάνης που συναντώνται στην πλειοψηφία της λιγνινοκυτταρινούχου βιομάζας σε διαφορετικά ποσοστά. Η ξυλάνη είναι ένας πολυσακχαρίτης που βρίσκεται σε ποσοστό 25-35% στη ξηρή βιομάζα και η δομή του εξαρτάται από την προέλευσή του. Η πλειοψηφία έχει ως κύριο συστατικό την ξυλόζη ενωμένη με β-1,4 γλυκοζιδικό δεσμό και υποκατεστημένη με αραβινόζη, γλυκουρονικό οξύ και ομάδες μεθυλίου και ακετυλίου. Ο μοριακός τύπος των ξυλοολιγοσακχαριτών είναι $C_{5n}H_{8n+2}O_{4n+1}$ με το n να παίρνει τιμές από 2 έως 6 (Samanta et al. 2015). Στη φύση συναντώνται στο μέλι, στο γάλα, στα φρούτα, λαχανικά και στο μπαμπού. Πρόκειται για ολιγομερή της ξυλόζης ενωμένα με β-1,4 γλυκοζιδικό δεσμό. Τέτοιοι είναι η ξυλόζη, ξυλοβιόζη (δύο μονομερή της ξυλόζης), η, ξυλοτριόζη (τρία μονομερή της ξυλόζης) κ.ο.κ (V. Kumar and Satyanarayana 2011). Ανάλογα το υλικό προέλευσης τους, υπάρχουν και οι υποκατεστημένοι ξυλοολιγοσακχαρίτες που περιέχουν όπως φαίνεται και από την ονομασία τους διάφορους υποκαταστάτες όπως είναι το acetyl, 4-O methyl derivative και αραβινοfuranosyl (Aachary and Prapulla 2008).

Χάρη την αντοχή που εμφανίζουν στη θερμοκρασία και την ικανότητα τους να παραμένουν σταθερά σε όξινο περιβάλλον έχουν ευρεία εφαρμογή στη βιομηχανία των τροφίμων. Όταν πρόκειται για τρόφιμο, οι ξυλοολιγοσακχαρίτες που χρησιμοποιούνται προτιμάται να έχουν βαθμό πολυμερισμού 2-4 καθώς είναι σταθεροί σε ένα μεγάλο εύρος τιμών pH (2.5-8.0) αλλά και στο χαμηλό pH του γαστρικού συστήματος και σε θερμοκρασίες μέχρι και 100°C (Singh, Banerjee, and Arora 2015).



Εικόνα 15-Απεικόνιση της δομής του μορίου της ξυλάνης

3.3 Οφέλη ξυλοολιγοσακχαριτών

Καθώς πρόκειται για συστατικό τροφίμου, οι ξυλοολιγοσακχαρίτες είναι μη καρκινογενείς, βοηθούν την βακτηριακή ανάπτυξη και ζύμωση και βελτιώνουν την απορρόφηση των μετάλλων στο έντερο. Έχουν αντιοξειδωτικές, αντιαλλεργικές και αντιμικροβιακές ιδιότητες, μπορούν να έχουν επίδραση στο αίμα και στο δέρμα, ενώ έχουν επιλεκτική κυτταροτοξική δραστηριότητα. Επιπλέον, τονώνουν την ανάπτυξη και την δράση συγκεκριμένων βακτηρίων που σχετίζονται με την υγεία, τις εντερικές μολύνσεις και την καταπολέμηση του καρκίνου του παχέος εντέρου. Τα οφέλη των ξυλοολιγοσακχαριτών πρώτη φορά ανακαλύφθηκαν το 1991, όταν η αντικατάστασή τους έναντι του αμύλου ή της ζάχαρης βελτίωσε τα συμπτώματα του διαβήτη και κατά συνέπεια άρχισε να χρησιμοποιείται ως υποκατάστατο της ζάχαρης για τους διαβητικούς (Imaizumi et al. 1991). Οι θετικές επιδράσεις τους έχουν συνδεθεί με την βελτιστοποίηση της λειτουργίας του παχέος εντέρου αλλά και του μεταβολισμού.

Οφέλη ξυλοολιγοσακχαριτών στο μεταβολισμό

Μέσω της ικανότητάς τους να ελέγχουν την απώλεια βάρους, την ομοίωση της γλυκόζης και των λιπιδίων και την ευαισθησία της ινσουλίνης, οι ξυλοολιγοσακχαρίτες έχουν σημαντικό ρόλο στη διαχείριση του μεταβολισμού. Σε μελέτες που έγιναν βρέθηκε ότι ο ανθρώπινος οργανισμός μετά από 8 εβδομάδες πρόσληψης ξυλοολιγοσακχαριτών, εμφάνιζε βελτίωση στη γλυκόζη και τα λιπίδια του αίματος. Ακόμη, παρατηρήθηκε αύξηση στο επίπεδο των αντιοξειδωτικών ενζύμων. Επιπλέον, έχει βρεθεί ότι η τόνωση που προκαλούν οι ολιγοσακχαρίτες στα μπιφιδοβακτήρια καταστέλλει την ζύμωση των πρωτεϊνών του εντέρου, μειώνοντας τα επίπεδα τοξικότητας και πιο συγκεκριμένα των αμινών, της αμμωνίας και των φαινόλων, αλλά μειώνοντας και την πιθανότητα εμφάνισης ασθενειών στο έντερο.

Αντιοξειδωτική δράση ξυλοολιγοσακχαριτών

Η αντιοξειδωτική δράση τους οφείλεται στην παρουσία οξέων, όπως το φερουλικό οξύ, ενωμένα με εστερικούς δεσμούς στο μόριο της ξυλάνης. Αυτό επιβεβαιώθηκε και μέσα από μια μελέτη που διεξήχθη σε ποντικούς που λάμβαναν ξυλοολιγοσακχαρίτες που έχουν ως υποκατάστατα το φερουλικό οξύ. Στο συγκεκριμένο πείραμα παρατηρήθηκε η αντιοξειδωτική τους δράση σε συνδυασμό με μειωμένη γλυκόζη στο αίμα, χοληστερόλη και επίπεδα κρεατίνινης σε ποντικούς που είχε προκληθεί διαβήτης. Ακόμη έχει βρεθεί ότι η προέλευση των ξυλοολιγοσακχαριτών επηρεάζει την αντιοξειδωτική τους δράση (Singh, Banerjee, and Arora 2015).

Επίδραση ξυλοολιγοσακχαριτών στο ανοσοποιητικό σύστημα

Το αυξανόμενο ενδιαφέρον για την ενδυνάμωση του ανοσοποιητικού συστήματος ιδιαίτερα στις πρώιμες ηλικίες και στους ηλικιωμένους έχει οδηγήσει στην χορήγηση πρεβιοτικών. Το γαστρεντερικό σύστημα υπόκειται σε ποικίλα ερεθίσματα από αντιγόνα που προέρχονται από φαγητό ή μικροοργανισμούς. Συνεπώς, θα πρέπει να μπορεί να αμυνθεί σε τυχόν παθογένειες και αυτό επιτυγχάνεται με τη χρήση

πρεβιοτικών μέσω της άμεσης επαφής με τα βακτήρια του λακτικού οξέος και τα μπιφιδοβακτήρια. Επιπλέον, αναστέλλουν την παραγωγή φλεγμονώδων ουσιών στους μακροφάγους αποδεικνύοντας την αντιφλεγμονώδη δράση τους ενώ ομοίως έχει παρατηρηθεί να βελτιώνουν τη μικροχλωρίδα του εντέρου και να ρυθμίζουν την λειτουργία του ανοσοποιητικού συστήματος στους υγιείς ενήλικες, φανερώντας την ανοσοποιητική δράση τους.

Συμπερασματικά, κατέχοντας όλες τις παραπάνω ιδιότητες, οι ξυλοολιγοσακχαρίτες μπορούν να συμπεριληφθούν σε πολλά τρόφιμα με στόχο την σωστή λειτουργία και υγεία του εντέρου. (Samanta et al. 2015).

ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ

Κεφάλαιο 4: Υλικά και Μέθοδοι

4.1 Υλικά

4.1.1 Ένζυμα

Cellic CTec2

Για τα πειράματα της ενζυμικής υδρόλυσης χρησιμοποιήθηκε το ένζυμο Cellic CTec2 από την Novozymes (Δανία) που περιέχει κυτταρινάσες από το μικροοργανισμό *Trichoderma reesei* και ημικυτταρινάσες που βοηθούν στην υδρόλυση της κυτταρίνης. Οι βέλτιστες συνθήκες θερμοκρασίας για το ένζυμο είναι 45–50 °C και pH 5.0–5.5 ενώ θα πρέπει να φυλάσσεται σε χαμηλές θερμοκρασίες ώστε να διατηρήσει την ενεργότητά του. Εμφανίζει υψηλά ποσοστά μετατροπής και έχει αποδεχθεί αποτελεσματικό και σε μεγάλες συγκεντρώσεις στερεών. Η ενεργότητα του βρέθηκε 168,18 FPU/mL και το περιεχόμενο σε πρωτεΐνη 137 mg/mL με τη μέθοδο Bradford.

Sweetzyme

Για την ισομερείωση της γλυκόζης σε φρουκτόζη χρησιμοποιήθηκε το ακινητοποιημένο ένζυμο sweetzyme από την Novozymes (Δανία) που παράγεται από από ένα στέλεχος του *Streptomyces murinus*. Πρόκειται για μια ακινητοποιημένη ισομεράση της γλυκόζης (D-ξυλόζη ketoI-ισομεράση) που καταλύει την μετατροπή της D-γλυκόζης σε D-φρουκτόζη. Ανάλογα τις συνθήκες αποθήκευσής του η μέση διάρκεια ζωής του είναι 200-360 ημέρες. Βέλτιστες συνθήκες pH του ενζύμου είναι 7-7,8 και θερμοκρασίας 50°C ενώ θα πρέπει να φυλάσσεται σε χαμηλές θερμοκρασίες προκειμένου να διατηρήσει την ενεργότητά του.

4.1.2 Θρεπτικά υλικά

Για την ανάπτυξη του μικροοργανισμού τα θρεπτικά μέσα που χρησιμοποιήθηκαν αποστειρώθηκαν σε αυτόκλειστο στους 120 °C για 20 min και η γλυκόζη που χρησιμοποιήθηκε ως τροφή για τον μικροοργανισμό αποστειρώθηκε σε ξεχωριστό μπουκάλι σε στερεή μορφή ώστε να μην καραμελώσει. Η σύσταση των θρεπτικών μέσων παρατίθεται στον Πίνακα 2.

4.1.3 Ρυθμιστικά διαλύματα

Το ρυθμιστικό διάλυμα που χρησιμοποιήθηκε για τις υδρολύσεις της βιομάζας στην παρούσα εργασία ήταν διάλυμα κιτρικών-φωσφορικών pH=5 που προέκυψε από την ανάμιξη των εξής διαλυμάτων:

- 2,1 g κιτρικού οξέος διαλυμένο σε 100mL απιονισμένου νερού
- 2,82 g Na₂HPO₄ διαλυμένο σε 100mL απιονισμένου νερού

Πίνακας 2-Σύσταση θρεπτικών μέσων

Θρεπτικό μέσο	Σύσταση
BMGY	<ul style="list-style-type: none"> • 1% w/v εκχύλισμα ζύμης • 2% w/v πεπτόνη • 100mM ρυθμιστικό διάλυμα φωσφορικό κάλιο pH = 6 • 1,34% w/v διάλυμα YNB (3,4g YNB και 10g θειϊκό αμμώνιο ανά 100mL διαλύματος YNB) • $4 \cdot 10^{-5}$ w/v βιοτίνη • 1% w/v γλυκερόλη
BMMY	<ul style="list-style-type: none"> • 1% w/v εκχύλισμα ζύμης • 2% w/v πεπτόνη • 100mM ρυθμιστικό διάλυμα φωσφορικό κάλιο pH = 6 • 1,34% w/v διάλυμα YNB (3,4g YNB και 10g θειϊκό αμμώνιο ανά 100mL διαλύματος YNB) • $4 \cdot 10^{-5}$ w/v βιοτίνη • 0,5% w/v μεθανόλη

4.1.4 Μικροοργανισμοί

Pichia pastoris

Η μεθυλότροφη ζύμη *P. pastoris* αποτελεί έναν καθιερωμένο ξενιστή έκφρασης πρωτεϊνών κυρίως για ευκαρυωτικούς οργανισμούς καθώς παρουσιάζει πολλά από τα πλεονεκτήματα των ανώτερων ευκαρυωτικών συστημάτων έκφρασης. Πιο συγκεκριμένα οι μετα-μεταφραστικές τροποποιήσεις όπως η επεξεργασία πρωτεϊνών, η αναδίπλωση του πρωτεϊνικού μορίου και η έκκριση. Χάρη στην ευκολία που παρουσιάζει στην χρήση του, τις φθηνές απαιτήσεις ανάπτυξής του, την ικανότητα να παράγει υψηλές πυκνότητες κυττάρων (έως 100g/L) και τα υψηλά επίπεδα έκφρασης που εμφανίζει, η ζύμη *P. pastoris* αποτελεί πια ένα πολύ χρήσιμο σύστημα έκφρασης πρωτεϊνών. Τα τελευταία χρόνια η χρήση αυτού του μικροοργανισμού έχει αυξηθεί και λόγω της ικανότητας του να αναπτύσσεται σε μεθανόλη ως ενεργειακή πηγή άνθρακα, καθώς η μεθανόλη είναι επαγωγέας για τον υποκινητή αλκοολική οξειδάση 1 (AOX 1) που συνήθως χρησιμοποιείται για να ελέγξει την έκφραση της πρωτεΐνης στόχου (Balamurugan, Reddy, and Suryanarayana 2007, Schuler L. Michael, 1992).

4.1.5 Στήλες χρωματογραφίας

Για τον ποιοτικό προσδιορισμό της φρουκτόζης χρησιμοποιήθηκε η μέθοδος χρωματογραφίας εναλλαγής ανιόντων υψηλής απόδοσης IC (Ion Chromatography) με τη στήλη Dionex™ CarboPac™ PA1 της Thermo Fischer Scientific.

4.1.6 Συσκευές και όργανα

Τα όργανα και οι συσκευές που χρησιμοποιήθηκαν στο εργαστήριο παρατίθενται στον Πίνακα 4

Πίνακας 3-Συσκευές και όργανα μέτρησης

Επωαστήρες	<ol style="list-style-type: none">1. Θερμαινόμενος επωαστήρας με ανάδευση Thermomixer Comfort (Eppendorf, Γερμανία)2. Επωαστήρας ZHWY-211C (Zhicheng, Κίνα)3. Επωαστήρας Orbital Incubator S150 (Stuart Scientific, Μ.Βρετανία)
Φωτόμετρα	<ol style="list-style-type: none">1. Φωτόμετρο UV-VIS S-22 Spectrophotometer (Boeco, Γερμανία)2. Φωτόμετρο Microplate reader (Spectramax 250, Molecular devices)
Φυγόκεντροι	<ol style="list-style-type: none">1. Φυγόκεντρος Beckman Coulter (Η.Π.Α)2. Μικροφυγόκεντρος πάγκου Eppendorf 3200 (Γερμανία)
Συσκευές	<ol style="list-style-type: none">1. Συσκευή διήθησης υπό κενό2. Συσκευή υπερδιήθησης Amicon Stirred Cell Model 8400 (Millipore, Η.Π.Α)3. Συσκευή εξάχνωσης υπό κενό (freeze drying) ChristALPHA 1-4, B. BraunBiotec. International, Melsugen (Γερμανία)4. Συσκευή μέτρησης pHWTW 537, WTW (Γερμανία)5. Σύστημα παραγωγής υπερκάθαρου νερού Direct-Q (Mereck Millipore, Η.Π.Α)6. Συσκευή χώνευσης με μικροκύματα (Speedwave™ MWS-2, Berghof Instruments GmbH, Γερμανία)
Ζυγοί	<ol style="list-style-type: none">1. Ηλεκτρονικοί ζυγοί ακριβείας (Bell Engineering, Ιταλία/ KernABS, Γερμανία)
Ξηραντήρας	<ol style="list-style-type: none">1. Ξηραντήρας WTEbinder 7200 Tutteigen (Γερμανία)
Πυριαντήριο	<ol style="list-style-type: none">1. Φούρνος-πυριαντήριο Muffle Furnace, Size 1, (Gallenkamp, Γερμανία)
Χρωματογράφος	<ol style="list-style-type: none">1. Σύστημα χρωματογραφίας υψηλής απόδοσης (HPAEC) Dionex CarboPac PA1 (), ηλεκτροχημικό ανιχνευτή ED40 (Dionex, Sunnyvale, CA, Η.Π.Α).

4.1.7 Χημικά αντιδραστήρια

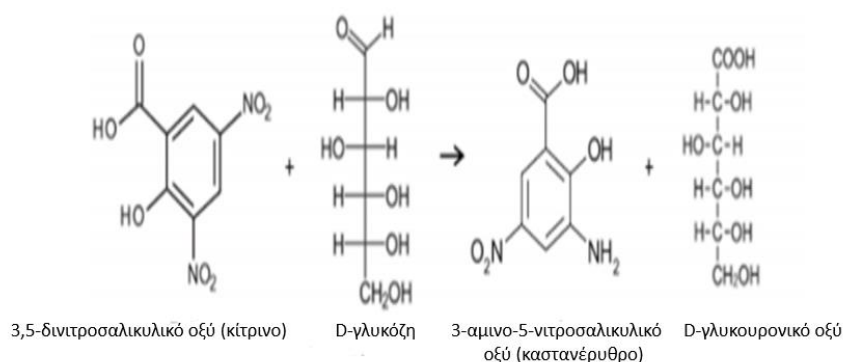
Τα χημικά αντιδραστήρια και τα αναλώσιμα υλικά που χρησιμοποιήθηκαν, προμηθεύτηκαν από τις εταιρείες Sigma-Aldrich (Η.Π.Α), Panreac (Ιταλία), Applichem (Γερμανία), LAB-SCAN (Ιρλανδία) και Fischer Scientific (Η.Π.Α) και η καθαρότητά τους ήταν αναλυτικού βαθμού.

Τα πλαστικά και γυάλινα εργαστηριακά είδη που χρησιμοποιήθηκαν ήταν των εταιρειών Greiner-BioOne (Γερμανία) , Eppendorf (Γερμανία) , Whatman (Ηνωμένο Βασίλειο), Millipore (Η.Π.Α) , Sterilin Limited (Ηνωμένο Βασίλειο) , SIMAX (Τσεχία) , SCHOTTAG (Γερμανία) , BOMEX (Κίνα) και ISOLAB (Γερμανία).

4.2 Μέθοδοι

4.2.1 Μέτρηση αναγωγικών σακχάρων (DNS)

Για την μέτρηση της συγκέντρωσης των αναγωγικών σακχάρων χρησιμοποιήθηκε η μέθοδος 3,5-δινιτροσαλικυλικού οξέος (DNS). Πρόκειται για μια χρωματομετρική μέθοδο που βασίζεται στην αντίδραση οξειδοαναγωγής ανάμεσα στο 3,5-δινιτροσαλικυλικό οξύ και τα αναγωγικά σάκχαρα που υπάρχουν στο δείγμα. Η καρβονυλική ομάδα που έχουν τα αναγωγικά σάκχαρα, τους προσδίδει την ιδιότητα να λειτουργούν ως αναγωγικά μέσα. Πιο συγκεκριμένα, η καρβονυλική ομάδα παρουσίας ήπιων οξειδωτικών μέσων, όπως το DNS, οξειδώνεται σε καρβοξυλική ομάδα, ενώ το DNS που σε αυτή τη μορφή είναι κίτρινο ανάγεται σε 3-αμινο-5-νιτροσαλικυλικό οξύ χρώματος καστανέρυθρου. Η χρωματική αυτή αλλαγή που παρατηρείται, από κίτρινο σε καστανέρυθρο, αποτελεί μια πρώτη ένδειξη ότι το δείγμα περιέχει αναγωγικά σάκχαρα και η ένταση του χρώματος είναι ανάλογη της συγκέντρωσης αυτών. Για την ποσοτικοποίηση της οπτικής αλλαγής που παρατηρείται, το δείγμα οδηγείται σε φωτόμετρο και μετράται η απορρόφηση του στα 540nm (μήκος κύματος μέγιστης απορρόφησης του 3-αμινο-5-νιτροσαλικυλικού οξέος). Έχοντας δημιουργήσει μια καμπύλη αναφοράς με αναγωγικά σάκχαρα γνωστής συγκέντρωσης γίνεται ο προσδιορισμός της συγκέντρωσης τους στο εκάστοτε δείγμα.



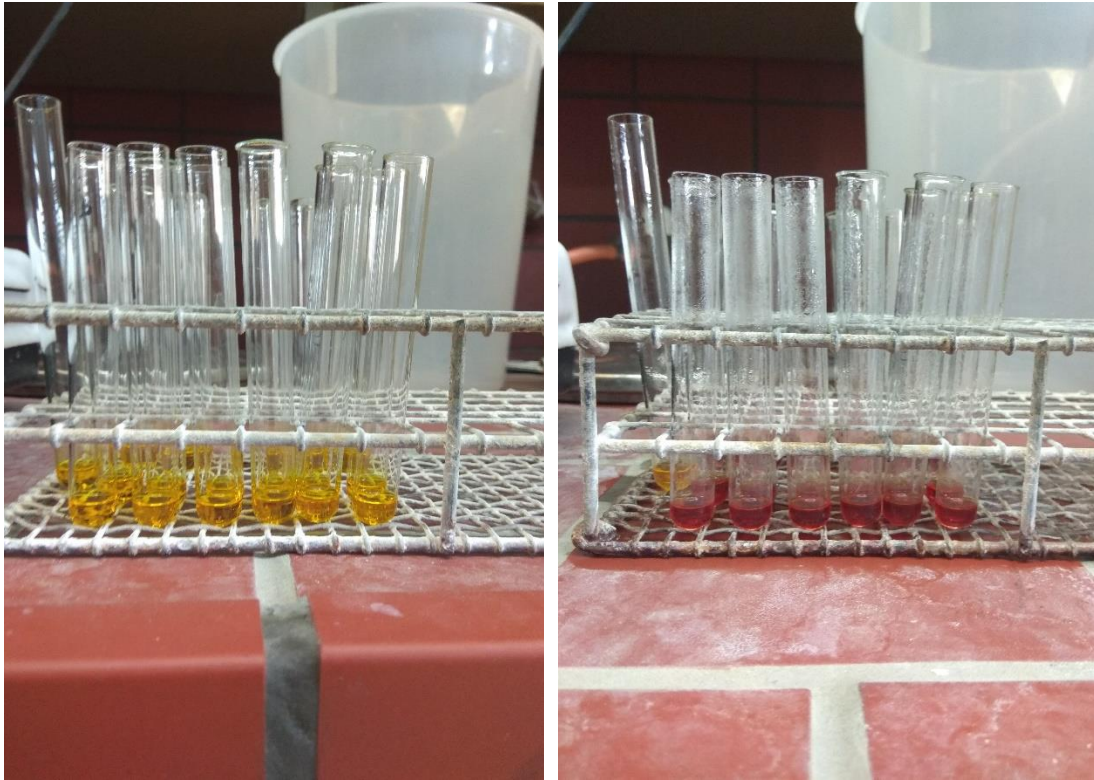
Εικόνα 16- Η αντίδραση οξειδοαναγωγής που πραγματοποιείται ανάμεσα στα αναγωγικά σάκχαρα και το αντιδραστήριο DNS (Garriga, Almaraz, and Marchiaro 2017)

Το χημικό αντιδραστήριο αυτής της μεθόδου αποτελείται από το 3,5-δινιτροσαλικυλικό οξύ που δρα ως οξειδωτικό μέσο, τρυγικό νάτριο-κάλιο/sodium-potassium tartrate (Rochelle salt) ώστε να μην διαλύεται το περιεχόμενο οξυγόνο και υδροξείδιο του νατρίου (NaOH). Για την παρασκευή του αντιδραστηρίου στο εργαστήριο παρασκευάστηκαν δύο διαλύματα. Στην αρχή παρασκευάστηκε ένα διάλυμα καυστικού νατρίου (NaOH) συγκέντρωσης 2M, διαλύοντας 8g στερεού NaOH σε 100mL απιονισμένο νερό και προστέθηκαν σε αυτό 5g DNS (Διάλυμα 1). Σε ένα άλλο δοχείο προστέθηκαν 150g sodium-potassium tartrate σε 250mL απιονισμένο νερό (Διάλυμα 2). Αφού έχουν παρασκευαστεί και τα δύο διαλύματα, το Διάλυμα 2 προστίθεται αργά στο Διάλυμα 1 υπό ομαλή ανάδευση και θέρμανση μέχρι πλήρους διάλυσης των στερεών. Προστίθεται απιονισμένο νερό μέχρι τελικό όγκο 500mL και το τελικό διάλυμα όντας φωτοευαίσθητο αποθηκεύεται σε σκουρόχρωμο δοχείο μακριά από το φως (Garriga, Almaraz, and Marchiaro 2017).



Εικόνα 17- Παρασκευή του αντιδραστηρίου της μεθόδου DNS. Το κόκκινο διάλυμα είναι το Διάλυμα 1 και η λευκή σκόνη το αντιδραστήριο sodium-potassium tartrate (Rochelle salts)

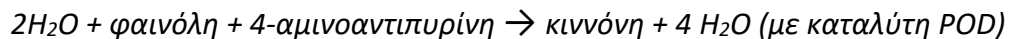
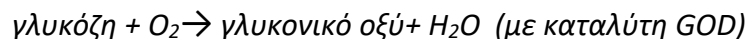
Σύμφωνα με το πρωτόκολλο της μεθόδου για τον προσδιορισμό της συγκέντρωσης των ολικών αναγωγικών σακχάρων σε ένα δείγμα, προστέθηκαν 250μL DNS σε 250μL δείγματος και αφήθηκαν για βρασμό για 5min. Μετά το πέρας του βρασμού, το διάλυμα που προκύπτει αραιώθηκε με 2mL απιονισμένου νερού και φωτομετρήθηκε στα 540nm. Η συγκέντρωση των ολικών αναγωγικών σακχάρων προσδιορίστηκε με την χρήση καμπύλης αναφοράς της μεθόδου DNS με δείγμα αναφοράς διαφορετικές συγκεντρώσεις γλυκόζης (0,2-1 g/L με βήμα 0,2). Για περισσότερη αξιοπιστία των αποτελεσμάτων, για κάθε δείγμα έγινε διπλή μέτρηση και κατάλληλη αραιώση ώστε οι μετρήσεις να βρίσκονται εντός του εύρους.



Εικόνα 18-Δείγματα πριν τον βρασμό (αριστερά), Δείγματα μετά τον βρασμό (δεξιά)

4.2.3 Μέτρηση γλυκόζης (Glucotest)

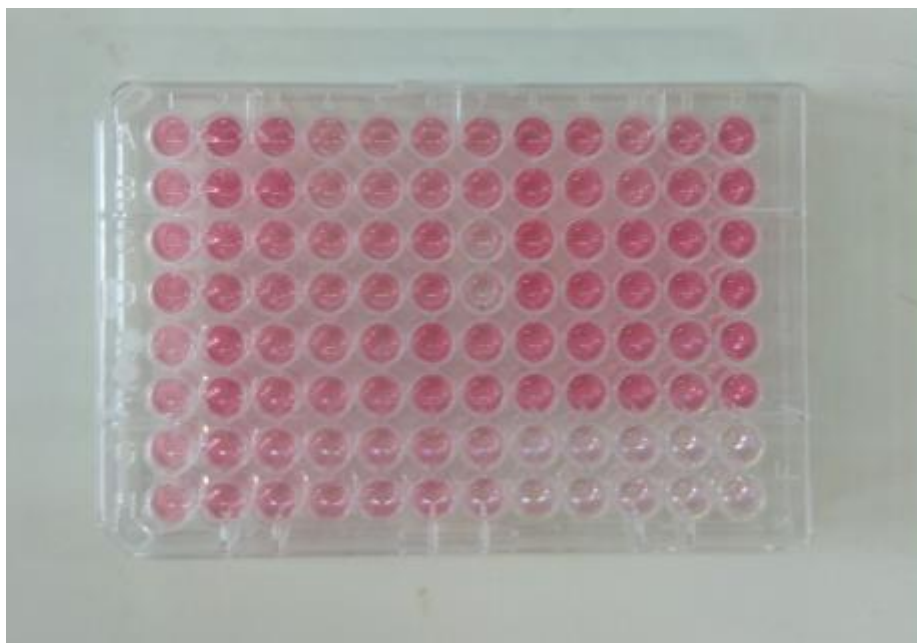
Η μέτρηση της συγκέντρωσης της γλυκόζης στα δείγματα έγινε με την χρήση του ενζυμικού εμπορικού σκευάσματος GOD/PAP (glucose oxidase/peroxidase assay). Κατά την εισαγωγή του σε δείγμα που περιέχει γλυκόζη λαμβάνουν χώρα οι δύο παρακάτω διαδοχικές αντιδράσεις:



Στην πρώτη αντίδραση, η γλυκόζη παρουσίας του ενζύμου GOD (οξειδάση της γλυκόζης) οξειδώνεται σε γλυκονικό οξύ και παράγεται υπεροξείδιο του υδρογόνου (H_2O_2). Στο επόμενο στάδιο, το υπεροξείδιο του υδρογόνου μαζί με φαινόλη και 4-αμινοαντιπυρίνη αντιδρούν παρουσία του ενζύμου POD (υπεροξειδάση της γλυκόζης) και παράγεται νερό και μία κιννόνη ερυθρού χρώματος

Ακολουθώντας το πρωτόκολλο για την μέθοδο Glucotest, 10 μL του δείγματος προς μέτρηση τοποθετούνται στις θέσεις της πλακέτας ELISA Microplate μαζί με 240 μL του ενζύμου GOD/PAP. Η πλακέτα τοποθετείται στο θάλαμο του φωτόμετρου Microplate reader θερμοκρασίας 37°C για 15 min και η απορρόφηση μετράται στα 510 nm όταν έχει επιτευχθεί η ισορροπία της αντίδρασης (endpoint).

Για την μέτρηση της περιεχόμενης στα δείγματα γλυκόζης κατασκευάζεται μια καμπύλη αναφοράς με διαλύματα γλυκόζης γνωστής συγκέντρωσης. Κάθε δείγμα έχει αραιωθεί προκειμένου η μέτρηση να είναι στην γραμμική περιοχή και λαμβάνονται δύο μετρήσεις για το κάθε δείγμα για περισσότερη ακρίβεια.



Εικόνα 19-Πλακέτα ELISA Microplate φορτωμένη με τα δείγματα

4.2.4 Υπολογισμός συγκέντρωσης πρωτεϊνών με την μέθοδο Bradford

Η χρήση αυτής της μεθόδου πραγματοποιήθηκε για τον προσδιορισμό της συγκέντρωσης των πρωτεϊνών της ξυλανάσης που παράχθηκε. Πρόκειται για μια φωτομετρική μέθοδο καθώς βασίζεται στην αλλαγή χρώματος της βαφής Coomassie Brilliant Blue G-250. Σε ελεύθερη μορφή έχει χρώμα κόκκινο το οποίο μετατρέπεται σε μπλε με την ύπαρξη πρωτεϊνών στο διάλυμα που προσδένονται στη βαφή. Η πρόσδεση των πρωτεϊνών στη βαφή διαρκεί περίπου 2 min και παραμένει για περίπου 1 h.

Σαν μέθοδος μπορεί να θεωρηθεί ποιοτική για την ανίχνευση των πρωτεϊνών από την αλλαγή χρώματος (οπτικό ερέθισμα) αλλά και ποσοτική καθώς με φωτομέτρηση στα 595 nm γίνεται ακριβής προσδιορισμός της συγκέντρωσης των πρωτεϊνών.

Στη παρούσα διπλωματική, η μέθοδος εφαρμόστηκε για τον υπολογισμό της συγκέντρωσης του εμπορικού ενζυμικού σκευάσματος Cellic CTec2 που χρησιμοποιήθηκε για τα πειράματα της υδρόλυσης. Σύμφωνα με το πρωτόκολλο, έπειτα από κατάλληλη αραιώση του δείγματος προς μέτρηση, 25 μ l από το δείγμα

προστέθηκαν σε 1000 μL διαλύματος Bradford και έπειτα από έντονη ανάδευση ακολούθησε φωτομέτρηση στα 595 nm. Ο ακριβής προσδιορισμός της συγκέντρωσης των πρωτεϊνών του διαλύματος έγινε με καμπύλη αναφοράς. (Emami Bistgani et al. 2017)

4.2.5 Παραγωγή ξυλανάσης GH-11 από *Fusarium oxysporum* (FoXyn)

Η παραγωγή του ενζύμου ξυλανάση της οικογένειας GH-11 από τον μικροοργανισμό *F. oxysporum* πραγματοποιήθηκε με ετερόλογη έκφραση του γονιδίου σε κύτταρα *P. pastoris*.

Προκαλλιέργειες κυττάρων *P. Pastoris*

Αφού κατασκευαστεί το θρεπτικό υλικό που αποτελείται από γλυκόζη, άγαρ, πεπτόνη και yeast extract εισάγονται τα τρία τελευταία σε ένα μπουκάλι αποστείρωσης και η γλυκόζη σε ένα άλλο και εισέρχονται στον θάλαμο για αποστείρωση διάρκειας 20 min στους 120 °C. Μετά το πέρας της αποστείρωσης εισέρχονται όλα τα υλικά στο μπουκάλι της γλυκόζης και μεταφέρονται σε τρυβλία Petri όπου αφήνονται μέχρι να πήξει το θρεπτικό υλικό.

Στη συνέχεια γίνεται εμβολιασμός των τρυβλίων με το μετασχηματισμένο στέλεχος της *P. pastoris* και επώασή τους στους 30 °C για 24 h. Μετά το πέρας της επώασης, οι σχηματιζόμενες αποικίες χρησιμοποιούνται για εμβολιασμό του θρεπτικού υλικού BMGY ποσότητας 300 mL μοιρασμένο σε τέσσερις κωνικές φιάλες των 250 mL. Οι κωνικές επωάζονται για 16-20 h στους 30°C και ακολουθεί φωτομέτρηση στα 600 nm της προκαλλιέργειας ώστε να προσδιορισθεί η οπτική της πυκνότητα.

Για τον προσδιορισμό της οπτικής πυκνότητας λαμβάνονται 100 μL από κάθε κωνική φιάλη και έπειτα από αραιώση 1:40 εισάγονται στο φωτόμετρο. Στόχος είναι η οπτική πυκνότητα ($O.D_{600nm}$) στις κύριες καλλιέργειες να είναι 1. Συνεπώς με βάση τις μετρήσεις του φωτόμετρου υπολογίζεται ο απαιτούμενος όγκος που πρέπει να ληφθεί από κάθε φιάλη.

Πίνακας 4-Απορρόφηση, οπτική πυκνότητα και απαιτούμενος όγκος προκειμένου να ισχύει στις κύριες καλλιέργειες $O.D_{600nm}$

Κωνική φιάλη	$O.D_{600nm}$	V (mL)
1	0.641	19.50
2	0.646	19.35
3	0.659	18.97
4	0.577	21.66

Κύριες καλλιέργειες κυττάρων *P. pastoris*

Ο εκάστοτε όγκος που απομονώθηκε από κάθε φιάλη φυγοκεντρήθηκε προκειμένου να συλλεχθούν τα κύτταρα και να επαναιωρηθούν σε θρεπτικού υλικό BMMY ποσότητας 1 L ισομοιρασμένου σε 4 κωνικές φιάλες του 1 L. Η ανάγκη του μικροοργανισμού να αναπτυχθεί σε περιβάλλον με συνθήκες καλού αερισμού οδήγησε στη χρήση μεγάλης χωρητικότητας κωνικών φιαλών που είχαν ως πώμα βαμβάκι.

Οι κωνικές φιάλες επώαστηκαν στους 30°C για 5 d σε ανάδευση 200 rpm με καθημερινή προσθήκη διαλύματος μεθανόλης 5% v/v καθώς η ζύμη *P. pastoris* είναι μεθυλότροφη. Μετά το πέρας των 5 ημερών, το υγρό της καλλιέργειας φυγοκεντρήθηκε με ανάδευση 5000 rpm και συλλέχθηκε το υπερκείμενο υγρό.

Ακολούθησε διήθηση υπό κενό του υπερκείμενου υγρού με διηθητικό χαρτί Whatman και φίλτρα διαμέτρου 0,8 και 0,2 μm ώστε να απομακρυνθούν τυχόν κυτταρικά θραύσματα.

Στη συνέχεια, για να συλλεχθούν οι πρωτεΐνες το διάλυμα συμπυκνώνεται σε συσκευή υπερδιήθησης. Τα μόρια με διάμετρο μεγαλύτερης των πόρων της μεμβράνης συγκρατούνται σε αυτή ενώ τα μικρότερα μόρια διαπερνούν την μεμβράνη μαζί με το υγρό διάλυμα. Συνεπώς, στο εσωτερικό της μεμβράνης παρέμεινε το συμπυκνωμένο διάλυμα των πρωτεϊνών με μοριακό βάρος άνω των 10 kDa και αποθηκεύτηκε στην κατάψυξη για μετέπειτα χρήση.

4.2.6 Υδρόλυση βιομάζας

Στόχος της ενζυμικής υδρόλυσης, όπως έχει προαναφερθεί στο θεωρητικό υπόβαθρο της μεθόδου, είναι η διάσπαση της κυτταρίνης και ημικυτταρίνης προς παραγωγή των μονομερών τους. Γι αυτό και το ένζυμο που χρησιμοποιήθηκε περιείχε κυτταρινάσες και ημικυτταρινάσες ώστε να διασπαστεί η εκάστοτε αλυσίδα και να συλλεχθούν τα παραγόμενα μονομερή τους για περαιτέρω επεξεργασία. Στη παρούσα διπλωματική το ενδιαφερόμενο μονομερές ήταν η γλυκόζη που παράγεται από την διάσπαση της αλυσίδας της κυτταρίνης και ο στόχος ήταν η μετατροπή της σε φρουκτόζη.

Τα πειράματα που έλαβαν χώρα ήταν αρχικά σε καθαρή κυτταρίνη (AVICEL) για διαφορετικές συγκεντρώσεις στερεών και συγκεντρώσεις ενζύμου με στόχο να βρεθούν οι βέλτιστες ποσότητες για την μέγιστη παραγωγή σακχάρων που δε θα είναι και οικονομικά ασύμφορη. Ακολούθησαν ενζυμικές υδρολύσεις σε προκατεργασμένα υλικά διαφορετικής περιεκτικότητας σε κυτταρίνη με στόχο να βρεθεί το βέλτιστο υλικό, αλλά και σε στέλεχος αραβοσίτου που είχε υποστεί πρώτα προκατεργασία με οργανικό διαλύτη στο εργαστήριο. Ακόμη, έλαβε χώρα ενζυμική υδρόλυση σε στέλεχος αραβοσίτου που είχε υποστεί πρώτα επεξεργασία με την ξυλανάση που παρήχθη στο εργαστήριο από την ετερόλογη έκφραση της ζύμης *P. pastoris* όπως αναλύθηκε παραπάνω. Τέλος, διεξήχθη μια ενζυμική υδρόλυση μεγάλης κλίμακας με στόχο την μελέτη...



Εικόνα 20-Επωαστήρας που διεξάχθηκε το πείραμα της υδρόλυσης

4.2.6.1 Υδρόλυση σε διαφορετικές συγκεντρώσεις ενζύμου (enzyme loading)

Η μελέτη για την παραγωγή σακχάρων σε διαφορετικές συγκεντρώσεις ενζύμου Cellic CTec2 πραγματοποιήθηκε σε δείγμα καθαρής κυτταρίνης (AVICEL). Διατηρείται σταθερή η συγκέντρωση στερεών και ίση με 10% όπου για τον επιθυμητό τελικό όγκο του πειράματος (10 mL) είναι 1 g. Το βέλτιστο pH για την λειτουργία του ενζύμου είναι 5 εξ' ού και η χρήση ρυθμιστικού διαλύματος κιτρικών-φωσφορικών που παρασκευάστηκε στο εργαστήριο στο οποίο προστέθηκε αζίδιο του νατρίου (sodium azide) συγκέντρωσης 0.02-0.03 % w/v για πρόληψη τυχόν μολύνσεων. Αυτή η ουσία είναι τοξική για τους μικροοργανισμούς με αποτέλεσμα να αποτρέπει την ανάπτυξή τους σε περίπτωση μόλυνσης του διαλύματος.

Σε κωνικές φιάλες των 50 mL προστέθηκε 1 g ξηρής βιομάζας και κατάλληλη ποσότητα ενζύμου και ρυθμιστικού διαλύματος για την επίτευξη της επιθυμητής συγκέντρωσης ενζύμου. Η συγκέντρωση του είναι υπολογισμένη στον όγκο του ρυθμιστικού διαλύματος (9 mL) και η μελέτη έγινε για συγκεντρώσεις ενζύμου 5, 10, 15, 20, 25, 30 mg/mL.

Τα δείγματα επάζονται στους 50 °C για 72 h σε ανάδευση 180 rpm και πραγματοποιείται δειγματοληψία ποσότητας 300 μL στις 2, 4, 6, 8, 24, 48 και 72 h. Το εκάστοτε δείγμα φυγοκεντρείται λόγω της μη διαλυτοποιημένης βιομάζας ώστε να συλλεχθεί το υπερκείμενο υγρό με τα επιθυμητά σάκχαρα, στην προκειμένη

περίπτωση την γλυκόζη. Έπειτα από κατάλληλη αραίωση, ώστε οι απορροφήσεις να είναι στη γραμμική περιοχή της καμπύλης αναφοράς, γίνεται μέτρηση της γλυκόζης με τη μέθοδο glucotest και για κάθε δείγμα οι μετρήσεις γίνονται εις διπλούν για να αποφευχθούν τυχόν σφάλματα.

4.2.6.2 Υδρόλυση σε διαφορετικές συγκεντρώσεις στερεών (solids loading)

Η μελέτη για την παραγωγή σακχάρων σε διαφορετικές συγκεντρώσεις στερεών πραγματοποιήθηκε σε δείγμα καθαρής κυτταρίνης (AVICEL). Η ενζυμική υδρόλυση πραγματοποιήθηκε σε ίδιες συνθήκες θερμοκρασίας, pH και ανάδευσης για την βέλτιστη συγκέντρωση ενζύμου που βρέθηκε από την παραπάνω σειρά πειραμάτων. Στον παρακάτω πίνακα παρατίθενται οι ποσότητες βιομάζας και ρυθμιστικού διαλύματος (buffer) που χρειάστηκαν.

Πίνακας 5- Ποσότητες βιομάζας, ενζύμου και ρυθμιστικού διαλύματος για τη σειρά πειραμάτων συγκέντρωσης στερεών (solids loading)

Συγκέντρωση βιομάζας	Ποσότητα βιομάζας (g)	Ποσότητα ρυθμιστικού διαλύματος (mL)
6%	0.6	9.4
8%	0.8	9.2
10%	1.0	9.0
12%	1.2	8.8
14%	1.4	8.6
16%	1.6	8.4

4.2.6.3 Υδρόλυση δειγμάτων λιγνινοκυτταρινούχου βιομάζας

Η ενζυμική υδρόλυση έλαβε χώρα στις ίδιες συνθήκες με τις δύο παραπάνω σειρές πειραμάτων για βέλτιστες συγκεντρώσεις ενζύμου και στερεών όπως βρέθηκαν από την αξιολόγηση των παραπάνω πειραμάτων. Έτσι, πραγματοποιήθηκε για 1g βιομάζας και συγκέντρωση ενζύμου 15 mg/mL. Σε αντίθεση με τα δύο προηγούμενα πειράματα, η ενζυμική υδρόλυση δεν έγινε σε δείγματα καθαρής κυτταρίνης με αποτέλεσμα όχι μόνο την παραγωγή γλυκόζης αλλά και άλλων αναγωγικών σακχάρων. Κατά συνέπεια, πέρα από την μέθοδο glucotest για την μέτρηση της γλυκόζης, πραγματοποιήθηκε και μέτρηση των ολικών σακχάρων με την μέθοδο DNS.

4.2.6.4 Υδρόλυση βιομάζας επεξεργασμένης με ξυλανάση

Σε πρώτο στάδιο το στέλεχος αραβοσίτου αντιδρά με το ένζυμο της ξυλανάσης που παρήχθη στο εργαστήριο από την ετερόλογη έκφραση της *P. pastoris* όπως προαναφέρθηκε.

Η αντίδραση έλαβε χώρα σε μία κωνική των 250 mL και περιείχε 5 g βιομάζας, 5 mL ξυλανάσης και 90 mL από το ρυθμιστικό διάλυμα κιτρικών-φωσφορικών pH=5. Η επώαση διήρκησε 24 h στους 50 °C και με ανάδευση 180 rpm και ακολούθησε διήθηση υπό κενό ώστε να γίνει διαχωρισμός των δύο φάσεων. Το στερεό υλικό οδηγήθηκε για ξήρανση στους 60 °C για 3 d ενώ το διήθημα αποθηκεύτηκε στην κατάψυξη. Το υλικό ζυγίστηκε πριν και μετά την ξήρανση για να υπολογισθεί η ξηρή μάζα του και ακολούθησε ενζυμική υδρόλυσή του στις ίδιες συνθήκες με τα προηγούμενα πειράματα.

4.2.6.5 Υδρόλυση βιομάζας προκατεργασμένης με οργανικό διαλύτη

Τα πειράματα της ενζυμικής υδρόλυσης διεξήχθησαν στις ίδιες συνθήκες με τα παραπάνω. Το στέλεχος αραβοσίτου σε αυτή την περίπτωση είχε υποστεί πρώτα υδροθερμική προκατεργασία με οργανικό διαλύτη, πιο συγκεκριμένα οξικό οξύ (CH_3COOH) που θα αναλυθεί παρακάτω, και ακολούθησε η ενζυμική υδρόλυση του. Σκοπός αυτής της σειράς πειραμάτων ήταν η μελέτη του στέλεχος αραβοσίτου υπό διαφορετικές περιπτώσεις. Τα δείγματα προς σύγκριση ήταν ακατέργαστο στέλεχος αραβοσίτου, στέλεχος αραβοσίτου που έχει υποστεί υδροθερμική προκατεργασία με οξικό οξύ και στέλεχος αραβοσίτου που είχε επεξεργαστεί με την παραγόμενη στο εργαστήριο ξυλανάση.

4.2.6.6 Υδρόλυση βιομάζας σε αναμεικτήρα ελεύθερης πτώσης (free-fall mixer)

Η συγκεκριμένη υδρόλυση πραγματοποιήθηκε σε υψηλή αρχική συγκέντρωση στερεού με τη χρήση αναμεικτήρα ελεύθερης πτώσης (free-fall mixer). Οι συνθήκες διεξαγωγής του πειράματος διέφεραν με τις προηγούμενες υδρολύσεις. Η συγκέντρωση των στερεών ήταν 20%, το διάλυμα ένζυμο-ρυθμιστικό διάλυμα κιτρικών-φωσφορικών pH=5.0 είχε συγκέντρωση ενζύμου 9 mg/g_{DM} ενώ η θερμοκρασία διεξαγωγής της υδρόλυσης παρέμεινε στους 50°C.

Ο αναμεικτήρας ελεύθερης πτώσης, που παρουσιάζεται στην Εικόνα 18, αποτελείται από δύο κυκλικούς θαλάμους κάθετα τοποθετημένους μέσα στους οποίους εισάγεται το υλικό προς υδρόλυση. Η ανάδευση του υλικού γίνεται με από την περιστρεφόμενη προπέλα που υπάρχει στο εσωτερικό του θαλάμου και η φορά της

περιστροφής κάθε 2 min αλλάζει από δεξιόστροφα σε αριστερόστροφα. Η θερμοκρασία του θαλάμου ρυθμίζεται στην επιθυμητή από έναν θερμαντικό μανδύα λαδιού που υπάρχει δίπλα από τους θαλάμους και ελέγχεται με τη βοήθεια θερμομέτρου. Η υδρόλυση διήρκησε 12 h και πραγματοποιήθηκε στο υλικό No.25 που θεωρήθηκε το καλύτερο από τα παραπάνω.

Πιο συγκεκριμένα, ζυγίσθηκαν 150 g του υλικού No.25 και μαζί με 650 mL διαλύματος ένζυμο-ρυθμιστικό διάλυμα εισάχθηκαν στο θάλαμο. Δειγματοληψίες έγιναν στους χρόνους 1.5, 3, 6 και 12 h. Μέχρι και τις 6 h το υλικό δεν είχε την αναμενόμενη παραγωγή γλυκόζης, γι' αυτό προστέθηκε επιπλέον ποσότητα από το ένζυμο προκειμένου να φτάσει σε συγκέντρωση 18 mg/g_{DM}. Συνεπώς, τις πρώτες 6 h η υδρόλυση διεξάχθηκε με συγκέντρωση ενζύμου Cellic CTec2 9 mg/g_{DM}, ενώ μέχρι και τις 12 h που τερματίστηκε η υδρόλυση με συγκέντρωση ενζύμου Cellic CTec2 18 mg/g_{DM}.



Εικόνα 21-Πρόσοψη(α) και κάτοψη του αναμεικτήρα ελεύθερης πτώσης (β) και το εσωτερικό του θαλάμου με την περιστρεφόμενη προπέλα

4.2.6.7 Υδρόλυση βιομάζας με μεταβαλλόμενη τροφοδοσία

Σε αυτό τον κύκλο υδρολύσεων μελετήθηκε η επιρροή της συγκέντρωσης των στερεών στην παραγωγή της γλυκόζης χωρίς να παραμένει σταθερή η τροφοδοσία. Στις παραπάνω υδρολύσεις η ποσότητα των στερεών δεν μεταβαλλόταν κατά την διάρκεια της υδρόλυσης ενώ σε αυτή την περίπτωση σε κάθε δειγματοληψία γινόταν επιπλέον προσθήκη υλικού. Οι δειγματοληψίες έγιναν για τους χρόνους 8, 24,48 και

72 h. Σε 3 κωνικές φιάλες των 50 mL προστέθηκαν 18% w/w, 20% w/w και 22% w/w στερεά ενώ σε 3 άλλες κωνικές προστέθηκαν 6% w/w στην καθεμία που σταδιακά έφτασαν τις 3 παραπάνω συγκεντρώσεις στερεών αντίστοιχα. Κάθε 2 h στις 3 κωνικές φιάλες με αρχική συγκέντρωση 6% w/w γινόταν προσθήκη 0.30, 0.35 και 0.40 g αντίστοιχα ώστε φτάσουν στην επιθυμητή τελική συγκέντρωση στερεών.

Ο λόγος που δεν έγινε δειγματοληψία στις 2, 4 και 6 h όπως και στις προηγούμενες υδρολύσεις είναι η μεγάλη συγκέντρωση στερεών. Ο όγκος της αντίδρασης ήταν 10 mL άρα πέρα από τις 3 κωνικές που ξεκίνησαν με 6% w/w, δηλαδή 0,6 g υλικού, οι άλλες 3 είχαν 1.8, 2.0 και 2.2 g σε 8.2, 8 και 7.8 mL ενζυμικού διαλύματος αντίστοιχα. Όπως γίνεται αντιληπτό, τις 6 πρώτες ώρες το υλικό δεν έχει διαβραχεί σε μεγάλο βαθμό και δεν υπάρχει «ζουμί» για να γίνει η δειγματοληψία.

4.2.7 Υδροθερμική προκατεργασία βιομάζας με καταλύτη οξικό οξύ

Το ακατέργαστο στέλεχος αραβοσίτου που υπήρχε στο εργαστήριο υπέστη σε υδροθερμική προκατεργασία με καταλύτη οξικό οξύ (CH_3COOH) 0.3% v/v. Παρασκευάστηκε διάλυμα $\text{H}_2\text{O}-\text{CH}_3\text{COOH}$ όγκου 300 mL (διαλύτης). Η όλη διεργασία διεξήχθη σε σύστημα χώνευσης με μικροκύματα (Speedwave™ MWS-2, Berghof Instruments GmbH, Γερμανία). Η συσκευή χώνευσης, όπως φαίνεται στην Εικόνα 19, αποτελείται από 10 δοχεία (viral) για την προκατεργασία των δειγμάτων. Έτσι καθένα από τα viral περιείχε 3 g στέλεχος αραβοσίτου και 27 mL από τον διαλύτη. Για ταχύτερη διαβροχή της βιομάζας από τον διαλύτη πριν την εισαγωγή στη συσκευή χώνευσης το μείγμα αναδευόταν.

Από τη χρονική στιγμή που η θερμοκρασία φτάνει τους 230 °C τα δοχεία παραμένουν για 15 min στη συσκευή χώνευσης και έπειτα τα δοχεία ψύχονται σε λεκάνη με νερό χαμηλής θερμοκρασίας για 45 min. Η άνοδος της θερμοκρασίας στην επιθυμητή τιμή (230 °C) διαρκεί 5-7 min και δεν προσμετράτε στον χρόνο που απαιτεί η μέθοδος της υδροθερμικής προκατεργασίας.



Εικόνα 22-(α) Συσκευή χώνευσης με μικροκύματα, (β) δοχεία για την προκατεργασία των δειγμάτων

Ακολουθεί διήθηση υπό κενό για διαχωρισμό του στερεού από το υγρό κλάσμα, το οποίο είναι εμπλουτισμένο σε ημικυτταρίνη αφού η υδροθερμική προκατεργασία έχει ως στόχο την απομάκρυνση της ημικυτταρίνης από την βιομάζα. Το διήθημα αποθηκεύεται σε συνθήκες χαμηλής θερμοκρασίας και το στερεό υπόλειμμα ξεπλένεται με H_2O όγκου περίπου mL. Η πλύση γίνεται για την εξισορρόπηση του pH στην τιμή 7 και την απομάκρυνση τυχόν παρεμποδιστών στην μετέπειτα ενζυμική υδρόλυση, που θα έχουν προκύψει από τον όξινο διαλύτη της προκατεργασίας (CH_3COOH). Το στερεό υπόλειμμα οδηγείται για ξήρανση στους $60^\circ C$ για 24 h και στη συνέχεια ακολούθησε η ενζυμική υδρόλυσή του.



Εικόνα 23-Το στερεό υπόλειμμα της υδροθερμικής προκατεργασίας έπειτα από ξήρανση στους $60^\circ C$

4.2.8 Ισομερείωση γλυκόζης προς φρουκτόζη

Μετά το πέρας της ενζυμικής υδρόλυσης όλων των προαναφερθέντων πειραμάτων πραγματοποιήθηκε ισομερείωσή τους με στόχο την μετατροπή της παραγόμενης γλυκόζης σε φρουκτόζη.

Σε πρώτο στάδιο συλλέχθηκε το προϊόν της υδρόλυσης μετά τις 72 h και φυγοκεντρήθηκε με υψηλές στροφές για 7 min και συλλέχθηκε το υπερκείμενο υγρό σε falcon των 15 mL. Αφού μετρήθηκε η περιεχόμενη γλυκόζη στα δείγματα των 72 h με τη μέθοδο glucotest που αναλύθηκε νωρίτερα, υπολογίσθηκε η ποσότητα γλυκόζης στον όγκο του εκάστοτε υπερκείμενου. Έπειτα, έγινε προσθήκη τετραβορικού νατρίου ($Na_2B_4O_7 \cdot 10H_2O$) για μετατόπιση της αντίδρασης της

ισομερείωσης προς την κατεύθυνση της φρουκτόζης. Σε κάθε δείγμα προστέθηκε η μισή ποσότητα από την περιεχόμενη γλυκόζη και επειδή τα πειράματα της ισομερείωσης απαιτούν pH=7, έγινε εξισορρόπηση του pH των διαλυμάτων ώστε να φτάσει στο επιθυμητό, με προσθήκη διαλύματος καυστικού νατρίου (NaOH) 1 M.

Για την ισομερείωση της γλυκόζης σε φρουκτόζη είναι απαραίτητη η χρήση του ακινητοποιημένου ενζύμου sweetzyme (ισομεράση της γλυκόζης). Το ένζυμο βρίσκεται σε στερεή μορφή και φυλάσσεται σε χαμηλές θερμοκρασίες. Σε Eppendorf των 2 mL εισάγονται 50 mg ακινητοποιημένου ενζύμου sweetzyme και 1 mL από τα δείγματα βιομάζας που υπέστησαν ενζυμική υδρόλυση και επωάζονται για 24 h στους 50 °C σε 900 rpm.

Μετά το πέρας της επώασης, τα δείγματα φυγοκεντρήθηκαν και συλλέχθηκε το υπερκείμενο υγρό με τα παραγόμενα αναγωγικά σάκχαρα. Έπειτα από κατάλληλες αραιώσεις ώστε τα δείγματα να είναι στο εύρος της γραμμικότητας της καμπύλης αναφοράς της εκάστοτε μεθόδου (DNS/Glucotest), πραγματοποιήθηκε μέτρηση των ολικών αναγωγικών σακχάρων και της γλυκόζης. Η διαφορά της συγκέντρωσης της γλυκόζης στα δείγματα πριν και μετά την ισομερείωση αποτελεί την παραγόμενη φρουκτόζη.



Εικόνα 24-Η συσκευή που διεξάχθηκε το πείραμα της ισομερείωσης

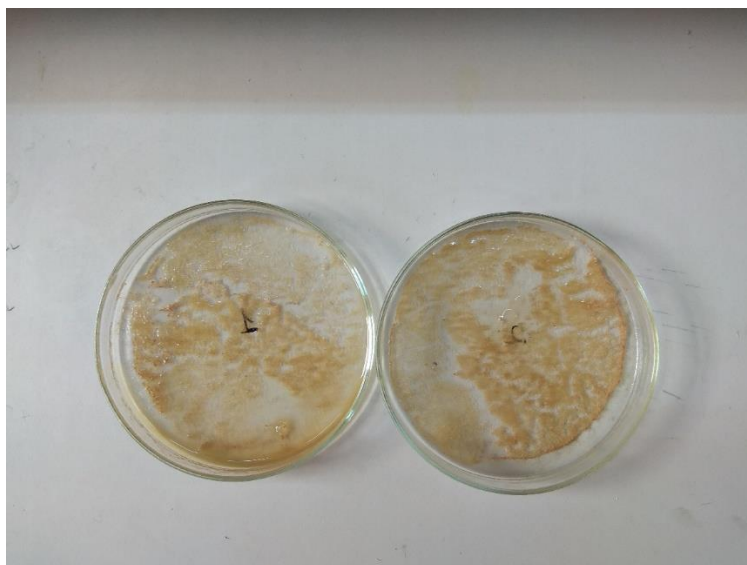
4.2.9 Προσδιορισμός ουσιών με χρωματογραφία εναλλαγής ανιόντων υψηλής απόδοσης (HPAEC)

Η χρωματογραφία εναλλαγής ανιόντων υψηλής απόδοσης (HPAEC) βασίζεται στην έλξη ανάμεσα σε αντίθετα φορτισμένα σωματίδια με τον διαχωρισμό να λαμβάνει χώρα σε στήλη με θετικά φορτισμένες ομάδες που θα έλξουν τα αρνητικά φορτισμένα ιόντα. Οι ενώσεις που είναι θετικά φορτισμένες εκκλύονται πρώτες ενώ οι ενώσεις που συγκρατούνται στη στήλη εκκλύονται στη συνέχεια με διαλύματα υψηλής συγκέντρωσης άλατος. Με αυτό τον τρόπο είναι εφικτή η ταυτοποίηση των ουσιών με βάση το χρόνο κατακράτησης που προκύπτει από τη χρωματογραφία.



Εικόνα 25-Σύστημα χρωματογραφίας εναλλαγής ανιόντων

Πριν γίνει ο προσδιορισμός των ουσιών με την μέθοδο της χρωματογραφίας προηγείται εξάχνωση των δειγμάτων, τα οποία φυλάσσονται στην κατάψυξη. Αφήνονται να ξεπαγώσουν, εισάγονται σε τρυβλία Petri και τοποθετούνται στη συσκευή εξάχνωσης όπου αφήνονται για 2 d στους $-40\text{ }^{\circ}\text{C}$ υπό κενό μέχρι να έχει απομακρυνθεί όλο το περιεχόμενο νερό. Στη συνέχεια, προστίθεται ελάχιστη ποσότητα νερού για να επαναδιαλυτοποιηθεί το δείγμα και με αυτό τον τρόπο το δείγμα προς μέτρηση έχει συμπυκνωθεί.



Εικόνα 26-Τα δείγματα μετά το πέρας της εξάχνωσης

4.2.9.1 Προσδιορισμός της παραγόμενης φρουκτόζης από την ισομερείωση των υδρολυμένων υλικών

Για τον προσδιορισμό της φρουκτόζης εισάγονται 20 μL κατάλληλα αραιωμένου δείγματος στη διάταξη της χρωματογραφίας εναλλαγής ανιόντων. Η στήλη της διάταξης είναι CarboPac PA1 (4x250 nm) με ανιχνευτή ED40 (Dionex, Sunnyvale, CA, Η.Π.Α). Η κινητή φάση της στήλης αποτελείται από καυστικό νάτριο (NaOH) 0,1 M και 0,5 M NaOAc - 0,1 M NaOH ροής 1 mL/min.

4.2.9.2 Προσδιορισμός των παραγόμενων ξυλοολιγοσακχαριτών

Μετά το πέρας της αντίδρασης του στέλεχος αραβοσίτου με την ξυλανάση FoXyn, το διάλυμα οδηγήθηκε για διήθηση υπό κενό και το υγρό που συλλέχθηκε, που ήταν εμπλουτισμένο ολιγοσακχαρίτες, αποθηκεύτηκε στην κατάψυξη.

Για τον ποιοτικό προσδιορισμό τους χρησιμοποιήθηκε η χρωματογραφία εναλλαγής ανιόντων (HPAEC) και εισάχθηκε ποσότητα 10 μL από το κάθε δείγμα που είχε πρώτα αραιωθεί αρκετά ώστε να είναι συγκρίσιμο με το πρότυπο διάλυμα. Το πρότυπο διάλυμα ήταν μίγμα ενώσεων : ξυλόζη, ξυλοβιόζη, ξυλοτριόζη, ξυλοτετραόζη, ξυλοπενταόζη και ξυλοεξαόζη.

4.2.10 Ηλεκτροφόρηση πήγματος πολυακρυλαμιδίου παρουσία δωδεκυλοθειικού νατρίου (SDS-PAGE)

Η ηλεκτροφόρηση πήγματος πολυακρυλαμιδίου παρουσία δωδεκυλοθειικού νατρίου ή αλλιώς SDS-PAGE (sodium dodecyl sulphate-polyacrylamide gel electrophoresis) είναι μια μέθοδος διαχωρισμού πρωτεϊνών με βάση το μέγεθος τους. Γενικά οι πρωτεΐνες διαφέρουν ως προς το μέγεθος, το σχήμα και το φορτίο τους. Σε μια απλή ηλεκτροφόρηση, δεν είναι εφικτό να καθοριστεί αν ο λόγος που μια πρωτεΐνη έχει κινηθεί γρηγορότερα από τις άλλες είναι επειδή φέρει μεγαλύτερο φορτίο ή έχει μικρότερο μέγεθος ή πιο συμπαγή δομή.

Με την ηλεκτροφόρηση SDS-PAGE διαχωρίζονται πρωτεΐνες μεγέθους 5-500 kDa ανάλογα με το μέγεθος των πόρων. Το μέγεθος των πόρων του πλέγματος εξαρτάται από την συγκέντρωση του ακρυλαμιδίου. Πιο συγκεκριμένα, αν είναι επιθυμητός ο διαχωρισμός μορίων μεγάλου μοριακού βάρους, θα πρέπει να δημιουργηθεί γέλη με μεγαλύτερους πόρους και αυτό επιτυγχάνεται για μικρές συγκεντρώσεις ακρυλαμιδίου. Αντίθετα, για συγκεντρώσεις ακρυλαμιδίου άνω των 12%, δημιουργείται γέλη με μικρότερους πόρους, άρα είναι πιο σκληρή και εύθραυστη, και χρησιμοποιείται για τον διαχωρισμό μορίων μικρού μοριακού βάρους.

Σε πρώτο στάδιο δημιουργείται το πήγμα πολυακρυλαμιδίου, το οποίο είναι μια χημικά αδρανής διάφανη ένωση που παραμένει σταθερή σε μεγάλο εύρος

θερμοκρασίας, pH και ιοντικής ισχύος και παρέχει ευελιξία στο μέγεθος των πόρων, όπως προαναφέρθηκε. Ο πολυμερισμός του μονομερούς ακρυλαμιδίου σε αλυσίδες πολυακρυλαμιδίου είναι αυτός που δημιουργεί το πήγμα και επάγεται από τις ελεύθερες ρίζες που εμφανίζονται στο διάλυμα από την χημική ένωση υπεροξοδιθειικό διαμμώνιο (APS, ammonium persulfate), παρουσία του αντιδραστηρίου τετραμεθυλεθυλενοδιαμίνη (TEMED, tetramethylethylenediamine).

Το δωδεκυλοθειικό νάτριο, SDS, ($\text{CH}_3(\text{CH}_2)_{11}\text{SO}_4\text{Na}$), έπειτα από θέρμανση, εξουδετέρωνει μέσα στο πήγμα τους δευτερεύοντες δεσμούς και συνδέεται με τα πολυπεπτίδια αποδιατάσσοντας έτσι τα μόρια των πρωτεϊνών σε αναλογία 1.4 $\text{g}_{\text{SDS}}/\text{g}_{\text{πρωτεΐνης}}$. Το αρνητικό φορτίο του SDS είναι αρκετά ισχυρό εξουδετερώνοντας έτσι το φορτίο του πολυπεπτιδίου, με αποτέλεσμα η κίνηση των πολυπεπτιδίων στη γέλη να είναι συνάρτηση του βάρους τους και να γίνεται από την κάθοδο (-) προς την άνοδο (+). Συνεπώς όπως γίνεται αντιληπτό, με την χρήση αυτή της μεθόδου γίνεται προσδιορισμός του μοριακού βάρους των πρωτεϊνών.

Για την εκτέλεση της μεθόδου χρησιμοποιούνται τρία διαφορετικά ρυθμιστικά διαλύματα: το ρυθμιστικό διάλυμα της ηλεκτροφόρησης (running buffer), το ρυθμιστικό διάλυμα του πηκτώματος επιστοίβαξης (stacking gel) και το ρυθμιστικό διάλυμα του πηκτώματος διαχωρισμού (resolving gel). Επιπλέον, κατά την φόρτωση των δειγμάτων στη γέλη, πέρα από τα δείγματα προς μέτρηση, φορτώνεται και ένα δείγμα αναφοράς (marker), το οποίο φυλάσσεται στην κατάψυξη και περιέχει μπάντες για διαφορετικά μοριακά βάρη.

Αφού στηθεί με επιτυχία η διάταξη και ελεγχθεί αν υπάρχουν τυχόν διαρροές με προσθήκη νερού, γεμίζεται το εσωτερικό της διάταξης με το running buffer και το resolving gel αλλά και το εξωτερικό της μέρος με το running buffer (υπερχείλιση). Η όλη διάταξη αφήνεται να πήξει για 15-20 min και προστίθεται το stacking gel. Τα δύο διαλύματα resolving και stacking gel έχουν ετοιμαστεί από πριν αλλά στο stacking gel δεν έχει γίνει προσθήκη του TEMED και 10% APS γιατί θα έπηζε πριν εισαχθεί στη διάταξη. Έτσι, μόλις ετοιμαστεί πλήρως το stacking gel προστίθεται στην διάταξη και αφήνεται να πήξει.

Στο ενδιάμεσο γίνεται προετοιμασία των δειγμάτων προς φόρτωση. Λαμβάνεται όγκος 16 μL από το κάθε δείγμα και μαζί με 4 μL loading buffer (χρωστική ουσία κυανού χρώματος) οδηγούνται για βρασμό για 5 min. Ακολουθεί φόρτωση των δειγμάτων, σύνδεση των ηλεκτροδίων και αφήνεται να γίνει η ηλεκτροφόρηση που διαρκεί περίπου 3 h. Μετά το πέρας της ηλεκτροφόρησης, λαμβάνεται το resolving gel με τις πρωτεΐνες και αφού ξεπλυθεί με νερό βάφεται με το διάλυμα staining solution χρώματος σκούρο μπλε και αφήνεται για 15 min. Έπειτα, το διάλυμα staining solution αντικαθίσταται από το distaining solution και αφήνεται όλη τη νύχτα για να εμφανισθούν οι μπάντες των πρωτεϊνών.

Πίνακας 6-Σύσταση πηγματος διαχωρισμού και επισοίβαξης για ηλεκτρόφορηση SDS-PAGE (οι όγκοι είναι σε mL)

Συστατικά	Πήγμα διαχωρισμού	Πήγμα επισοίβαξης
<i>dH₂O</i>	1.75	1.50
0.75 M Tris/SDS 0.2% (pH=8.8)	4.70	-
0.25 M Tris/SDS 0.2% (pH=6.8)	-	1.90
40% bis-acrylamide	2.90	0.38
TEMED	0.015	0.010
10% APS	0.045	0.030

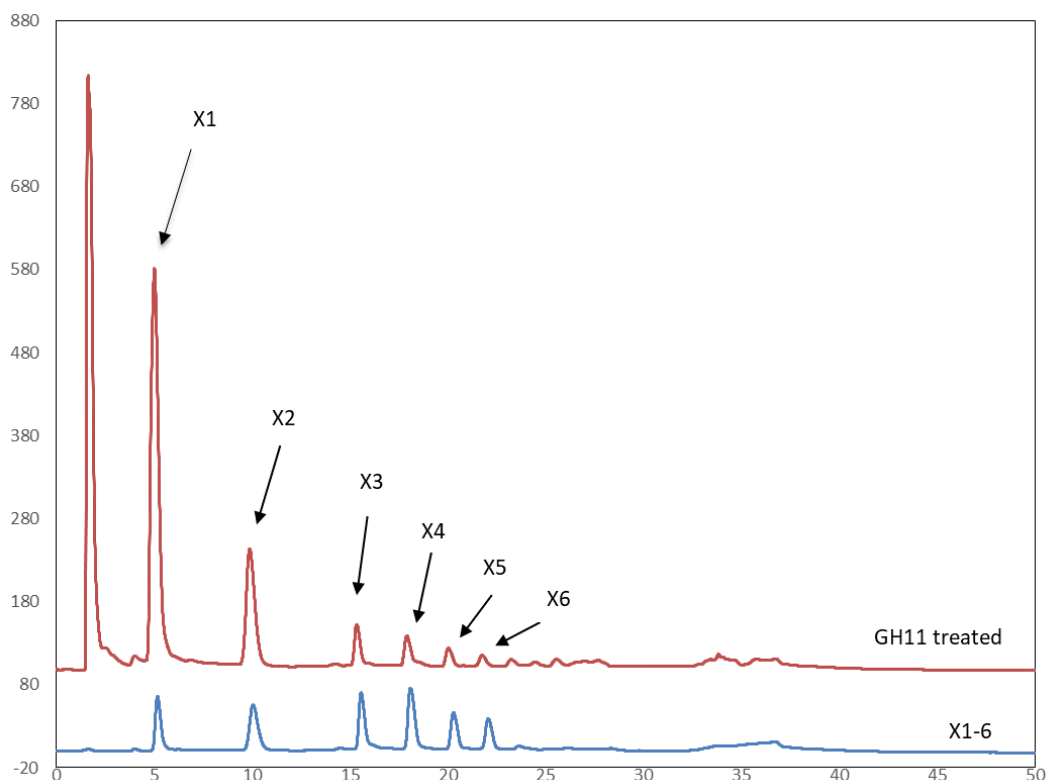
ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

Κεφάλαιο 5: Προσδιορισμός της παραγόμενης πρωτεΐνης και των ξυλοολιγοκχαριτών

5.1 Προσδιορισμός των παραγόμενων ξυλοολιγοσακχαριτών

Κατά την επεξεργασία του προκατεργασμένου στελέχους αραβοσίτου με την ξυλανάση FoXyn, που παράχθηκε στο εργαστήριο με ετερόλογη έκφραση της μεθυλότροφης ζύμης *P. pastoris*, παράχθηκαν ξυλοολιγοσακχαρίτες. Πιο συγκεκριμένα, στο υπερκείμενο υγρό που αποθηκεύτηκε στην κατάψυξη, έπειτα από τον διαχωρισμό του με το στερεό κλάσμα με διήθηση υπό κενό, προσδιορίστηκαν οι παραγόμενοι ξυλοολιγοσακχαρίτες.

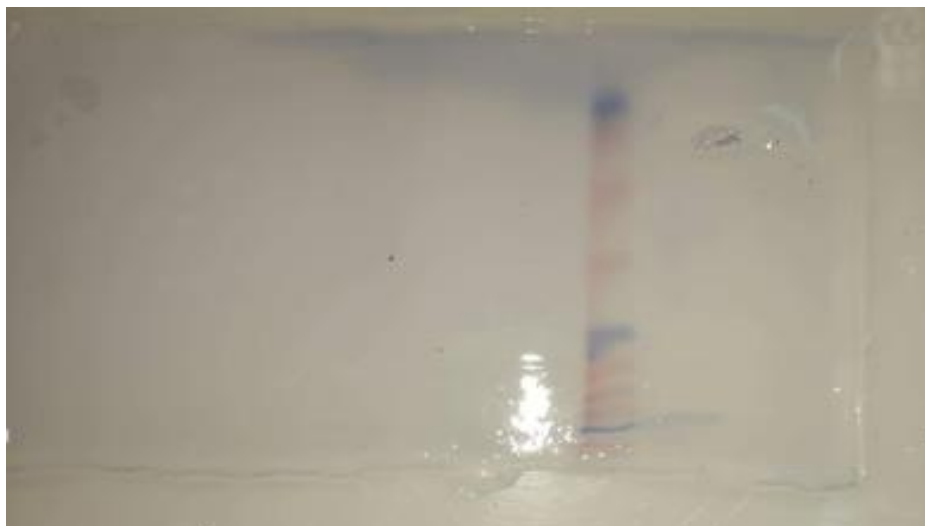
Για τον ποιοτικό προσδιορισμό τους χρησιμοποιήθηκε η χρωματογραφία εναλλαγής ανιόντων (ΗΡΑΕC) και εισάχθηκε ποσότητα 10 μL από το κάθε δείγμα που είχε πρώτα αραιωθεί αρκετά ώστε να είναι συγκρίσιμο με το πρότυπο διάλυμα. Το πρότυπο διάλυμα ήταν μίγμα ενώσεων : ξυλόζη, ξυλοβιόζη, ξυλοτριόζη, ξυλοτετραόζη, ξυλοπενταόζη και ξυλοεξαόζη.



Διάγραμμα 1-Ανίχνευση των παραγόμενων ξυλοολιγοσακχαριτών

5.2 Προσδιορισμός του μοριακού βάρους της παραγόμενης πρωτεΐνης

Από την ηλεκτροφόρηση SDS-PAGE η γέλη που προέκυψε φαίνεται στην Εικόνα 26. Η στήλη με τις πολλές μπάντες είναι του δείγματος αναφοράς που είχε εισαχθεί και του οποίου τα μοριακά βάρη είναι γνωστά. Παρατηρώντας την εικόνα βρέθηκε ότι η παραγόμενη πρωτεΐνη από την ετερόλογη έκφραση της *P. pastoris* έχει μοριακό βάρος 25 kDa.



Εικόνα 27-Η μπάντα που προέκυψε από την ηλεκτροφόρηση SDS-PAGE για τον προσδιορισμό του μοριακού βάρους της παραγόμενης πρωτεΐνης

Κεφάλαιο 6: Ενζυμική υδρόλυση

6.1 Υδρόλυση καθαρής κυτταρίνης (AVICEL) για διαφορετικές συγκεντρώσεις ενζύμου

Σε αυτή τη σειρά πειραμάτων μελετήθηκε για διαφορετικές συγκεντρώσεις ενζύμου η παραγωγή της γλυκόζης σε διάφορες χρονικές στιγμές. Η συγκέντρωση της βιομάζας διατηρήθηκε σταθερή 1 g για όλα τα δείγματα και οι συνθήκες διεξαγωγής της υδρόλυσης ήταν 50 °C με ανάδευση 180 rpm.

Το πείραμα έλαβε χώρα σε 6 κωνικές φιάλες των 50 mL με την καθεμία να περιέχει διαφορετική συγκέντρωση ενζύμου. Πιο συγκεκριμένα, 5 mg/g DM, 10 mg/ g DM, 15 mg/ g DM, 20 mg/ g DM L, 25 mg/ g DM, 30 mg/ g DM και η αρχική συγκέντρωση του ενζυμικού σκευάσματος Cellic CTec2 137 mg/mL. Ο όγκος της αντίδρασης ήταν 10 mL εκ των οποίων το 1 g ήταν η βιομάζα (AVICEL) που θεωρείται ότι είναι 1 mL και τα υπόλοιπα 9 mL ($V_{solution}$) το ένζυμο μαζί με το ρυθμιστικό διάλυμα κιτρικών-φωσφορικών pH=5. Σε αυτό το σημείο αξίζει να αναφερθεί ότι οι επιθυμητές συγκεντρώσεις αντιστοιχούν στον όγκο του ρυθμιστικού διαλύματος (9 mL). Για τον υπολογισμό του όγκου του ενζύμου που θα πρέπει να εισαχθεί σε κάθε κωνική φιάλη χρησιμοποιείται ο τύπος

$$V_{cellic} = \frac{C_{enzyme} \cdot m_{DM} \cdot V_{solution}}{C_{cellic} \cdot V_{added\ to\ each\ flask}}$$

Εξίσωση 1-Υπολογισμός απαιτούμενου όγκου ενζύμου για διαφορετικό όγκο διαλύματος

όπου,

C_{enzyme} : η επιθυμητή συγκέντρωση του ενζύμου

m_{DM} : η επιθυμητή μάζα των στερεών

$V_{solution}$: ο όγκος του διαλύματος

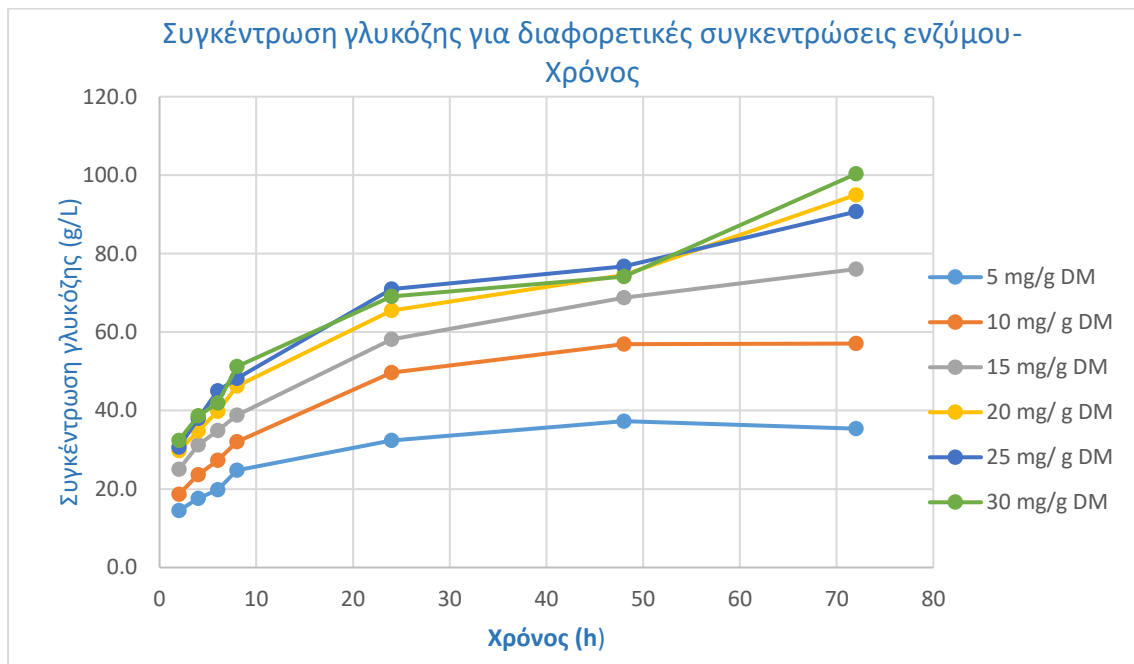
C_{cellic} : η συγκέντρωση του εμπορικού ενζυμικού παρασκευάσματος (137 mg/mL)

$V_{added\ to\ each\ flask}$: ο όγκος που προστίθεται σε κάθε κωνική φιάλη

Στον παρακάτω πίνακα φαίνονται τα αποτελέσματα της συγκέντρωσης της γλυκόζης για διάφορες συγκεντρώσεις ενζύμου.

Πίνακας 7-Συγκέντρωση γλυκόζης σε g/L σε 1g ξηρής βιομάζας (DM) για διαφορετικές συγκεντρώσεις ενζύμου (mg/g DM)

Χρόνος (h)	5 mg/g _{DM}	10 mg/g _{DM}	15 mg/g _{DM}	20 mg/g _{DM}	25 mg/g _{DM}	30 mg/g _{DM}
2	14.5	18.7	25.0	29.7	30.7	32.4
4	17.6	23.6	31.2	34.8	38.0	38.6
6	19.8	27.3	34.9	39.8	45.0	42.0
8	24.7	32.0	38.8	46.2	48.2	51.2
24	32.4	49.6	58.1	65.5	71.0	69.1
48	37.3	56.9	68.8	74.5	76.8	74.2
72	35.4	57.1	76.1	95.0	90.7	100.3



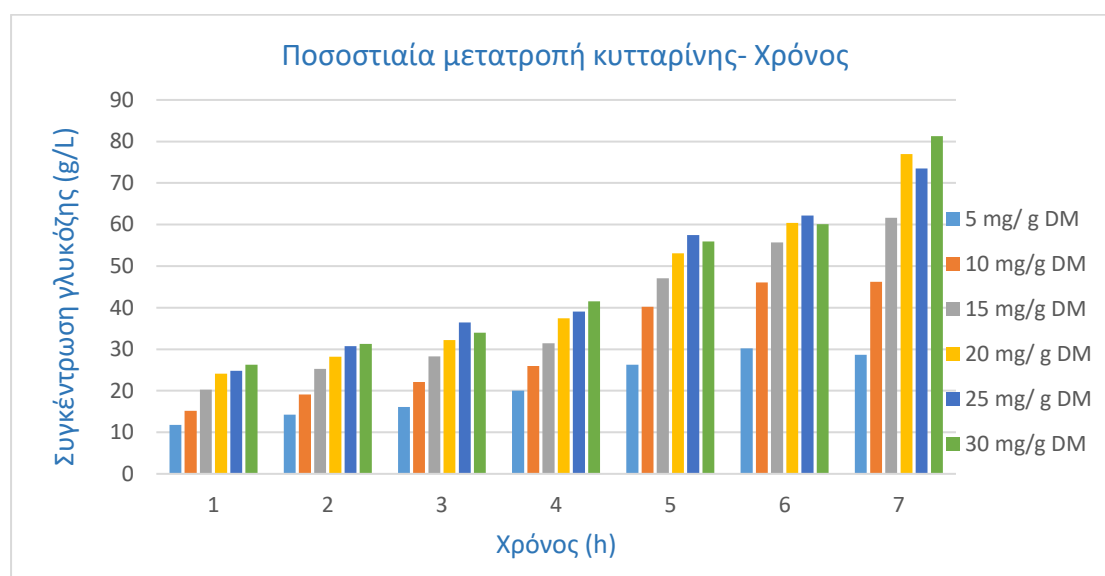
Διάγραμμα 2-Συγκέντρωση γλυκόζης για διαφορετικές συγκεντρώσεις ενζύμου στην πάροδο του χρόνου

Παρατηρώντας το παραπάνω διάγραμμα φαίνεται πως για τις πρώτες 24 h η συγκέντρωση της γλυκόζης παρουσιάζει αύξηση ενώ μετά συνεχίζει να αυξάνεται με μικρότερο ρυθμό εμφανίζοντας πλάτος. Καθώς η συγκέντρωση της βιομάζας έχει χαμηλή τιμή είναι αναμενόμενο όσο αυξάνεται η ενζυμική συγκέντρωση να παράγεται περισσότερη γλυκόζη, αφού μεγαλύτερη επιφάνεια υλικού σε λιγότερο χρόνο διαβρέχεται από το διάλυμα ενζύμου-ρυθμιστικού διαλύματος. Επιπλέον, στις καμπύλες των τριών τελευταίων ενζυμικών φορτίων (20, 25, 30 mg/m DM) υπάρχει μεγάλο ποσοστό επικάλυψης.

Στη συνέχεια εξετάστηκε το ποσοστό της κυτταρίνης που μετατράπηκε σε γλυκόζη και τα αποτελέσματα παρουσιάζονται στο παρακάτω διάγραμμα.

Πίνακας 8-Ποσοστιαία μετατροπή κυτταρίνης για διαφορετικά ενζυμικά φορτία μετά το πέρας της υδρόλυσης

Συγκέντρωση ενζύμου (mg/g _{DM})	Ποσοστιαία μετατροπή κυτταρίνης (%)
5	28.7
10	46.2
15	61.6
20	76.9
25	73.5
30	81.3



Διάγραμμα 3-Ποσοστιαία μετατροπή κυτταρίνης για διαφορετικές συγκεντρώσεις ενζύμου με την πάροδο του χρόνου

Από το παραπάνω διάγραμμα μπορεί να διεξαχθεί το συμπέρασμα ότι για δεδομένη συγκέντρωση ενζύμου το ποσοστό μετατροπής της κυτταρίνης σε γλυκόζη αυξάνεται με την πάροδο του χρόνου. Αυτή η αύξηση ήταν αναμενόμενη καθώς με την πάροδο του χρόνου γίνεται καλύτερη διαβροχή του υλικού από το διάλυμα του ενζύμου-ρυθμιστικού διαλύματος με αποτέλεσμα αν μετατρέπεται μεγαλύτερη ποσότητα κυτταρίνης σε γλυκόζη. Όπως φαίνεται και από το Διάγραμμα 1 ενώ τα τρία τελευταία ενζυμικά φορτία εμφανίζουν κοντινές τιμές, στις 72 h η ράβδος που αντιστοιχεί στο ενζυμικό φορτίο 30 mg/ g DM έχει μια απότομη αύξηση.

Παρατηρώντας τα αποτελέσματα που προέκυψαν, η τιμή ενζυμικού φορτίου που θεωρήθηκε κατάλληλη για την διεξαγωγή των υδρολύσεων ήταν 15 mg/ g DM.

Παρότι για μεγαλύτερες συγκεντρώσεις ενζύμου όπως είναι λογικό παράγεται περισσότερη ποσότητα γλυκόζης, δεν προτιμήθηκε καθώς αυξάνει το κόστος της διεργασίας και δεν παρατηρείται μεγάλη αύξηση συγκριτικά με το προηγούμενο φορτίο.

6.2 Υδρόλυση καθαρής κυτταρίνης (AVICEL) για διαφορετικές συγκεντρώσεις στερεών

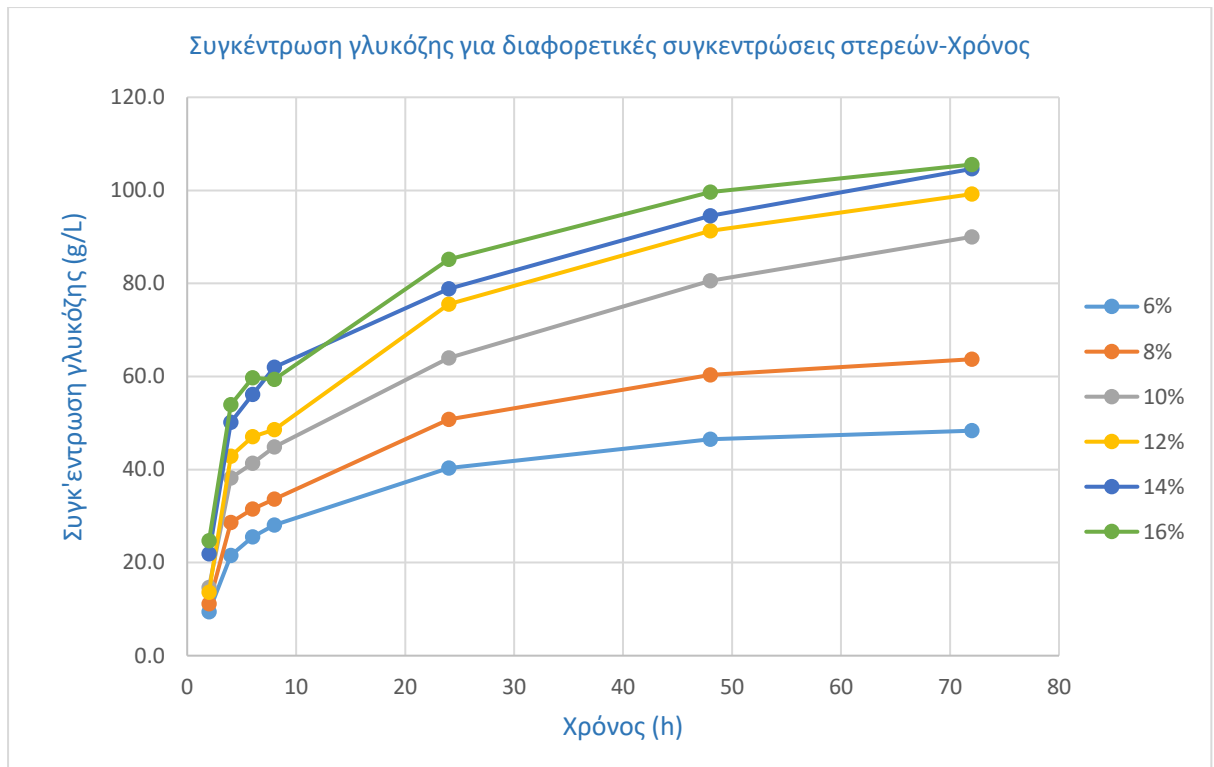
Σε αυτή τη σειρά πειραμάτων μελετήθηκε για διαφορετικές συγκεντρώσεις στερεών η παραγωγή της γλυκόζης σε διάφορες χρονικές στιγμές. Η συγκέντρωση του ενζύμου διατηρήθηκε σταθερή 15 mg/ g DM για όλα τα δείγματα και οι συνθήκες διεξαγωγής της υδρόλυσης ήταν 50 °C με ανάδευση 180 rpm.

Το πείραμα έλαβε χώρα σε 6 κωνικές φιάλες των 50 mL με την καθεμία να περιέχει διαφορετική συγκέντρωση στερεών. Πιο συγκεκριμένα, 6% w/w, 8% w/w, 10% w/w, 12% w/w, 14% w/w, 16% w/w. Ο όγκος της αντίδρασης ήταν 10 mL, αλλά σε αντίθεση με την προηγούμενη ενζυμική υδρόλυση ο όγκος του διαλύματος ένζυμο-ρυθμιστικό διάλυμα κιτρικών-φωσφορικών pH=5 ($V_{solution}$) δεν παρέμενε σταθερός αφού άλλαζε η συγκέντρωση των στερεών (AVICEL). Σε αυτή την περίπτωση η συγκέντρωση του ενζύμου (15 mg/mL) υπολογίζεται στον εκάστοτε όγκο του διαλύματος ένζυμο-ρυθμιστικό διάλυμα από την εξίσωση 1.

Στον παρακάτω πίνακα φαίνονται τα αποτελέσματα της συγκέντρωσης της γλυκόζης για διάφορες συγκεντρώσεις στερεών.

Πίνακας 9-Συγκέντρωση γλυκόζης σε g/L σε ενζυμική συγκέντρωση 15 mg/mL για διαφορετικές συγκεντρώσεις στερεών (%w/w)

Χρόνος (h)	6% w/w	8% w/w	10% w/w	12% w/w	14% w/w	16% w/w
2	9.5	11.2	14.7	13.6	21.9	24.7
4	21.5	28.6	38.2	42.7	50.2	54.0
6	25.5	31.5	41.4	47.0	56.1	59.7
8	28.1	33.6	44.9	48.6	62.0	59.4
24	40.3	50.8	64.0	75.6	78.8	85.2
48	46.5	60.3	80.6	91.3	94.5	99.7
72	48.3	63.7	90.0	99.2	104.6	105.6



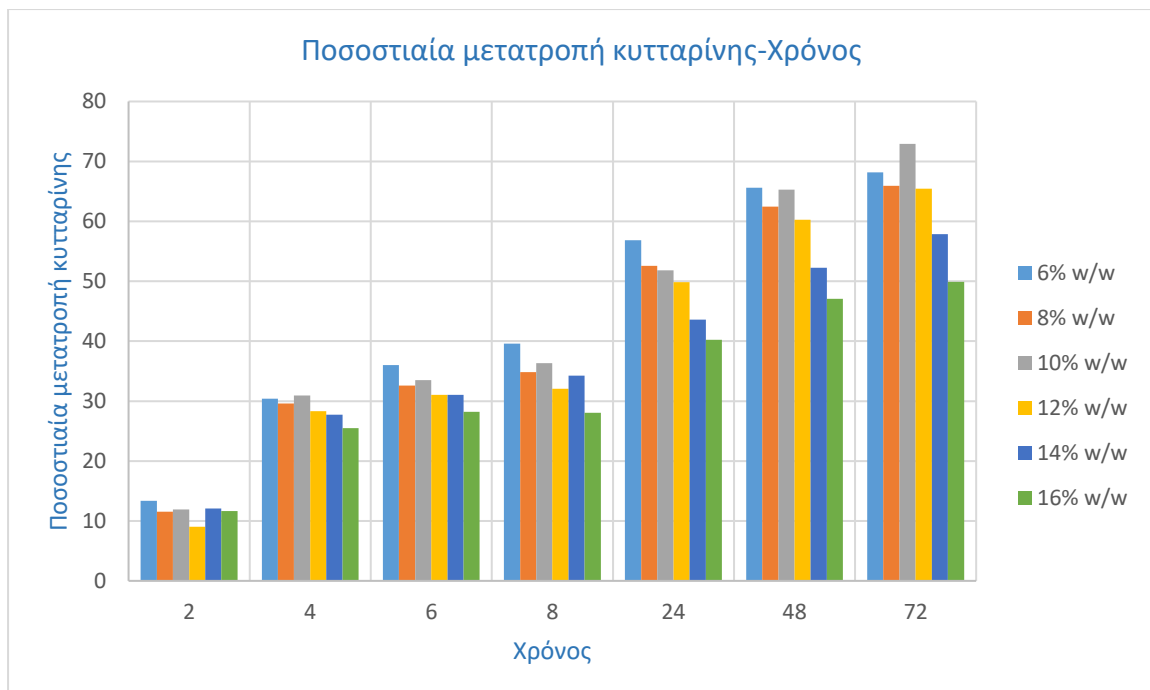
Διάγραμμα 4- Συγκέντρωση γλυκόζης για διαφορετικές συγκεντρώσεις στερεών στην πάροδο του χρόνου

Ομοίως με το Διάγραμμα 1, τις πρώτες 24 h η συγκέντρωση της γλυκόζης παρουσιάζει πιο απότομη αύξηση ενώ μετά συνεχίζει να αυξάνεται με μικρότερο ρυθμό εμφανίζοντας πλατό. Η αύξηση της ποσότητας της γλυκόζης καθώς αυξάνεται η συγκέντρωση των στερεών είναι αναμενόμενη, καθώς υπάρχει μεγαλύτερη ποσότητα υποστρώματος για να δράσει το ένζυμο αλλά και περισσότερη κυτταρίνη για να μετατρέψει σε γλυκόζη. Στις καμπύλες που είναι 14 και 16% w/w η συγκέντρωση των στερεών, παρατηρείται πως μέχρι και τις 8 h η μικρότερη συγκέντρωση βιομάζας (14% w/w) παράγει μεγαλύτερη ποσότητα γλυκόζης ενώ μετά τις 24 h, τα 16% w/w στερεά έχουν μεγαλύτερη παραγωγή. Το ενζυμικό διάλυμα θα πρέπει να διαβρέξει μεγαλύτερη ποσότητα βιομάζας, άρα θα χρειαστεί περισσότερο χρόνο για να γίνει πλήρης διαβροχή συγκριτικά με την 14% w/w συγκέντρωση στερεών.

Στη συνέχεια εξετάστηκε το ποσοστό της κυτταρίνης που μετατράπηκε σε γλυκόζη και τα αποτελέσματα παρουσιάζονται στο παρακάτω διάγραμμα.

Πίνακας 10-Ποσοσταία μετατροπή της κυτταρίνης για διαφορετικές συγκεντρώσεις στερεών μετά το πέρας της υδρόλυσης

Συγκέντρωση στερεών (% w/w)	Ποσοσταία μετατροπή κυτταρίνης (%)
6	68.2
8	65.9
10	72.9
12	65.5
14	57.8
16	49.9



Διάγραμμα 5- Ποσοσταία μετατροπή κυτταρίνης για διαφορετικές συγκεντρώσεις στερεών με την πάροδο του χρόνου

Από το παραπάνω διάγραμμα, ομοίως με το Διάγραμμα 2, μπορεί να διεξαχθεί το συμπέρασμα ότι για δεδομένη συγκέντρωση στερεών το ποσοστό μετατροπής της κυτταρίνης σε γλυκόζη αυξάνεται με την πάροδο του χρόνου. Αυτή η αύξηση ήταν αναμενόμενη καθώς με την πάροδο του χρόνου γίνεται καλύτερη διαβροχή του υλικού από το διάλυμα του ενζύμου-ρυθμιστικού διαλύματος με αποτέλεσμα αν μετατρέπεται μεγαλύτερη ποσότητα κυτταρίνης σε γλυκόζη.

Παρατηρώντας τα αποτελέσματα που προέκυψαν, η συγκέντρωση των στερεών που θεωρήθηκε κατάλληλη για την διεξαγωγή των υδρολύσεων ήταν 10% w/w. Για μεγαλύτερη συγκέντρωση στερεών φαίνεται πως η μετατροπή της κυτταρίνης σε γλυκόζη μειώνεται και για την ακρίβεια δεν υδρολύεται ούτε το 50% της κυτταρίνης. Αντίθετα, για συγκέντρωση 10% w/w επιτυγχάνεται η μέγιστη μετατροπή της κυτταρίνης σε γλυκόζη.

6.3 Υδρολύση υλικών διαφορετικής περιεκτικότητας κυτταρίνης

Σε αυτή τη σειρά πειραμάτων μελετήθηκε η παραγωγή γλυκόζης από βιομάζες διαφορετικής περιεκτικότητας κυτταρίνης. Οι συνθήκες διεξαγωγής του πειράματος ήταν όπως και στις προηγούμενες υδρολύσεις, θερμοκρασία 50°C, pH=5.0 σε ανάδευση 180 rpm για 72 h. Έχοντας βρεθεί οι βέλτιστες τιμές για την συγκέντρωση των στερεών και του ενζύμου από τις δύο προηγούμενες υδρολύσεις, σε κάθε δείγμα υπήρχε 1 g της εκάστοτε βιομάζας και 9 mL από το διάλυμα ένζυμο-ρυθμιστικό διάλυμα κιτρικών-φωσφορικών pH=5.0 με ενζυμικό φορτίο 15 mg/g DM.

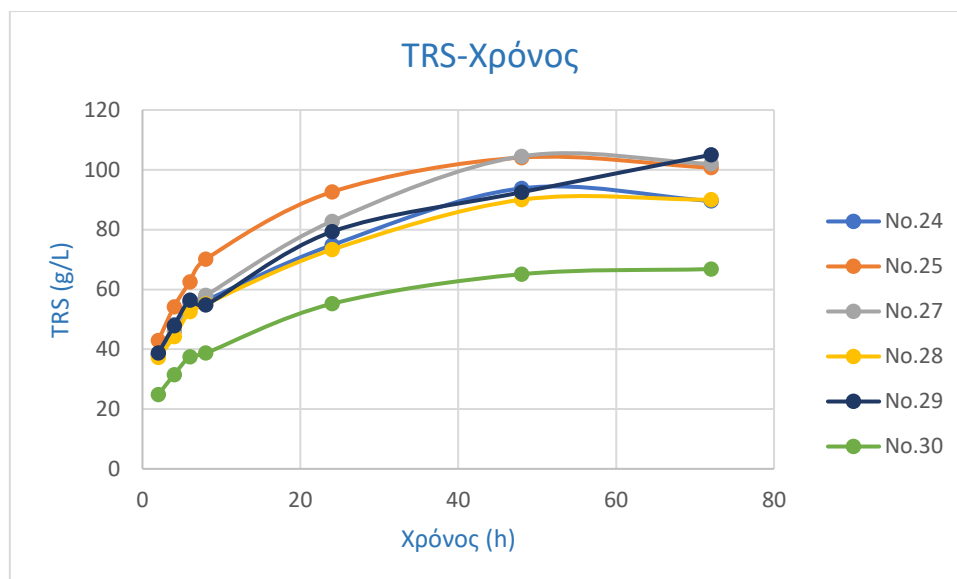
Όλα τα υλικά που υδρολύθηκαν ήταν από προκατεργασία organosolv με διάλυμα ακετόνης-νερού. Στον παρακάτω πίνακα παρατίθενται τα αποτελέσματα για την συγκέντρωση της γλυκόζης που προέκυψε από το εκάστοτε υλικό και εμφανίζονται σε διάγραμμα. Σε αυτά τα πειράματα πέρα από τη μέθοδο glucotest για την μέτρηση της παραγόμενης γλυκόζης, έγινε και μέτρηση των ολικών αναγωγικών σακχάρων (TRS) με τη μέθοδο DNS. Ο λόγος είναι πως τα υλικά που υδρολύθηκαν δεν είναι καθαρή κυτταρίνη όπως πριν, συνεπώς πέρα από την παραγόμενη γλυκόζη θα παραχθούν και άλλα αναγωγικά σάκχαρα.

Για την σύγκριση των 15 υλικών που υδρολύθηκαν έγιναν 3 διαφορετικοί κύκλοι πειραμάτων. Σε πρώτη φάση υδρολύθηκαν τα υλικά 24, 25, 27, 28, 29 και 30, στον δεύτερο κύκλο υδρολύσεων τα υλικά 15, 16, 17, 18, 19 και στον τρίτο κύκλο τα υλικά 20, 21, 22 και 26. Με αυτή τη σειρά παρουσιάζονται τα αποτελέσματα και διαγράμματα παρακάτω καθώς σε ένα συγκεντρωτικό διάγραμμα οι καμπύλες επικαλύπτονται και δεν μπορεί να διεξαχθεί με ευκολία η συμπεριφορά του κάθε υλικού. Στο τέλος θα παρουσιαστεί ένας συγκεντρωτικός πίνακας με το ποσοστό κυτταρίνης που περιείχε το καθένα και την μετατροπή του σε γλυκόζη.

Υλικά 24,25,27,28,29,30

Πίνακας 11-Συγκέντρωση ολικών αναγωγικών σακχάρων-TRS (g/L) με την πάροδο του χρόνου

Χρόνος (h)	Συγκέντρωση ολικών αναγωγικών σακχάρων (g/L)					
	No.24	No.25	No.27	No.28	No.29	No.30
2	38.1	42.9	38.3	37.2	38.7	24.8
4	48.2	54.2	46.0	44.2	47.8	31.5
6	55.7	62.5	55.8	52.6	56.4	37.5
8	56.4	70.1	58.0	55.1	54.8	38.7
24	74.8	92.6	82.8	73.3	79.3	55.2
48	93.8	104.1	104.5	90.0	92.5	65.1
72	89.6	100.7	102.0	90.0	105.0	66.8

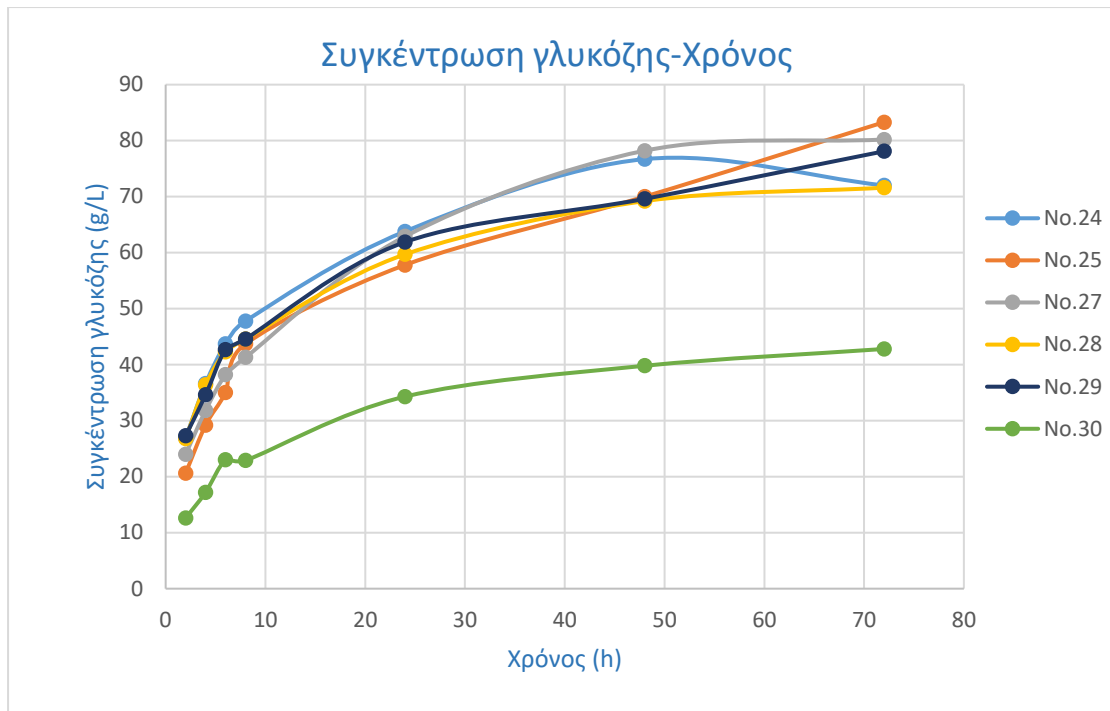


Διάγραμμα 6-Συγκέντρωση ολικών αναγωγικών σακχάρων για το κάθε υλικό με την πάροδο του χρόνου

Από το παραπάνω διάγραμμα φαίνεται πως όλα τα υλικά έχουν την αναμενόμενη συμπεριφορά. Τις πρώτες 8 h εμφανίζουν μια απότομη αύξηση και στη συνέχεια εμφανίζουν πλατό. Στην αρχή της υδρόλυσης, η συγκέντρωση του υποστρώματος (στερεά) είναι μεγαλύτερη με αποτέλεσμα η παραγωγή των σακχάρων να γίνεται με μεγαλύτερο ρυθμό και στη συνέχεια αφού υπάρχει ακόμη υλικό για να υδρολυθεί συνεχίζει η παραγωγή τους αλλά με πιο ομαλή αύξηση. Κατά βάση, ο ρυθμός παραγωγής των σακχάρων μειώνεται από την παρεμπόδιση που υφίσταται το ένζυμο από το προϊόν.

Πίνακας 12- Συγκέντρωση γλυκόζης (g/L) με την πάροδο του χρόνου

Χρόνος (h)	Συγκέντρωση γλυκόζης (g/L)					
	No.24	No.25	No.27	No.28	No.29	No.30
2	26.9	29.4	24.0	26.8	27.3	12.6
4	36.6	40.7	31.8	36.4	34.6	17.2
6	43.7	47.7	38.2	42.3	42.7	23.0
8	47.8	54.7	41.3	44.6	44.6	22.9
24	63.8	76.7	62.9	59.7	61.9	34.3
48	76.7	83.3	78.2	69.2	69.6	39.8
72	72.0	84.6	80.2	71.6	78.1	42.8

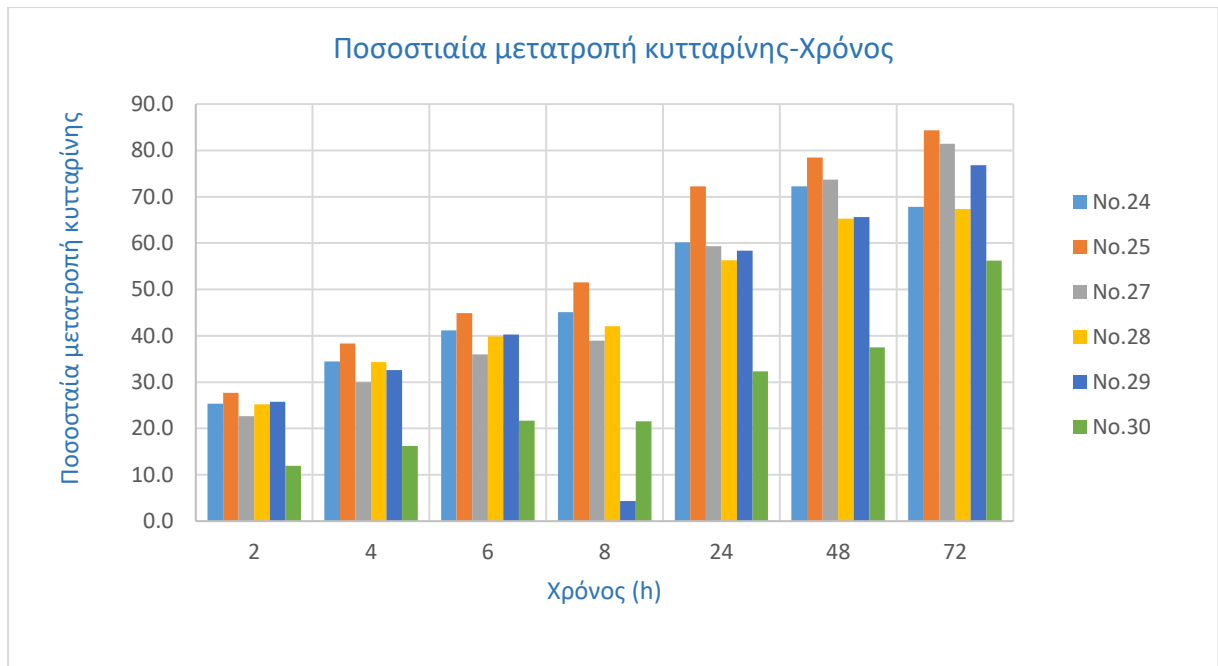


Διάγραμμα 7-Συγκέντρωση γλυκόζης κάθε υλικού με την πάροδο του χρόνου

Αντίστοιχα με το Διάγραμμα 5, τις πρώτες 8 h η παραγωγή της γλυκόζης γίνεται με μεγάλο ρυθμό και στη συνέχεια εμφανίζει πλατό. Την μεγαλύτερη παραγωγή γλυκόζης εμφανίζει το υλικό No.25.

Πίνακας 13- Ποσοστιαία μετατροπή κυτταρίνης σε γλυκόζη με την πάροδο του χρόνου

Χρόνος (h)	Ποσοστιαία μετατροπή κυτταρίνης σε γλυκόζη					
	No.24	No.25	No.27	No.28	No.29	No.30
2	25.4	29.3	24.4	25.2	26.9	16.6
4	34.5	40.6	32.3	34.2	34.1	22.6
6	41.2	47.5	38.8	39.8	42.0	30.2
8	45.0	54.5	42.0	42.0	4.5	30.1
24	60.1	76.4	63.9	56.2	60.9	45.1
48	72.3	83.0	79.4	65.1	68.5	52.3
72	67.9	84.3	81.5	67.4	76.9	56.3



Διάγραμμα 8-Ποσοστιαία μετατροπή κυτταρίνης με την πάροδο του χρόνου

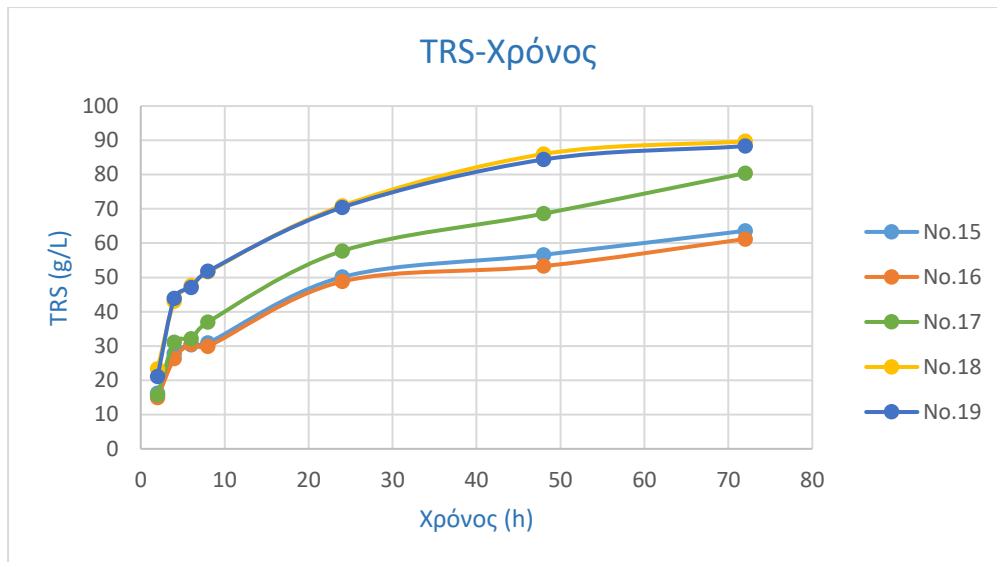
Ομοίως, για δεδομένο υλικό το ποσοστό μετατροπής της κυτταρίνης σε γλυκόζη αυξάνεται με την πάροδο του χρόνου. Αυτή η αύξηση ήταν αναμενόμενη καθώς με την πάροδο του χρόνου γίνεται καλύτερη διαβροχή του υλικού από το διάλυμα του ενζύμου-ρυθμιστικού διαλύματος με αποτέλεσμα αν μετατρέπεται μεγαλύτερη ποσότητα κυτταρίνης σε γλυκόζη.

Από τα τρία παραπάνω διαγράμματα μπορεί να θεωρηθεί ότι το καλύτερο υλικό είναι το No.25 εφόσον είχε το μεγαλύτερο ποσοστό μετατροπής της κυτταρίνης σε γλυκόζη.

Υλικά 15,16,17,18,19

Πίνακας 14-Συγκέντρωση ολικών αναγωγικών σακχάρων για τα υλικά 15,16,17,18,19 με την πάροδο του χρόνου

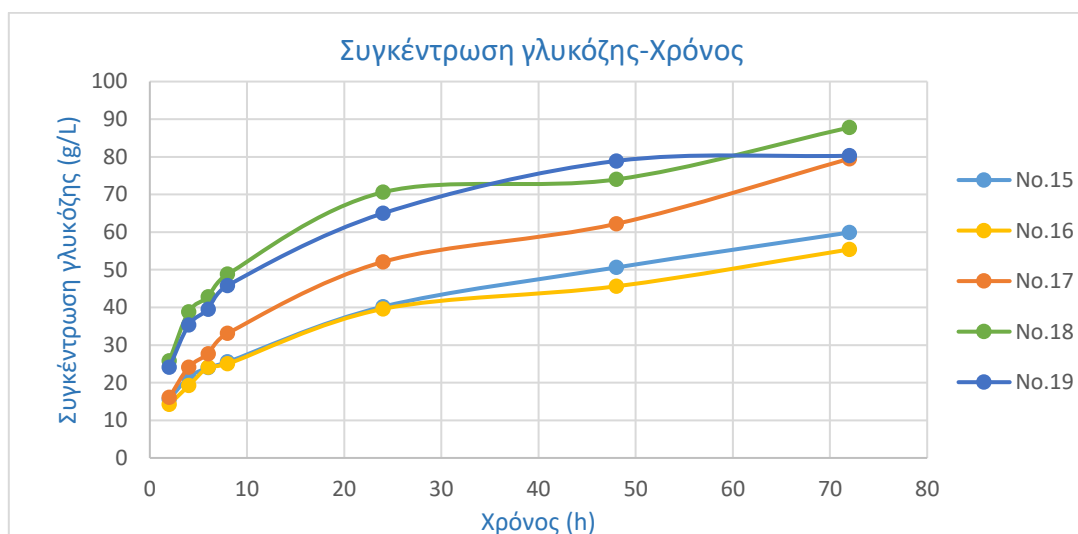
Χρόνος (h)	Συγκέντρωση ολικών αναγωγικών σακχάρων (g/L)				
	No.15	No.16	No.17	No.18	No.19
2	16.2	14.9	15.7	23.3	21.1
4	27.8	26.3	31.1	43.0	43.9
6	30.3	30.5	32.1	47.6	47.1
8	30.9	29.9	37.0	51.6	51.8
24	50.1	48.8	57.7	70.9	70.4
48	56.6	53.3	68.6	86.0	84.4
72	63.6	61.2	80.4	89.7	88.3



Διάγραμμα 9- Συγκέντρωση ολικών αναγωγικών σακχάρων για τα υλικά 15,16,17,18,19 με την πάροδο του χρόνου

Πίνακας 15-Συγκέντρωση γλυκόζης για τα υλικά 15,16,17,18,19 με την πάροδο του χρόνου

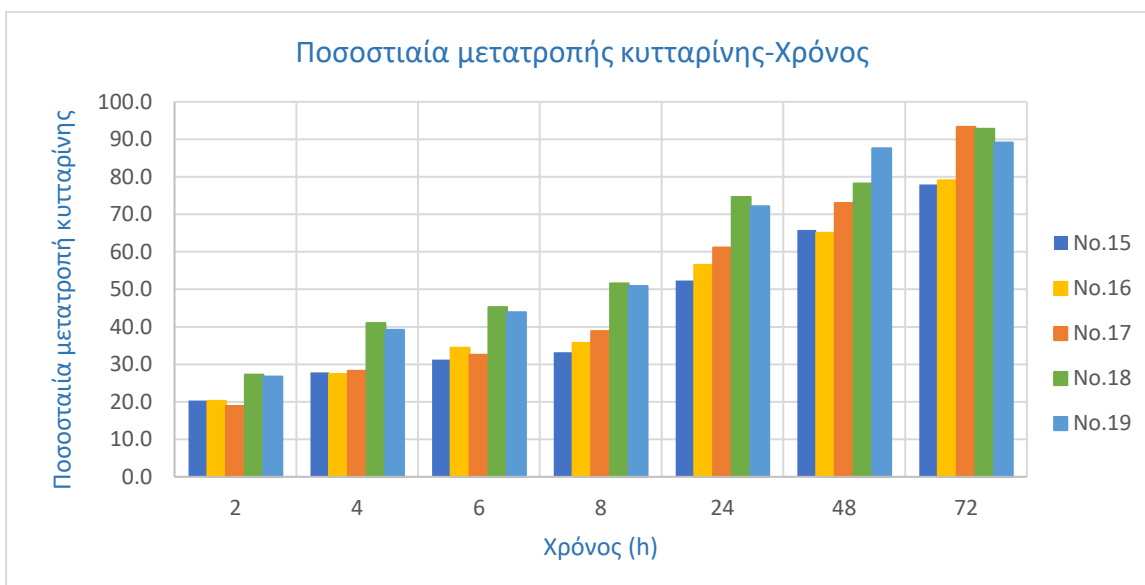
Χρόνος (h)	Συγκέντρωση γλυκόζης (g/L)				
	No.15	No.16	No.17	No.18	No.19
2	15.6	14.2	16.1	25.8	24.1
4	21.4	19.2	24.1	38.8	35.3
6	24.0	24.1	27.7	42.8	39.5
8	25.5	25.0	33.1	48.8	45.8
24	40.2	39.6	52.1	70.6	65.0
48	50.6	45.6	62.2	74.0	78.9
72	59.9	55.4	79.5	87.8	80.3



Διάγραμμα 10-Συγκέντρωση γλυκόζης για τα υλικά 15,16,17,18,19 με την πάροδο του χρόνου

Πίνακας 16-Ποσοστιαία μετατροπή κυτταρίνης σε γλυκόζη με την πάροδο του χρόνου

Χρόνος (h)	Ποσοστιαία μετατροπή κυτταρίνης σε γλυκόζη				
	No.15	No.16	No.17	No.18	No.19
2	20.3	20.3	18.9	27.3	26.8
4	27.9	27.4	28.3	41.0	39.2
6	31.2	34.4	32.5	45.2	43.9
8	33.2	35.7	38.9	51.6	50.9
24	52.3	56.5	61.2	74.6	72.2
48	65.9	95.1	73.0	78.2	87.6
72	78.0	79.1	93.3	92.8	89.2



Διάγραμμα 11-Ποσοστιαία μετατροπή κυτταρίνης σε γλυκόζη με την πάροδο του χρόνου

Ομοίως, με την πρώτη σειρά υδρολύσεων, για δεδομένο υλικό η συγκέντρωση της γλυκόζης και το ποσοστό μετατροπής της κυτταρίνης σε γλυκόζη αυξάνεται με την πάροδο του χρόνου. Αυτή η αύξηση ήταν αναμενόμενη καθώς με την πάροδο του χρόνου γίνεται καλύτερη διαβροχή του υλικού από το διάλυμα του ενζύμου-ρυθμιστικού διαλύματος με αποτέλεσμα να μετατρέπεται μεγαλύτερη ποσότητα κυτταρίνης σε γλυκόζη.

Από τα τρία παραπάνω διαγράμματα μπορεί να θεωρηθεί ότι το καλύτερο υλικό είναι το No.18 εφόσον είχε το μεγαλύτερο ποσοστό μετατροπής της κυτταρίνης σε γλυκόζη.

Υλικά 20,21,22,26

Πίνακας 17- Συγκέντρωση ολικών αναγωγικών σακχάρων για τα υλικά 20,21,22,26 με την πάροδο του χρόνου

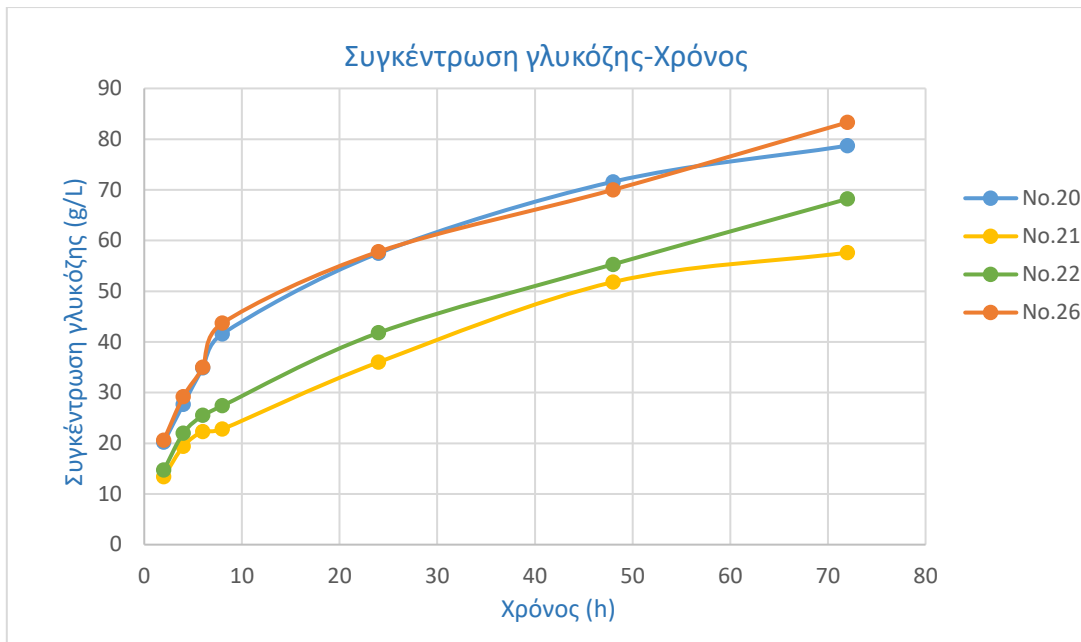
Χρόνος (h)	Συγκέντρωση ολικών αναγωγικών σακχάρων (g/L)			
	No.20	No.21	No.22	No.26
2	24.3	18.7	22.0	24.0
4	34.6	25.7	30.5	35.1
6	42.0	29.7	35.6	38.7
8	49.7	32.4	38.7	48.7
24	68.1	48.4	57.8	66.9
48	80.8	56.9	73.3	77.3
72	85.9	70.9	83.7	86.5



Διάγραμμα 12- Συγκέντρωση ολικών αναγωγικών σακχάρων για τα υλικά 20,21,22,26 με την πάροδο του χρόνου

Πίνακας 18- Συγκέντρωση γλυκόζης για τα υλικά 20,21,22,26 με την πάροδο του χρόνου

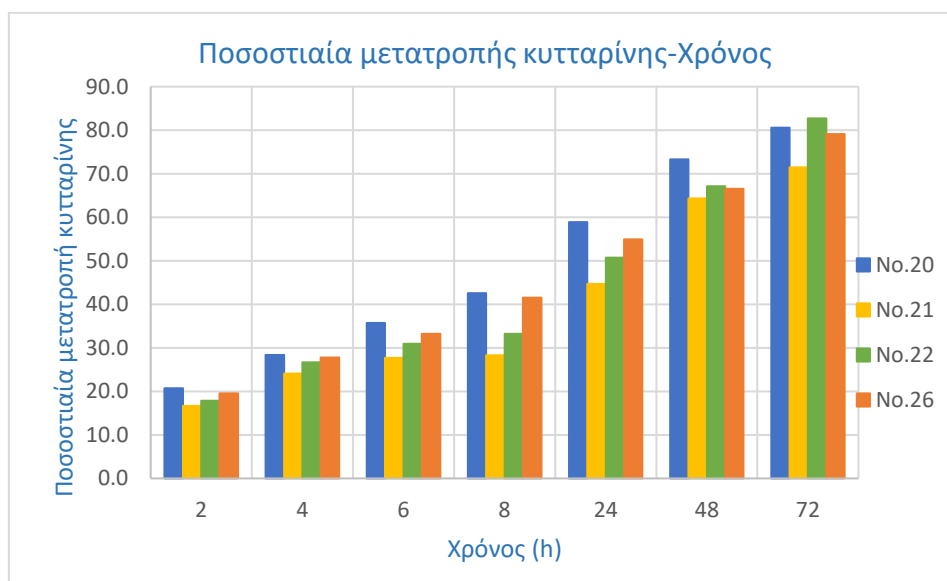
Χρόνος (h)	Συγκέντρωση γλυκόζης (g/L)			
	No.20	No.21	No.22	No.26
2	20.2	13.4	14.7	20.6
4	27.7	19.4	22.0	29.2
6	34.9	22.3	25.5	35.0
8	41.6	22.8	27.4	43.7
24	57.5	36.0	41.8	57.8
48	71.6	51.8	55.3	70.0
72	78.7	57.6	68.2	83.3



Διάγραμμα 13- Συγκέντρωση γλυκόζης για τα υλικά 20,21,22,26 με την πάροδο του χρόνου

Πίνακας 19-Ποσοστιαία μετατροπή κυτταρίνης σε γλυκόζη με την πάροδο του χρόνου

Χρόνος (h)	Ποσοστιαία μετατροπή κυτταρίνης σε γλυκόζη			
	No.20	No.21	No.22	No.26
2	20.7	16.6	17.8	19.6
4	28.4	24.1	26.7	27.7
6	35.7	27.7	30.9	33.2
8	42.6	28.3	33.2	41.5
24	58.9	44.7	50.7	54.9
48	73.3	64.3	67.1	66.5
72	80.6	71.5	82.7	79.1



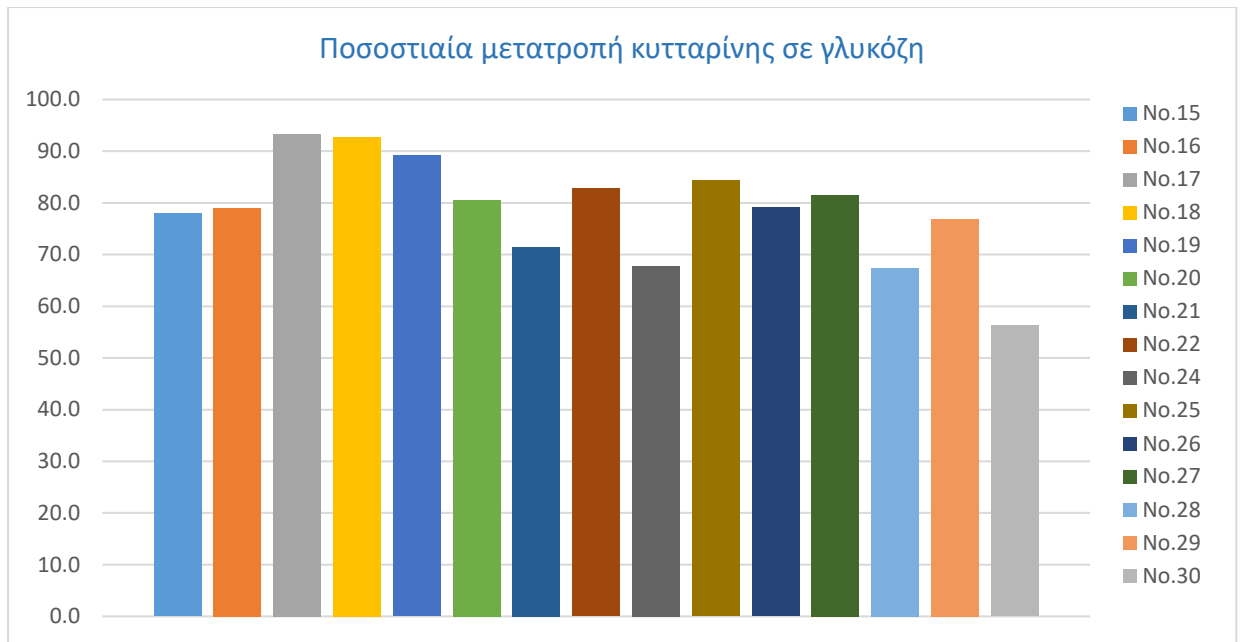
Διάγραμμα 14-Ποσοστιαία μετατροπή κυτταρίνης σε γλυκόζη με την πάροδο του χρόνου

Ομοίως, με τις δύο προηγούμενες σειρές υδρολύσεων, για δεδομένο υλικό η συγκέντρωση της γλυκόζης και το ποσοστό μετατροπής της κυτταρίνης σε γλυκόζη αυξάνεται με την πάροδο του χρόνου. Αυτή η αύξηση ήταν αναμενόμενη καθώς με την πάροδο του χρόνου γίνεται καλύτερη διαβροχή του υλικού από το διάλυμα του ενζύμου-ρυθμιστικού διαλύματος με αποτέλεσμα αν μετατρέπεται μεγαλύτερη ποσότητα κυτταρίνης σε γλυκόζη.

Από τα τρία παραπάνω διαγράμματα, μπορεί να θεωρηθεί ότι το καλύτερο υλικό είναι το Νο.20 εφόσον καθ' όλη τη διάρκεια της εμφάνιζε το μεγαλύτερο ποσοστό μετατροπής της κυτταρίνης σε γλυκόζη. Παρότι στις 72 h το υλικό Νο.22 εμφανίζει μεγαλύτερο ποσοστό μετατροπής κυτταρίνης, η διαφορά τους είναι ελάχιστη ενώ σε όλες τις προηγούμενες μετρήσεις η ράβδος του υλικού Νο.20 είναι εμφανώς υψηλότερη από του Νο.22.

Πίνακας 20-Ποσοστιαία μετατροπή κυτταρίνης μετά το πέρας της υδρόλυσης για όλα τα υλικά

Υλικά	Ποσοστιαία μετατροπή κυτταρίνης (%)	Ποσοστό κυτταρίνης (%)
No.15	78.0	62.2
No.16	79.1	56.8
No.17	93.3	69.0
No.18	92.8	76.6
No.19	89.2	73.0
No.20	80.6	79.1
No.21	71.5	65.3
No.22	82.7	66.8
No.24	67.9	86.0
No.25	84.3	81.3
No.26	79.1	85.3
No.27	81.5	79.7
No.28	67.4	86.1
No.29	76.9	82.3
No.30	56.3	61.6



Διάγραμμα 15-Ποσοστιαία μετατροπή γλυκόζης μετά το πέρας της υδρόλυσης για όλα τα υλικά

Εκτός των παραπάνω υλικών εξετάσθηκε και συγκρίθηκε η συμπεριφορά τριών ακόμη υλικών που δεν είχαν υποστεί οξειδωτική προκατεργασία. Το υλικό 1 είχε υποστεί προκατεργασία με μίγμα ακετόνη-νερό σε θερμοκρασία 220 °C για 15 min, το υλικό 2 με νερό στους 170 °C για 180 min και το υλικό 3 με νερό στους 220 °C για 15 min. Οι συνθήκες υδρόλυσης των υλικών ήταν ίδιες με των παραπάνω υδρολύσεων και τα αποτελέσματα παρουσιάζονται στον παρακάτω πίνακα.



Εικόνα 28- Τα δείγματα 1,2,3 μετά το πέρας της υδρόλυσης

Πίνακας 21- Συγκέντρωση ολικών αναγωγικών σακχάρων με την πάροδο του χρόνου

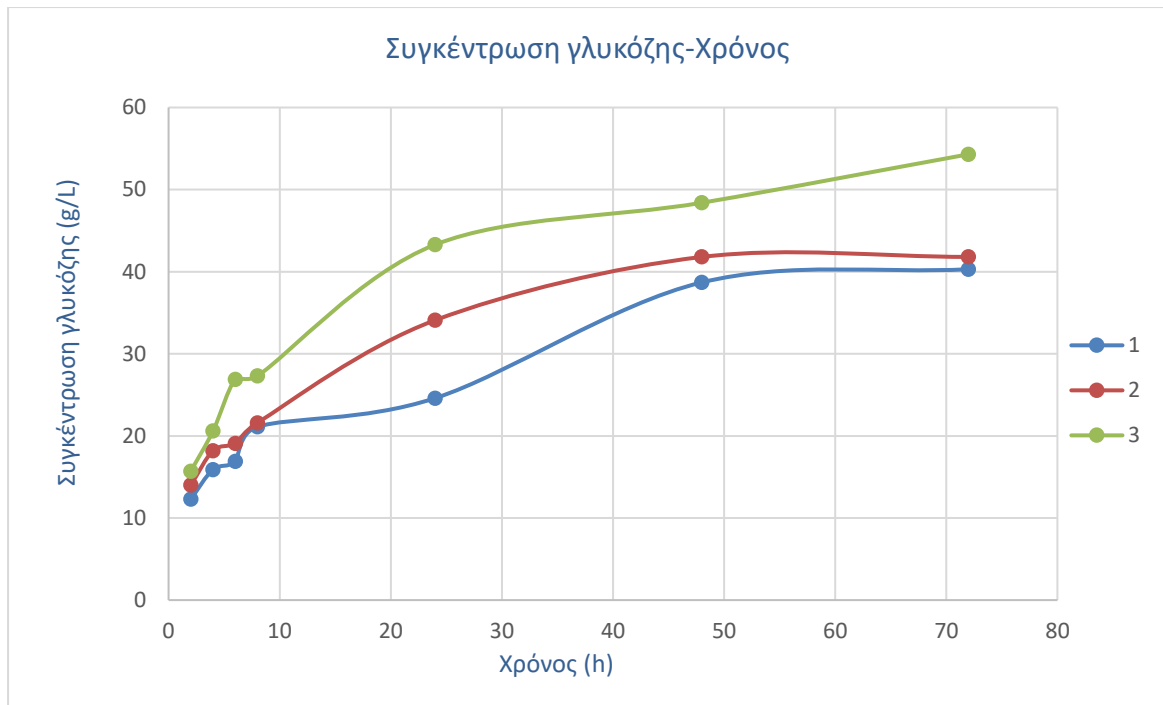
Χρόνος (h)	Συγκέντρωση ολικών αναγωγικών σακχάρων (g/L)		
	1	2	3
2	13.3	16.9	17.8
4	18.0	21.4	24.2
6	20.1	23.6	27.5
8	24.0	24.1	30.7
24	36.7	40.8	44.5
48	43.0	50.6	55.5
72	44.2	53.8	61.0



Διάγραμμα 16-Συγκέντρωση ολικών αναγωγικών σακχάρων με την πάροδο του χρόνου

Πίνακας 22- Συγκέντρωση γλυκόζης με την πάροδο του χρόνου

Χρόνος (h)	Συγκέντρωση γλυκόζης (g/L)		
	1	2	3
2	12.3	14.0	15.7
4	15.9	18.2	20.6
6	16.9	19.1	26.9
8	21.1	21.6	27.3
24	24.6	34.1	43.3
48	38.7	41.8	48.4
72	40.3	41.8	54.3



Διάγραμμα 17-Συγκέντρωση γλυκόζης με την πάροδο του χρόνου

Όπως φαίνεται από τις τιμές της συγκέντρωσης της παραγόμενης γλυκόζης τα τρία αυτά υλικά δεν υδρολύθηκαν σε μεγάλο βαθμό γι' αυτό και δεν πραγματοποιήθηκαν πειράματα ισομερείωσης σε αυτά.

6.4 Υδρόλυση βιομάζας επεξεργασμένης με ξυλανάση

Σε αυτά τα πειράματα υδρόλυσης εξετάστηκαν 3 διαφορετικά δείγματα . Το πρώτο ήταν ακατέργαστο στέλεχος αραβοσίτου που υπήρχε στο εργαστήριο (untreated), το δεύτερο ήταν το ίδιο υλικό αλλά έπειτα από υδροθερμική προκατεργασία με οξικό οξύ 0.3% v/v (pretreated) και το τρίτο ήταν το προκατεργασμένο στέλεχος αραβοσίτου που είχε όμως υποστεί περαιτέρω επεξεργασία με την παραγόμενη στο εργαστήριο ξυλανάση (FoXyn).

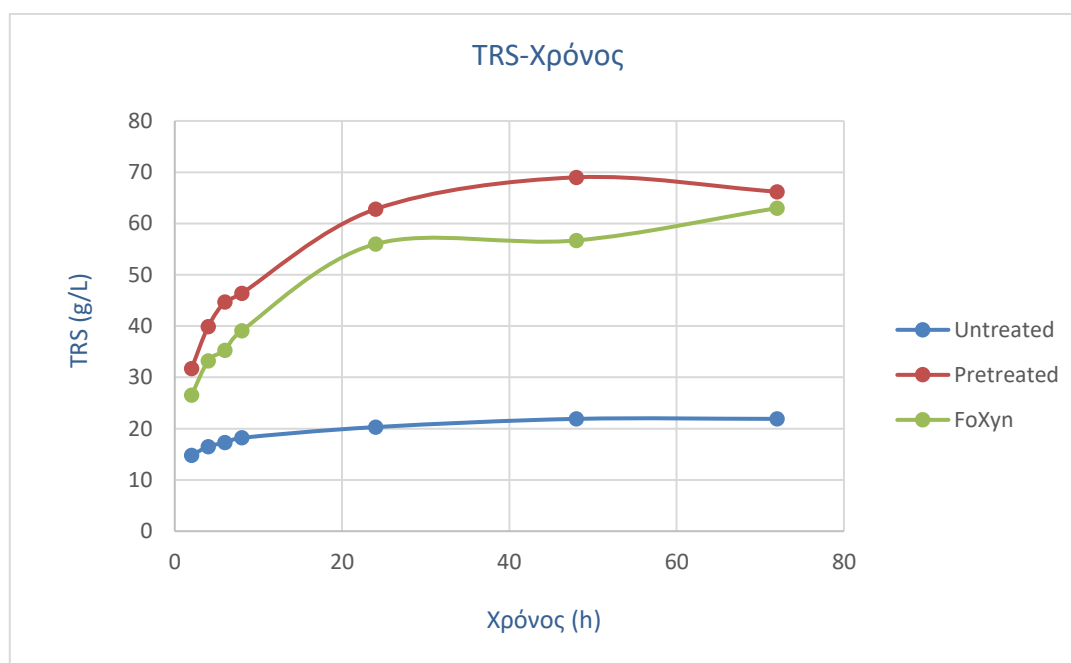
Η προσθήκη ξυλανάσης στο στέλεχος αραβοσίτου υδρολύει την υπάρχουσα ημικυτταρίνη στα μονομερή της. Κατά συνέπεια, μεγαλύτερες περιοχές κυτταρίνης είναι προσβάσιμες από το ένζυμο ώστε να υδρολυθούν σε γλυκόζη αλλά παρατηρείται και αύξηση του ποσοστού κυτταρίνης στην βιομάζα. Συνεπώς, αυτό που αναμένεται είναι η συγκέντρωση της γλυκόζης να είναι μεγαλύτερη στο δείγμα που έχει υποστεί επεξεργασία με την ξυλανάση FoXyn και να ακολουθεί το δείγμα που έχει υποστεί μόνο υδροθερμική προκατεργασία με οξικό οξύ 0.3% v/v, ενώ ελάχιστη παραγωγή γλυκόζης αναμένεται από το ακατέργαστο υλικό.

Οι συνθήκες διεξαγωγής του πειράματος ήταν όπως και στις προηγούμενες υδρολύσεις, θερμοκρασία 50 °C, pH=5.0 σε ανάδευση 180 rpm για 72 h. Σε κάθε δείγμα υπήρχε 1 g της εκάστοτε βιομάζας και 9 mL από το διάλυμα ένζυμο-ρυθμιστικό διάλυμα κιτρικών-φωσφορικών pH=5.0 με ενζυμικό φορτίο 15 mg/g DM.

Τα αποτελέσματα συνοψίζονται στον παρακάτω πίνακα.

Πίνακας 23- Συγκέντρωση ολικών αναγωγικών σακχάρων με την πάροδο του χρόνου

Χρόνος (h)	Συγκέντρωση ολικών αναγωγικών σακχάρων (g/L)		
	Untreated	Pretreated	FoXyn
2	14.8	31.7	26.5
4	16.5	39.9	33.2
6	17.3	44.7	35.3
8	18.2	46.4	39.1
24	20.3	62.8	56.0
48	21.9	69.0	56.7
72	21.9	66.2	63.0



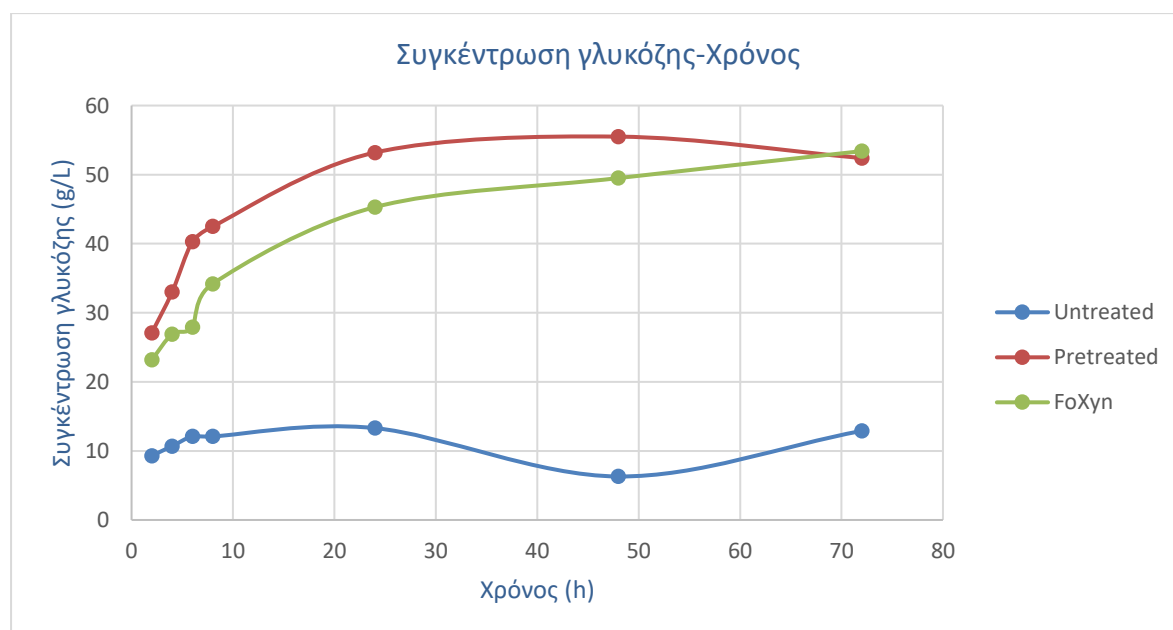
Διάγραμμα 18-Συγκέντρωση ολικών αναγωγικών σακχάρων με την πάροδο του χρόνου

Παρατηρώντας το παραπάνω διάγραμμα φαίνεται πως για δεδομένο δείγμα η συγκέντρωση των ολικών αναγωγικών σακχάρων αυξάνεται με την πάροδο του χρόνου. Επιπλέον, το ακατέργαστο στέλεχος αραβοσίτου είχε, όπως αναμενόταν, την χαμηλότερη παραγωγή σακχάρου. Στο ακατέργαστο υλικό το ποσοστό της κυτταρίνης που είναι διαθέσιμο για υδρόλυση είναι πολύ μικρότερο συγκριτικά με τα

προκατεργασμένα υλικά. Ο κύριος στόχος της υδροθερμικής προκατεργασίας που έγινε στα άλλα δύο δείγματα είναι η απομάκρυνση ενός μέρους της ημικυτταρίνης που αποτελεί φυσικό εμπόδιο για την αποικοδόμηση της κυτταρίνης, προκειμένου να διευκολυνθεί η υδρόλυση. Συνεπώς, η μορφή του παραπάνω διαγράμματος είναι η αναμενόμενη ως προς το ακατέργαστο υλικό. Όσον αφορά τις άλλες δύο καμπύλες από το διάγραμμα, φαίνεται ότι η τελική συγκέντρωση αναγωγικών σακχάρων στο προκατεργασμένο δείγμα είναι ελαφρώς μεγαλύτερη από αυτή του δείγματος προκατεργασμένου με την ξυλανάση. Αυτό ενδεχομένως να συμβαίνει λόγω της φύσης της προκατεργασίας που έχουν υποστεί τα δύο δείγματα. Η υδροθερμική προκατεργασία είναι μια προκατεργασία που κατά κύριο λόγο στοχεύει στην απομάκρυνση της ημικυτταρίνης. Αντίστοιχα, η μέθοδος DNS αποσκοπεί στην ανίχνευση των ολικών αναγωγικών σακχάρων μεταξύ αυτών και των σακχάρων που προέρχονται από την ημικυτταρίνη. Επομένως, αυτή η μικρή διαφορά είναι αποδεκτή στα πλαίσια του σφάλματος ανάμεσα στα δύο υλικά.

Πίνακας 24- Συγκέντρωση γλυκόζης με την πάροδο του χρόνου

Χρόνος (h)	Συγκέντρωση γλυκόζης (g/L)		
	Untreated	Pretreated	FoXyn
2	9.3	27.1	23.2
4	10.7	33.0	26.9
6	12.1	40.3	27.9
8	12.1	42.5	34.2
24	13.3	53.2	45.3
48	6,3	55.5	49.5
72	12.9	52.4	53.4



Διάγραμμα 19-Συγκέντρωση γλυκόζης με την πάροδο του χρόνου

Ομοίως με το διάγραμμα 15, η συγκέντρωση της γλυκόζης για δεδομένο δείγμα αυξάνεται με την πάροδο του χρόνου με το ακατέργαστο στέλεχος αραβοσίτου να εμφανίζει πολύ μικρή παραγωγή γλυκόζης. Αντίστοιχα με πριν, από την καμπύλη του προκατεργασμένου στελέχους αραβοσίτου (Pretreated) παρατηρείται ότι είναι μεγαλύτερη η παραγωγή γλυκόζης σε σχέση με του FoXyn, παρόλο που στις 72 h φαίνεται η καμπύλη του FoXyn να ξεπερνάει του Pretreated και να περιέχει ελάχιστα μεγαλύτερη συγκέντρωση γλυκόζης.

Από τον πίνακα 23 παρατηρούμε ότι η μέγιστη συγκέντρωση γλυκόζης που φθάνουν τα υλικά είναι περίπου 50 g/L. Αυτό θα μεταφραζόταν σε μια αρκετά χαμηλή παραγωγή φρουκτόζης γι' αυτό και σε αυτά τα δείγματα δεν έγιναν τα πειράματα ισομερείωσης.

6.5 Υδρόλυση βιομάζας σε αναμεικτήρα ελεύθερης πτώσης (free-fall mixer)

Οι συνθήκες υδρόλυσης στον αναμεικτήρα ελεύθερης πτώσης αναφέρθηκαν εκτενέστερα στην ενότητα 4.2.6.6. Πραγματοποιήθηκε δειγματοληψία στις 6 και 12 h και μετρήθηκε η παραγόμενη γλυκόζη με τη μέθοδο glucotest, ακριβώς με την ίδια διαδικασία που έγινε στις προηγούμενες υδρολύσεις. Τα αποτελέσματα παρουσιάζονται στον παρακάτω πίνακα.

Πίνακας 25-Συγκέντρωση γλυκόζης από την υδρόλυση στον αναμεικτήρα ελεύθερης πτώσης στις 6 και 12 h

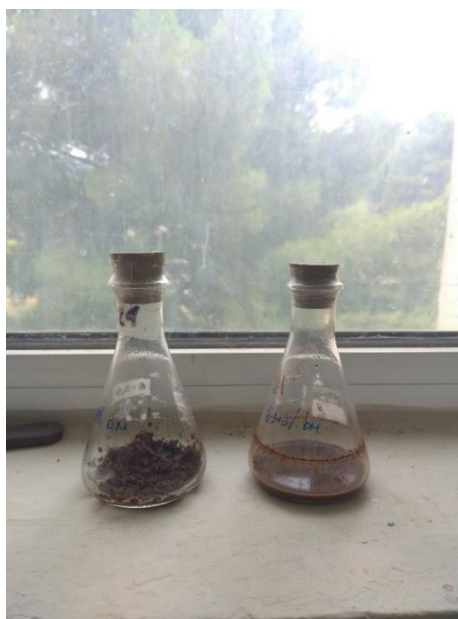
Χρόνος (h)	Συγκέντρωση γλυκόζης (g/L)
6	111.0
12	162.3



Εικόνα 29-Στην αριστερή εικόνα φαίνεται η διάταξη της υδρόλυσης μεγάλης κλίμακας με το υλικό πριν την υδρόλυση και στην δεξιά εικόνα μετά το πέρας 12 h.

6.6 Υδρόλυση βιομάζας με μεταβαλλόμενη τροφοδοσία

Σε αυτή τη σειρά πειραμάτων μελετήθηκε η διαφορά στην παραγωγή της γλυκόζης για 3 διαφορετικές συγκεντρώσεις στερεών (18, 20 και 22 % w/w) όταν από την αρχή της υδρόλυσης ήταν η συγκέντρωση των στερεών 18, 20 και 22 % w/w και όταν ξεκινούσε η υδρόλυση με συγκέντρωση στερεών 6% w/w και σταδιακά έφτανε στις παραπάνω τιμές. Τις πρώτες 6 h στις κωνικές φιάλες με την συγκέντρωση 18, 20 και 22% w/w δεν ήταν εφικτό να γίνει δειγματοληψία και να μετρηθεί η παραγωγή της γλυκόζης ώστε να συγκριθεί με τις άλλες 3 κωνικές φιάλες. Συνεπώς, για τις πρώτες 6 h της υδρόλυσης έγινε ένας ποιοτικός προσδιορισμός με την λήψη εικόνων που δείχνουν πόσο έχει προχωρήσει η υδρόλυση σε κάθε δείγμα.



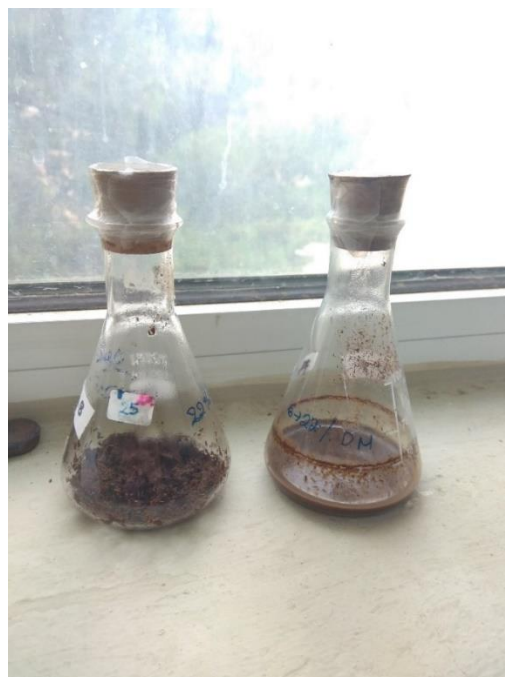
Εικόνα 30-Υδρόλυση βιομάζας για τελική συγκέντρωση στερεών 18% w/w. Επάνω αριστερά είναι στις 2h, επάνω δεξιά στις 4h, κάτω αριστερά στις 6h και κάτω δεξιά στις 8h.

Στις παραπάνω εικόνες γίνεται σύγκριση των κωνικών φιαλών με αρχική συγκέντρωση στερεών 18% w/w (αριστερά) με την κωνική που η συγκέντρωση των στερεών μεταβάλλεται από 6% σε 18% w/w (δεξιά). Όπως φαίνεται, η κωνική φιάλη με την αρχική συγκέντρωση 18% w/w έγινε «ζουμί» στις 6 h ενώ η κωνική με την μικρή συγκέντρωση ήταν από την αρχή της υδρόλυσης. Αναμένεται οι κωνικές φιάλες με τις αρχικές συγκεντρώσεις στερεών 20% w/w και 22% w/w να γίνουν «ζουμί» με πιο αργό ρυθμό, καθώς το ενζυμικό διάλυμα έχει να διαβρέξει μεγαλύτερη ποσότητα βιομάζας.



Εικόνα 31- Υδρόλυση βιομάζας για τελική συγκέντρωση στερεών 20% w/w. Επάνω αριστερά είναι στις 2h, επάνω δεξιά στις 4h, κάτω αριστερά στις 6h και κάτω δεξιά στις 8h.

Στις παραπάνω εικόνες γίνεται σύγκριση των κωνικών φιαλών με αρχική συγκέντρωση στερεών 20% w/w (αριστερά) με την κωνική που η συγκέντρωση των στερεών μεταβάλλεται από 6% σε 20% w/w (δεξιά). Όπως φαίνεται, η κωνική φιάλη με την αρχική συγκέντρωση 20% w/w μέχρι και τις 8 h δεν έχει γίνει τελείως «ζουμί» ενώ η κωνική με την μικρή συγκέντρωση ήταν από την αρχή της υδρόλυσης.



Εικόνα 32-Υδρόλυση βιομάζας για τελική συγκέντρωση στερεών 22% w/w. Επάνω αριστερά είναι στις 2h, επάνω δεξιά στις 4h, κάτω αριστερά στις 6h και κάτω δεξιά στις 8h.

Στις παραπάνω εικόνες γίνεται σύγκριση των κωνικών φιαλών με αρχική συγκέντρωση στερεών 22% w/w (αριστερά) με την κωνική που η συγκέντρωση των στερεών μεταβάλλεται από 6% σε 22% w/w (δεξιά). Όπως φαίνεται, η κωνική φιάλη με την αρχική συγκέντρωση 22% w/w μέχρι και τις 8 h δεν έχει γίνει «ζουμί» ενώ η κωνική με την μικρή συγκέντρωση ήταν από την αρχή της υδρόλυσης. Στη συγκεκριμένη περίπτωση για τις 8 h δεν ήταν εφικτό να γίνει δειγματοληψία από την κωνική με αρχική συγκέντρωση 22% w/w.

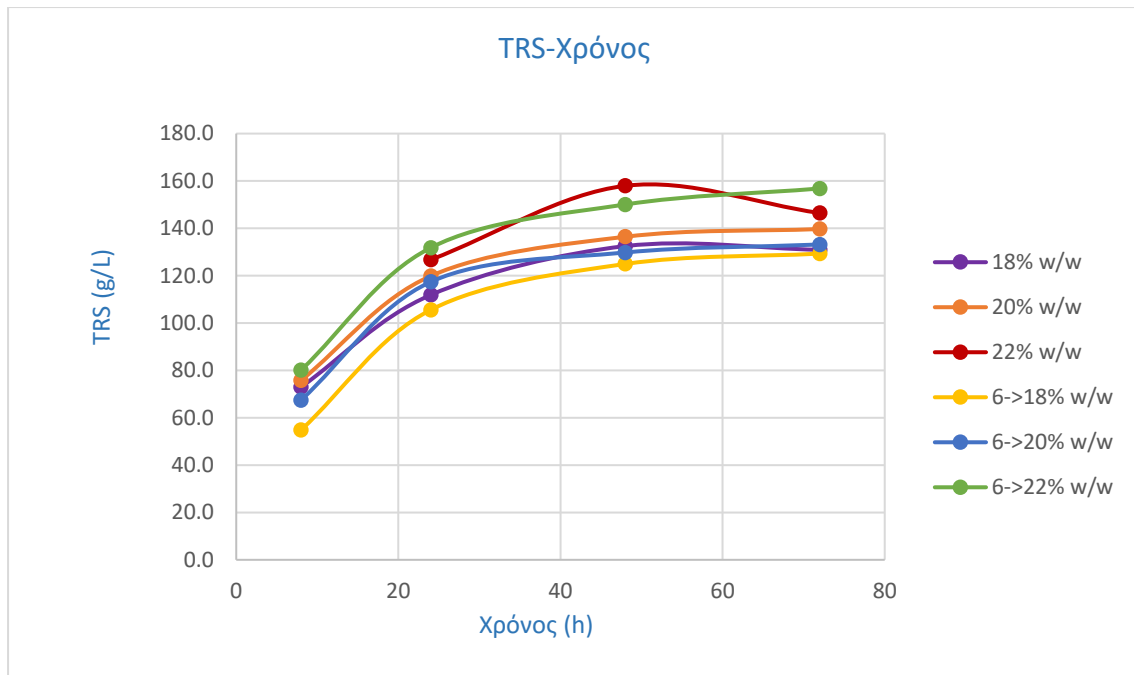


Εικόνα 33-Υδρόλυση βιομάζας στις 24 h. Αριστερά είναι για τελική συγκέντρωση 18% w/w, στη μέση για 20% w/w και δεξιά 22% w/w

Στις 24 h, όπως παρατηρείται και από την Εικόνα 25, οι κωνικές φιάλες με αρχική συγκέντρωση 18 και 20% w/w έχουν υγροποιηθεί πλήρως ενώ η κωνική των 22% w/w είναι κατά κόρον στερεή. Ωστόσο στις 24 h ήταν εφικτό να γίνει δειγματοληψία και από αυτή τη φιάλη για να μετρηθεί η παραγωγή της γλυκόζης (glucotest) και των ολικών αναγωγικών σακχάρων (DNS). Τα αποτελέσματα παρουσιάζονται στον παρακάτω πίνακα.

Πίνακας 26-Συγκέντρωση ολικών αναγωγικών σακχάρων με την πάροδο του χρόνου

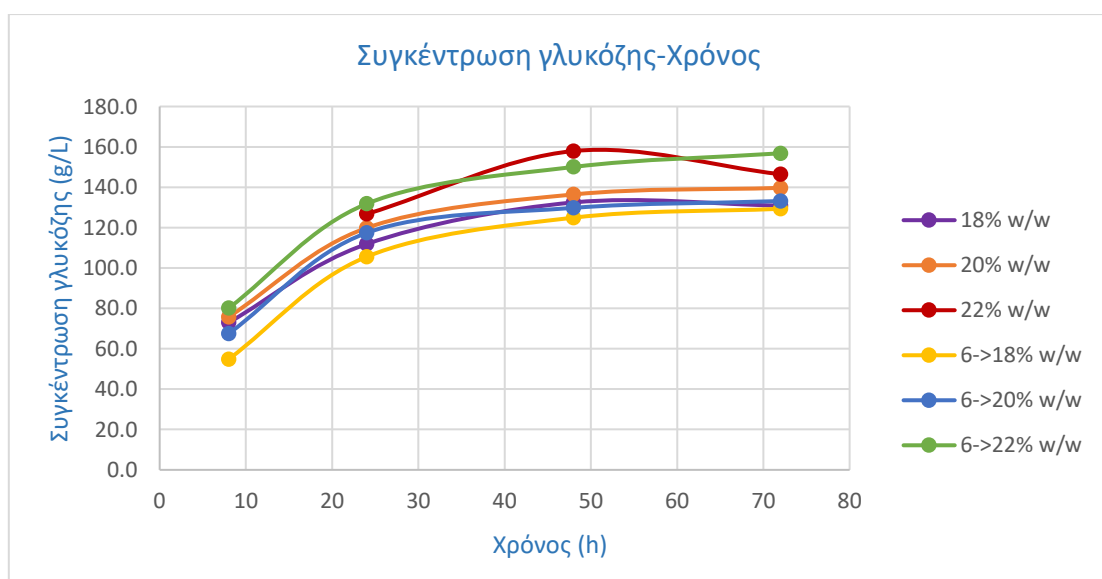
Χρόνος (h)	Συγκέντρωση ολικών αναγωγικών σακχάρων (g/L)					
	18% w/w	20% w/w	22% w/w	6->18% w/w	6->20% w/w	6->22% w/w
8	87.3	88.5	-	68.4	82.3	98.9
24	129.2	138.6	141.9	124.4	133.0	147.7
48	139.9	153.1	167.1	133.6	154.3	179.0
72	148.1	158.9	171.0	161.3	157.7	183.0



Διάγραμμα 20-Συγκέντρωση ολικών αναγωγικών σακχάρων με την πάροδο του χρόνου

Πίνακας 27-Συγκέντρωση γλυκόζης με την πάροδο του χρόνου

Χρόνος (h)	Συγκέντρωση γλυκόζης (g/L)					
	18% w/w	20% w/w	22% w/w	6->18% w/w	6->20% w/w	6->22% w/w
8	73.0	75.8	-	54.8	67.5	80.1
24	111.9	119.9	126.7	105.6	117.4	131.8
48	132.5	136.4	158.0	124.9	129.8	150.1
72	130.9	139.7	146.5	129.3	133.2	156.8



Διάγραμμα 21- Συγκέντρωση γλυκόζης με την πάροδο του χρόνου

Αρχικά, από το παραπάνω διάγραμμα φαίνεται πως για μεγαλύτερη συγκέντρωση στερεών παράγεται περισσότερη γλυκόζη. Αυτό ήταν αναμενόμενο καθώς το ένζυμο έχει περισσότερο υλικό να υδρολύσει. Όσον αφορά την σύγκριση ανάμεσα στα δείγματα που έχουν εξαρχής υψηλή συγκέντρωση και σε αυτά που την αποκτούν σταδιακά, μπορεί κανείς να παρατηρήσει ότι για τις συγκεντρώσεις στερεών 18 και 20% w/w οι τελικές συγκεντρώσεις της γλυκόζης είναι κοντινές τιμές, με τα δείγματα που είχαν εξαρχής την υψηλή συγκέντρωση να έχουν τις μεγαλύτερες τιμές. Για την τελική όμως συγκέντρωση στερεών 22% w/w όταν το υλικό ξεκινάει με μικρότερη συγκέντρωση και σταδιακά καταλήγει στην επιθυμητή, η γλυκόζη που παράγεται είναι κατά 10 g/L μεγαλύτερη. Συνεπώς για υψηλές συγκεντρώσεις στερεών, η παραγωγή της γλυκόζης και κατ'επέκταση η απόδοση της υδρόλυσης είναι μεγαλύτερη όταν η συγκέντρωση των στερεών στην αρχή είναι μικρότερη και σταδιακά, τροφοδοτώντας τις φιάλες με επιπλέον υλικό, αποκτά την επιθυμητή τιμή.

Κεφάλαιο 7: Ισομερείωση παραγόμενης γλυκόζης προς φρουκτόζη

Σε όλα τα παραπάνω υλικά που έγινε ενζυμική υδρόλυση ακολούθησε ισομερείωση τους ώστε η παραγόμενη γλυκόζη στις 72 h να μετατραπεί σε φρουκτόζη, που ήταν και ο στόχος της παρούσας διπλωματικής.

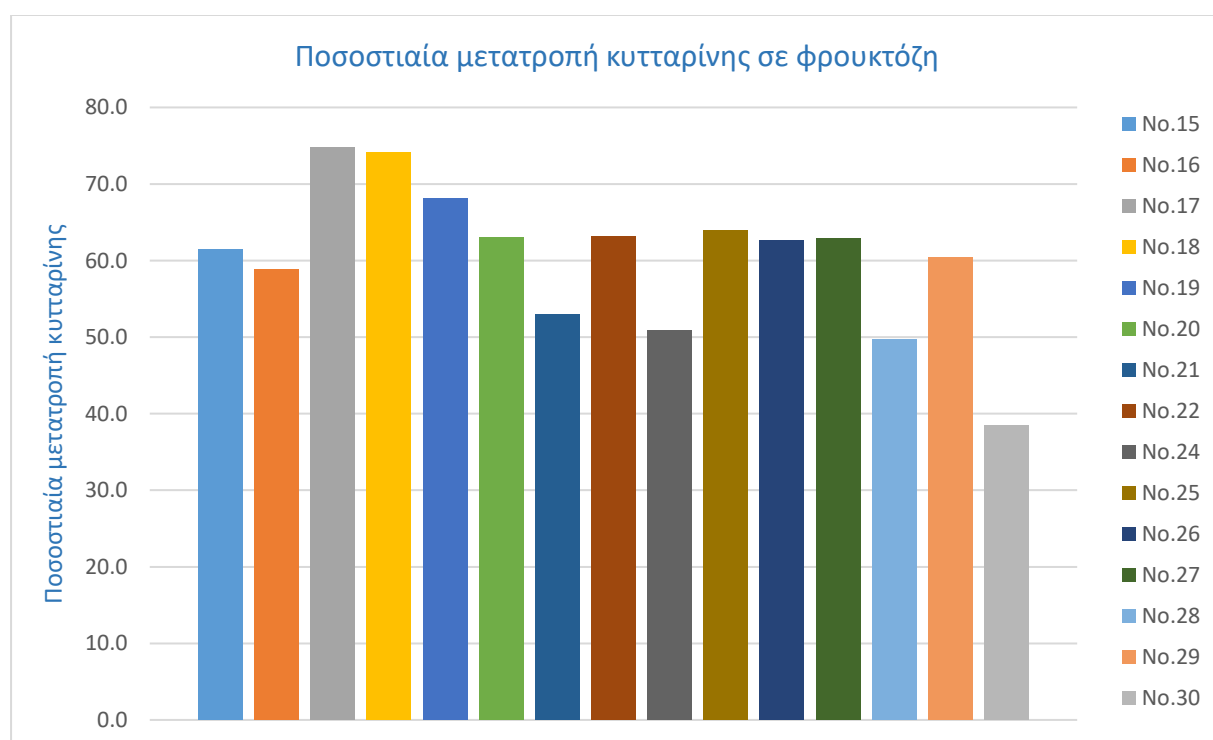
Όπως αναφέρθηκε και στην παράγραφο 4.2.9, μετά το πέρας της υδρόλυσης μετρήθηκε η περιεχόμενη γλυκόζη στα δείγματα των 72 h με τη μέθοδο glucotest και υπολογίσθηκε η ποσότητα γλυκόζης στον όγκο του εκάστοτε υπερκείμενου. Έπειτα, έγινε προσθήκη τετραβορικού νατρίου ($\text{Na}_2\text{B}_4\text{O}_7 \cdot 10\text{H}_2\text{O}$) για μετατόπιση της αντίδρασης της ισομερείωσης προς την κατεύθυνση της φρουκτόζης. Σε κάθε δείγμα προστέθηκε η μισή ποσότητα από την περιεχόμενη γλυκόζη και επειδή τα πειράματα της ισομερείωσης απαιτούν $\text{pH}=7$, έγινε εξισορρόπηση του pH των διαλυμάτων ώστε να φτάσει στο επιθυμητό, με προσθήκη διαλύματος καυστικού νατρίου (NaOH) 0,1 M. Από κάθε δείγμα συλλέχθηκε 1 mL και μαζί με 50 mg ακινητοποιημένου ενζύμου sweetzyme εισάχθηκαν σε Eppendorf των 2 mL ώστε να επωαστούν για 24 h στους 50°C σε 900 rpm.

Για την εύρεση της συγκέντρωσης της παραγόμενης φρουκτόζης, μετά το πέρας της ισομερείωσης όλα τα δείγματα αραιώθηκαν κατάλληλα, ώστε η απορρόφηση τους να βρίσκεται στο γραμμικό τμήμα της καμπύλης αναφοράς και στη συνέχεια μετρήθηκε η εναπομείνουσα συγκέντρωση γλυκόζης με τη μέθοδο glucotest. Με αυτόν τον τρόπο είναι γνωστή η συγκέντρωση πριν και μετά την ισομερείωση και η παραγόμενη φρουκτόζη μπορεί να υπολογισθεί βάση της κατανάλωσης της γλυκόζης. Τα αποτελέσματα συνοψίζονται στους παρακάτω πίνακες για την κάθε σειρά ισομερειώσεων.

7.1 Ισομερείωση των 16 υλικών διαφορετικής περιεκτικότητας σε κυτταρίνη

Πίνακας 28-Συγκέντρωση γλυκόζης πριν και μετά το πέρας της ισομερείωσης και ποσοστιαία μετατροπή κυτταρίνης σε φρουκτόζη

Υλικό	Γλυκόζης πριν την ισομερείωση (g/L)	Γλυκόζης μετά την ισομερείωση (g/L)	Ποσοστό κυτταρίνης (%)	Ποσοστιαία μετατροπή κυτταρίνης σε φρουκτόζη (%)
No.15	59.9	12.7	62.2	61.5
No.16	55.4	14.2	56.8	58.8
No.17	79.5	15.8	69.0	74.8
No.18	87.8	17.7	76.6	74.1
No.19	80.3	19.0	73.0	68.1
No.20	78.7	17.2	79.1	63.0
No.21	57.6	14.9	65.3	53.0
No.22	68.2	16.1	66.8	63.2
No.24	72.0	18.0	86.0	50.9
No.25	84.6	20.4	81.3	64.0
No.26	83.3	17.4	85.3	62.6
No.27	80.2	18.3	79.7	62.9
No.28	71.6	18.8	86.1	49.6
No.29	78.1	16.7	82.3	60.4
No.30	42.8	13.6	61.6	38.3



Διάγραμμα 22-Ποσοστιαία μετατροπή κυτταρίνης σε φρουκτόζη

7.2 Ισομερείωση του υλικού που υδρολύθηκε σε αναμεικτήρα ελεύθερης πτώσης (free-fall mixer)

Για την ισομερείωση αυτού του υλικού ακολουθήθηκε η ίδια διεργασία με παραπάνω. Μετρήθηκε η συγκέντρωση της γλυκόζης μετά το πέρας της υδρόλυσης και μετά το πέρας της ισομερείωσης αλλά και η γλυκόζη μετά την εξισορρόπηση του pH στην τιμή 7.0. Οι προηγούμενες υδρολύσεις, που ήταν μικρής κλίμακας, όταν γινόταν εξισορρόπηση του pH του διαλύματος προσθέτοντας σταγόνες διαλύματος καυστικού νατρίου (NaOH) συγκέντρωσης 1 M, το διάλυμα δεν αραιωνόταν σε μεγάλο βαθμό. Συνεπώς, οι απώλειες στη συγκέντρωση της γλυκόζης θεωρούνταν αμελητέες. Στη συγκεκριμένη περίπτωση όμως, πως η συγκέντρωση της γλυκόζης από 162.3 g/L που ήταν μετά το πέρας της υδρόλυσης έγινε 150.5 g/L μετά την εξισορρόπηση. Συνεπώς, ως συγκέντρωση γλυκόζης πριν την ισομερείωση θα θεωρηθεί η συγκέντρωση μετά την εξισορρόπηση του pH.

Πίνακας 29- Συγκέντρωση γλυκόζης πριν και μετά το πέρας της ισομερείωσης για την υδρόλυση σε αναμεικτήρα ελεύθερης πτώσης (free-fall mixer)

Υλικό	Cγλυκόζης πριν την ισομερείωση (g/L)	Cγλυκόζης μετά την ισομερείωση (g/L)	Ποσοστιαία μετατροπή κυτταρίνης σε γλυκόζη (%)	Ποσοστιαία μετατροπή κυτταρίνης σε φρουκτόζη (%)
No.25	150.5	24.1	71.9	60.4

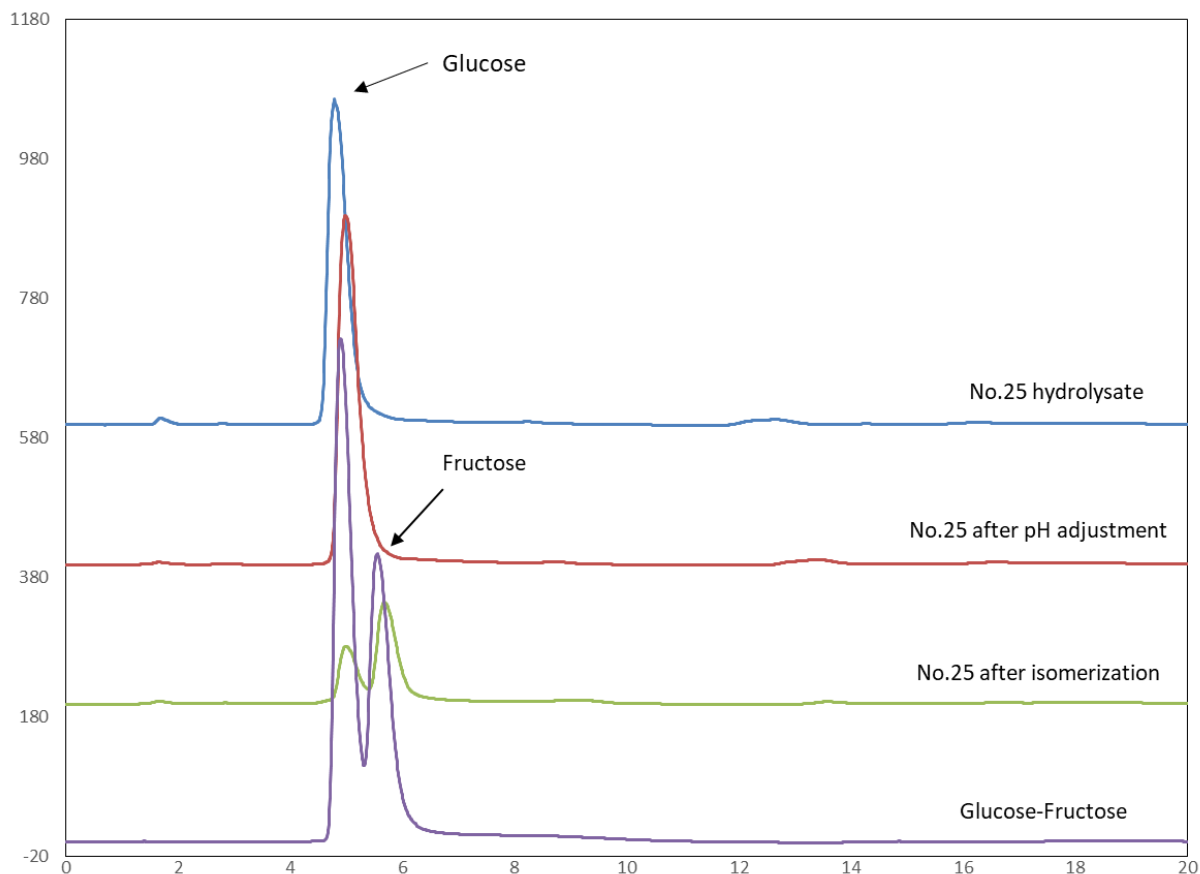
Από τον Πίνακα 30 παρατηρείται πως η συγκέντρωση της γλυκόζης μετά την ισομερείωση έχει μειωθεί σε μεγάλο βαθμό που ήταν και το επιθυμητό, καθώς μπορεί να θεωρηθεί ότι έχει μετατραπεί σε φρουκτόζη. Αυτό το συμπέρασμα επαληθεύεται και από την ανίχνευση της ουσίας με τη μέθοδο χρωματογραφίας εναλλαγής ανιόντων υψηλής απόδοσης (HPLC) που αναφέρεται στο Κεφάλαιο 8.

Κεφάλαιο 8: Ποιοτικός προσδιορισμός της παραγόμενης φρουκτόζης με την μέθοδο χρωματογραφίας εναλλαγής ανιόντων υψηλής απόδοσης (HPLC)

Για να ευρεθεί αν η ισομερείωση που έλαβε χώρα ήταν επιτυχής, δηλαδή αν η περιεχόμενη γλυκόζη μετατράπηκε σε φρουκτόζη, χρησιμοποιήθηκε η μέθοδος χρωματογραφίας εναλλαγής ανιόντων υψηλής απόδοσης (HPLC). Ο προσδιορισμός της φρουκτόζης είναι ποιοτικός απλώς ανιχνεύεται η ύπαρξη της ουσίας στο διάλυμα, δεν υπολογίσθηκε η συγκέντρωσή της.

Για την ανίχνευση της φρουκτόζης ετοιμάστηκε ένα διάλυμα γλυκόζης-φρουκτόζης συγκέντρωσης 0.2 g/L, κατόπιν αραιώσης 1:50, που αποτελούσε το δείγμα αναφοράς για τα εξεταζόμενα διαλύματα. Η ανίχνευση της φρουκτόζης έγινε για το υλικό No.25 που θεωρήθηκε το καλύτερο από τα υλικά που συγκρίθηκαν στην παραπάνω ενότητα. Έτσι, τα δείγματα που έγινε ο προσδιορισμός των ουσιών που περιέχουν ήταν το διάλυμα του υλικού No.25 μετά το πέρας της υδρόλυσης (25-72 h), το διάλυμα του υλικού No.25 μετά από την εξισορρόπηση του pH στην τιμή 7.0, που απαιτεί το πείραμα της ισομερείωσης και τέλος το διάλυμα του υλικού No.25 μετά το πέρας της ισομερείωσης, στο οποίο αναμένεται να ανιχνευτεί και η παραγόμενη φρουκτόζη.

Στο παρακάτω χρωματογράφημα παρουσιάζονται τα αποτελέσματα που προέκυψαν από την μέθοδο χρωματογραφίας εναλλαγής ανιόντων υψηλής απόδοσης (HPLC).



Διάγραμμα 23-Χρωματογράφημα πρότυπου δείγματος που περιέχει γλυκόζη-φρουκτόζη συγκέντρωσης 0.2 mg/mL και τριών δειγμάτων του υλικού No.25 σε διαφορετικές φάσεις

Παρατηρώντας το χρωματογράφημα, η κίτρινη γραμμή απευθύνεται στο διάλυμα αναφοράς και η πρώτη κορυφή που συναντάται είναι της γλυκόζης ενώ η αμέσως επόμενη κορυφή είναι της φρουκτόζης. Από τους χρόνους κατακράτησης των ουσιών, παρατηρείται πως στα δείγματα του υλικού No.25 μετά το πέρας της υδρόλυσης και μετά την εξισορρόπηση του pH=7.0 ανιχνεύεται μόνο γλυκόζη και στο δείγμα μετά το πέρας της ισομερείωσης ανιχνεύεται γλυκόζη και φρουκτόζη. Από το παραπάνω χρωματογράφημα φαίνεται πως η ισομερείωση της γλυκόζης σε φρουκτόζη που έγινε στα δείγματα ήταν επιτυχής αφού ανιχνεύθηκε η ουσία στο δείγμα.

Κεφάλαιο 9: Συζήτηση των αποτελεσμάτων και μελλοντικές προκλήσεις

Συνοψίζοντας όλα τα παραπάνω, βρέθηκε πως οι βέλτιστες συνθήκες υδρόλυσης της λιγνινοκυτταρινούχου βιομάζας είναι 10% w/w συγκέντρωση στερεών και 15 mg/g DM ενζυμικό φορτίο. Όσον αφορά τα υλικά διαφορετικής περιεκτικότητας κυτταρίνης, φαίνεται πως τα υλικά που είχαν υποστεί υδροθερμική προκατεργασία με 0.3% v/v οξικό οξύ (CH_3COOH) και προκατεργασία με μίγμα ακετόνη-νερό σε θερμοκρασία 220 °C για 15 min, με νερό στους 170 °C για 180 min και με νερό στους 220 °C για 15 min δεν υδρολύθηκαν σε μεγάλο βαθμό, το οποίο θα μπορούσε να αποδοθεί στον τύπο προκατεργασίας που είχαν υποβληθεί. Τέλος, αν και θα μπορούσε να θεωρηθεί πως τα υλικά No.17 και No.18, με προκατεργασία νερό-THF στους 160 °C και νερό-ακετόνη στους 160 °C αντίστοιχα, είναι τα καλύτερα λόγω της ποσοστιαίας μετατροπής της κυτταρίνης σε φρουκτόζη, η κυτταρίνη που περιέχουν είναι λιγότερη συγκριτικά με το υλικό No.25, που έχει υποστεί προκατεργασία με νερό-αιθανόλη στους 175 °C, και η μετατροπή του σε φρουκτόζη είναι αρκετά ικανοποιητική (64%). Γι'αυτό και το υλικό No.25 επιλέχθηκε για το πείραμα της υδρόλυσης σε μεγάλη κλίμακα.

Μέχρι στιγμής η βιβλιογραφία αναφέρει την χρήση καθαρών πηγών για την παραγωγή φουρανίων από σάκχαρα. Οι W. Wang et al. που έκαναν πειράματα ισομερείωσης σε υδρόλυμα λιγνινοκυτταρινούχου βιομάζας ανέφεραν μια μετατροπή της τάξης του 70% της φρουκτόζης από γλυκόζη, ενώ στην παρούσα διπλωματική το αντίστοιχο ποσοστό μετατροπής ήταν 76%. Ο συγκεκριμένος κλάδος αποτελεί ένα καινοτόμο πεδίο ερευνών, γεγονός που πιστοποιείται και από τον ελάχιστο αριθμό δημοσιεύσεων.

Σε συνέχεια της παραπάνω εργασίας θα μπορούσαν να χρησιμοποιηθούν διαφορετικές προκατεργασίες και να μελετηθεί η παραγωγή φουρανίων από αυτές. Ακόμα τον τελευταίο καιρό πληθαίνει η βιβλιογραφία που χρησιμοποιεί ένζυμα σαν βιοκαταλύτες για την παραγωγή πολυμερών από ανανεώσιμες πηγές. Επομένως, θα ήταν αρκετά ενδιαφέρουσα μια μελέτη ως προς τα ένζυμα που καταλύουν τα παραγόμενα φουράνια καθώς και η μελέτη μιας συνολικής διεργασίας παραγωγής πολυμερών από λιγνινοκυτταρινούχο βιομάζα.

Βιβλιογραφία

- Aachary, Ayyappan Appukuttan, and Siddalingaiya Gurudutt Prapulla. 2008. "Corncob-Induced Endo-1,4-β-D-Xylanase of *Aspergillus Oryzae* MTCC 5154: Production and Characterization of Xylobiose from Glucuronoxylan." *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 56(11): 3981–88.
- Alvira, P., E. Tomás-Pejó, M. Ballesteros, and M. J. Negro. 2010. "Pretreatment Technologies for an Efficient Bioethanol Production Process Based on Enzymatic Hydrolysis: A Review." *Bioresource Technology* 101(13): 4851–61. <http://dx.doi.org/10.1016/j.biortech.2009.11.093>.
- Antrim, Richard L., William Colilla, and Bern J. Schnyder. 1979. 2 Applied Biochemistry and Bioengineering *Glucose Isomerase Production of High-Fructose Syrups*. ACADEMIC PRESS, INC. <http://dx.doi.org/10.1016/B978-0-12-041102-3.50010-9>.
- Balamurugan, V., G. R. Reddy, and V. V.S. Suryanarayana. 2007. "Pichia Pastoris: A Notable Heterologous Expression System for the Production of Foreign Proteins - Vaccines." *Indian Journal of Biotechnology* 6(2): 175–86.
- Barakat, Abdellatif et al. 2014. "Mechanical Pretreatments of Lignocellulosic Biomass: Towards Facile and Environmentally Sound Technologies for Biofuels Production." *RSC Advances* 4(89): 48109–27. <http://dx.doi.org/10.1039/C4RA07568D>.
- De Bhowmick, Goldy, Ajit K. Sarmah, and Ramkrishna Sen. 2018. "Lignocellulosic Biorefinery as a Model for Sustainable Development of Biofuels and Value Added Products." *Bioresource Technology* 247: 1144–54. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2017.09.163>.
- Bułkowska, Katarzyna, and Ewa Klimiuk. 2016. "Pretreatment of Lignocellulosic Biomass." *Biomass for Biofuels*: 121–53.
- Delidovich, Irina et al. 2016. "Alternative Monomers Based on Lignocellulose and Their Use for Polymer Production." *Chemical Reviews* 116(3): 1540–99.
- Van Dyk, J. S., and B. I. Pletschke. 2012. "A Review of Lignocellulose Bioconversion Using Enzymatic Hydrolysis and Synergistic Cooperation between Enzymes-Factors Affecting Enzymes, Conversion and Synergy." *Biotechnology Advances* 30(6): 1458–80. <http://dx.doi.org/10.1016/j.biotechadv.2012.03.002>.
- Emami Bistgani, Zohreh et al. 2017. "Interactive Effects of Drought Stress and Chitosan Application on Physiological Characteristics and Essential Oil Yield of *Thymus Daenensis* Celak." *Crop Journal* 5(5): 407–15.
- Garriga, Marisa, Melisa Almaraz, and Alicia Marchiaro. 2017. "Determination of Reducing Sugars in Extracts of *Undaria Pinnatifida* (Harvey) Algae by UV-Visible Spectrophotometry (DNS Method)." *Actas de Ingeniería* 3: 173–79. <http://fundacioniai.org/actas>.

- Gorbanev, Yury Y. et al. 2009. "Gold-Catalyzed Aerobic Oxidation of 5-Hydroxymethylfurfural in Water at Ambient Temperature." *ChemSusChem* 2(7): 672–75.
- Huang, Renliang, Wei Qi, Rongxin Su, and Zhimin He. 2010. "Integrating Enzymatic and Acid Catalysis to Convert Glucose into 5-Hydroxymethylfurfural." *Chemical Communications* 46(7): 1115–17.
- Imaizumi, Katsumi et al. 1991. "Effects of Xylooligosaccharides on Blood Glucose, Serum and Liver Lipids and-Cecum Short-Chain Fatty Acids in Diabetic Rats." *Agricultural and Biological Chemistry* 55(1): 199–205.
- Kazi, Feroz Kabir et al. 2011. "Techno-Economic Analysis of Dimethylfuran (DMF) and Hydroxymethylfurfural (HMF) Production from Pure Fructose in Catalytic Processes." *Chemical Engineering Journal*.
- Kumar, Parveen, Diane M. Barrett, Michael J. Delwiche, and Pieter Stroeve. 2009. "Methods for Pretreatment of Lignocellulosic Biomass for Efficient Hydrolysis and Biofuel Production." *Industrial and Engineering Chemistry Research* 48(8): 3713–29.
- Kumar, Vikash, and T. Satyanarayana. 2011. "Applicability of Thermo-Alkali-Stable and Cellulase-Free Xylanase from a Novel Thermo-Halo-Alkaliphilic *Bacillus Halodurans* in Producing Xylooligosaccharides." *Biotechnology Letters* 33(11): 2279–85.
- Limayem, Alya, and Steven C. Ricke. 2012. "Lignocellulosic Biomass for Bioethanol Production: Current Perspectives, Potential Issues and Future Prospects." *Progress in Energy and Combustion Science* 38(4): 449–67. <http://dx.doi.org/10.1016/j.pecs.2012.03.002>.
- Manuscript, Accepted et al. "RSC Advances."
- Marianou, A. A. et al. 2018. "Effect of Lewis and Brønsted Acidity on Glucose Conversion to 5-HMF and Lactic Acid in Aqueous and Organic Media." *Applied Catalysis A: General* 555(November 2017): 75–87. <https://doi.org/10.1016/j.apcata.2018.01.029>.
- Moreau, Claude, Mohamed Naceur Belgacem, and Alessandro Gandini. 2004. "Recent Catalytic Advances in the Chemistry of Substituted Furans from Carbohydrates and in the Ensuing Polymers." *Topics in Catalysis* 27(1–4): 11–30.
- Saini, Jitendra Kumar, Reetu Saini, and Lakshmi Tewari. 2015. "Lignocellulosic Agriculture Wastes as Biomass Feedstocks for Second-Generation Bioethanol Production: Concepts and Recent Developments." *3 Biotech* 5(4): 337–53. <http://dx.doi.org/10.1007/s13205-014-0246-5>.
- Samanta, A. K. et al. 2015. "Xylooligosaccharides as Prebiotics from Agricultural By-Products: Production and Applications." *Bioactive Carbohydrates and Dietary Fibre* 5(1): 62–71. <http://dx.doi.org/10.1016/j.bcdf.2014.12.003>.
- Saritha, M., Anju Arora, and Lata. 2012. "Biological Pretreatment of Lignocellulosic Substrates for Enhanced Delignification and Enzymatic Digestibility." *Indian*

Journal of Microbiology 52(2): 122–30.

Schuler L. Michael, K. F. (1992). *Bioprocess engineering*. Englewood Cliffs, N.J. : Prentice Hall,.

Singh, Ramkrishna D., Jhumur Banerjee, and Amit Arora. 2015. "Prebiotic Potential of Oligosaccharides: A Focus on Xylan Derived Oligosaccharides." *Bioactive Carbohydrates and Dietary Fibre* 5(1): 19–30. <http://dx.doi.org/10.1016/j.bcdf.2014.11.003>.

Sousa, Andreia F. et al. 2015. "Biobased Polyesters and Other Polymers from 2,5-Furandicarboxylic Acid: A Tribute to Furan Excellency." *Polymer Chemistry* 6(33): 5961–83.

Srinivasan, Narayanan, and Lu Kwang Ju. 2010. "Pretreatment of Guayule Biomass Using Supercritical Carbon Dioxide-Based Method." *Bioresource Technology* 101(24): 9785–91. <http://dx.doi.org/10.1016/j.biortech.2010.07.069>.

Taha, Mohamed et al. 2016. "Commercial Feasibility of Lignocellulose Biodegradation: Possibilities and Challenges." *Current Opinion in Biotechnology* 38: 190–97. <http://dx.doi.org/10.1016/j.copbio.2016.02.012>.

Terrett, Oliver M., and Paul Dupree. 2019. "Covalent Interactions between Lignin and Hemicelluloses in Plant Secondary Cell Walls." *Current Opinion in Biotechnology* 56: 97–104. <https://doi.org/10.1016/j.copbio.2018.10.010>.

Thomas, Stuart M., Robert DiCosimo, and Vasantha Nagarajan. 2002. "Biocatalysis: Applications and Potentials for the Chemical Industry." *Trends in Biotechnology* 20(6): 238–42.

Tong, Xinli, Yang Ma, and Yongdan Li. 2010. "Biomass into Chemicals: Conversion of Sugars to Furan Derivatives by Catalytic Processes." *Applied Catalysis A: General* 385(1–2): 1–13. <http://dx.doi.org/10.1016/j.apcata.2010.06.049>.

Wang, Jianjian et al. 2014. "Efficient Catalytic Conversion of Lignocellulosic Biomass into Renewable Liquid Biofuels via Furan Derivatives." *RSC Advances* 4(59): 31101–7. <http://dx.doi.org/10.1039/C4RA04900D>.

Wang, Wei et al. 2019. "Simultaneous Upgrading of Biomass-Derived Sugars to HMF/Furfural via Enzymatically Isomerized Ketose Intermediates." *Biotechnology for Biofuels* 12(1): 1–9. <https://doi.org/10.1186/s13068-019-1595-4>.

Werpy, T., and G. Petersen. 2004. "Top Value Added Chemicals from Biomass: Volume I -- Results of Screening for Potential Candidates from Sugars and Synthesis Gas. Office of Scientific and Technical Information (OSTI)." *Office of Scientific and Technical Information*: 69. <http://oai.dtic.mil/oai/oai?verb=getRecord&metadataPrefix=html&identifier=ADA436528>.

Zabed, H., J. N. Sahu, A. N. Boyce, and G. Faruq. 2016. "Fuel Ethanol Production from Lignocellulosic Biomass: An Overview on Feedstocks and Technological

Approaches.” *Renewable and Sustainable Energy Reviews* 66: 751–74.
<http://dx.doi.org/10.1016/j.rser.2016.08.038>.

Zhao, Xuebing, Keke Cheng, and Dehua Liu. 2009. “Organosolv Pretreatment of Lignocellulosic Biomass for Enzymatic Hydrolysis.” *Applied Microbiology and Biotechnology* 82(5): 815–27.

Zhao, Yuanyuan et al. 2019. “Advances in Imaging Plant Cell Walls.” *Trends in Plant Science*: 1–12. <https://doi.org/10.1016/j.tplants.2019.05.009>.

Zheng, Yizhou et al. 1995. “Supercritical Carbon Dioxide Explosion as a Pretreatment for Cellulose Hydrolysis.” *Biotechnology Letters* 17(8): 845–50.

Χριστακόπουλος, Παύλος. *Βιοτεχνολογική Παραγωγή Βιοκαυσίμων*.