



ΕΘΝΙΚΟ ΜΕΤΣΟΒΙΟ ΠΟΛΥΤΕΧΝΕΙΟ

ΣΧΟΛΗ ΧΗΜΙΚΩΝ ΜΗΧΑΝΙΚΩΝ

ΤΟΜΕΑΣ ΣΥΝΘΕΣΗΣ ΚΑΙ ΑΝΑΠΤΥΞΗΣ  
ΒΙΟΜΗΧΑΝΙΚΩΝ ΔΙΑΔΙΚΑΣΙΩΝ

## ΔΙΠΛΩΜΑΤΙΚΗ ΕΡΓΑΣΙΑ

---

*Αξιοποίηση υγρού κλάσματος  
προκατεργασίας λιγνοκυτταρινούχου  
βιομάζας προς την παραγωγή  
ολιγοσακχαριτών με πρεβιοτική δράση*

Θεόδωρος Αθανασόπουλος

*Επιβλέπων καθηγητής:*

*Ευάγγελος Τόπακας,  
Αναπληρωτής καθηγητής Ε.Μ.Π.*

*Αθήνα, 2020*

---



# Ευχαριστίες

Η παρούσα διπλωματική εργασία εκπονήθηκε στο εργαστήριο Βιοτεχνολογίας του τμήματος των Χημικών Μηχανικών του Εθνικού Μετσόβιου Πολυτεχνείου και θα ήθελα να ευχαριστήσω όλους όσους συνέβαλαν στην πραγματοποίησή της.

Καταρχάς, θα ήθελα να ευχαριστήσω τον κ. Ευάγγελο Τόπακα, αναπληρωτή καθηγητή του τμήματος των Χημικών Μηχανικών, που μου έδωσε την ευκαιρία να εκπονήσω τη διπλωματική μου εργασία υπό την επίβλεψή του στο εργαστήριο Βιοτεχνολογίας.

Έπειτα, θα ήθελα να ευχαριστήσω τη διδάκτορα Ανθή Καρναούρη για την καθοδήγησή της καθ' όλη τη διάρκεια της εργασίας. Οι γνώσεις της υπήρξαν πολύτιμες για την ολοκλήρωσή της, αλλά και για την επίλυση τυχόν αποριών που προέκυψαν στην πορεία.

Πολλά ευχαριστώ θα ήθελα, επίσης, να δώσω στην υποψήφια διδάκτορα Γεωργία Ασημακοπούλου με την οποία συνεργαζόμουν σε καθημερινή βάση. Χάρη στη βοήθειά της και στην εργαστηριακή της πείρα, εξοικειώθηκα με τον χώρο και τον εξοπλισμό του εργαστηρίου και κατάφερα να εκτελέσω με επιτυχία τα πειράματα που ήταν απαραίτητα για την εκπόνηση αυτής της εργασίας.

Τέλος, θα ήθελα να ευχαριστήσω όλα τα μέλη του εργαστηρίου για την ευγένειά τους και για την προθυμία τους να με βοηθήσουν όποτε το χρειαζόμουν.

Θοδωρής Αθανασόπουλος,

Αθήνα 2020

## Περίληψη

Η λιγνοκυτταρινούχος βιομάζα αποτελεί την πιο άφθονη και ανανεώσιμη πηγή άνθρακα στον πλανήτη. Τα βασικά συστατικά της είναι η κυτταρίνη, η ημικυτταρίνη και η λιγνίνη, με τις ποσότητές τους να ποικίλουν ανάλογα με την προέλευσή της. Η κυτταρίνη αποτελείται από μόρια γλυκόζης, ενώ η ημικυτταρίνη από ένα μίγμα εξοζών και πεντοζών. Σημαντικά βήματα έχουν γίνει για την αξιοποίηση της λιγνοκυτταρινούχου βιομάζας προς την παραγωγή βιοκαυσίμων, κυρίως αιθανόλης, και διάφορων προϊόντων προστιθέμενης αξίας από ζυμωτικούς μικροοργανισμούς, οι οποίοι μεταβολίζουν τα σάκχαρα που έχουν προκύψει από την ενζυμική υδρόλυση της κυτταρίνης και της ημικυτταρίνης. Τελευταία, μελετάται η εκμετάλλευση τόσο του στερεού, όσο και του υγρού κλάσματος της προκατεργασίας, για την παραγωγή πρεβιοτικών ουσιών που συμβάλλουν στην ανάπτυξη ευεργετικών μικροοργανισμών του εντέρου. Ωστόσο, λόγω της πολύπλοκης δομής της λιγνοκυτταρινούχου βιομάζας, πρέπει να προηγηθεί προκατεργασία της, ώστε να επιτευχθεί αποδοτική κλασματοποίησή της στα τρία βασικά συστατικά. Μεταξύ των διαφόρων μεθόδων προκατεργασίας, η οργανολυτική προκατεργασία, δηλαδή η προκατεργασία με χρήση οργανικών διαλυτών, κατέχει ιδιαίτερη θέση, αφού διαχωρίζει αποτελεσματικά τα βασικά συστατικά της λιγνοκυτταρινούχου βιομάζας, ενώ παράγονται μικρές ποσότητες τοξικών παρεμποδιστών.

Σκοπός της παρούσας διπλωματικής εργασίας είναι η αξιολόγηση του υγρού κλάσματος που έχει προκύψει από την οργανολυτική προκατεργασία λιγνοκυτταρινούχου βιομάζας για την παρουσία ολιγοσακχαριτών με πιθανή πρεβιοτική δράση. Σε μια εποχή που η υγεία αποτελεί προτεραιότητα για την πλειονότητα των ανθρώπων, η εκμετάλλευση της άφθονης και φθηνής λιγνοκυτταρινούχου βιομάζας για την παραγωγή πρεβιοτικών ουσιών έχει μεγάλη σημασία.

Στα πλαίσια της παρούσας εργασίας, αξιολογήθηκαν οι συνθήκες της οργανολυτικής προκατεργασίας ξύλων οξιάς και πεύκου, δηλαδή η χρήση διαφορετικών οργανικών διαλυτών, πιέσεων, θερμοκρασιών και χρόνων αντίδρασης, ως προς τα συστατικά του υγρού κλάσματος. Πιο συγκεκριμένα, προσδιορίστηκε η ποσότητα των μονοσακχαριτών και των ολιγοσακχαριτών, ενώ το υγρό κλάσμα ελέγχθηκε για την παρουσία φαινολικών ενώσεων, οξικού οξέος και ουρονικών οξέων. Η προκατεργασία ξύλου οξιάς για 120 λεπτά με τη χρήση μίγματος τετραϋδροφουρανίου/νερού αναλογίας 1:1, σε θερμοκρασία 150 °C και σε πίεση 16 bar O<sub>2</sub>, οδήγησε στην απελευθέρωση της υψηλότερης ποσότητας ολιγοσακχαριτών στο υγρό κλάσμα, ίσης με 97.8 mg/g αρχικής βιομάζας. Στα δείγματα πεύκου, η υψηλότερη ποσότητα προέκυψε από την προκατεργασία για

120 λεπτά με τη χρήση μίγματος αιθανόλης/νερού αναλογίας 1:1, σε θερμοκρασία 175 °C και σε πίεση 16 bar O<sub>2</sub> και είναι ίση με 60.9 mg/g αρχικής βιομάζας.

Στο υγρό κλάσμα που προέκυψε από την προκατεργασία ξύλου οξιάς με αιθανόλη, επιχειρήθηκε επιπλέον ενζυμική τροποποίηση με ξυλανάση (EC 3.2.1.8) της οικογένειας GH30 των γλυκοζυλ-υδρολασών για μείωση του βαθμού πολυμερισμού των περιεχόμενων ολιγοσακχαριτών, ώστε σε επόμενη φάση να χρησιμοποιηθούν για πρεβιοτικά τεστ σε προβιοτικά βακτήρια. Η δράση του ενζύμου οδήγησε στη μείωση των ολιγοσακχαριτών με βαθμό πολυμερισμού από 2 έως 6 μονάδες ξυλόζης και στη σημαντική αύξηση της συγκέντρωσης της ξυλοβιόζης μετά τις πρώτες δύο ώρες αντίδρασης.

# Abstract

Lignocellulosic biomass is the most abundant and renewable carbon source on the planet. Its main components are cellulose, hemicellulose and lignin, with their amount varying depending on its main source. Cellulose consists of glucose monomers, while hemicellulose sugars comprise of a mixture of hexoses and pentoses. Significant progress has been made towards the utilization of lignocellulosic biomass for the production of biofuels, mostly ethanol, and many added value products from fermenting microorganisms, which are able to metabolize the monomeric sugars from the enzymatic hydrolysis of cellulose and hemicellulose. Recent studies focus on utilization of pretreatment liquid fraction of lignocellulosic biomass for the isolation of prebiotic substances that promote the growth of beneficial gut microbiota. However, due to lignocellulosic biomass' complex structure, a pretreatment step is required in order to achieve efficient fractionation. Among the various pretreatment methods, organosolv pretreatment, that is pretreatment using organic solvents, gathers a lot of interest, since it's able to efficiently separate the main components of lignocellulosic biomass while producing minimum amounts of toxic inhibitors.

The main purpose of this diploma thesis is to evaluate the liquid fraction of the organosolv pretreatment for the presence of prebiotic oligosaccharides. At a time when health is a priority for most people, utilization of the abundant and cheap lignocellulosic biomass for the production of prebiotic oligosaccharides is of great importance.

In the context of this thesis, the conditions of the organosolv pretreatment of beech wood and pine wood, i.e. the use of different organic solvents, pressure, temperature and reaction time, were evaluated in terms of the components of the liquid fraction. More specifically, monosaccharide and oligosaccharide amounts as well as oligosaccharides' degree of polymerization were determined, along with the concentration of phenolic substances, acetic acid and glucuronic acid. Beech wood pretreatment that was carried out using a tetrahydrofurane and water mixture in a ratio of 1:1 for 120 minutes at a temperature of 150 °C under a pressure of 16 bar O<sub>2</sub>, led to maximum oligosaccharide production equal to 97.8 mg/g of initial biomass. Among pine wood samples, the highest oligosaccharide yield is equal to 60.9 mg/g of initial biomass and it was achieved using an ethanol and water mixture in a ratio of 1:1 for 120 minutes at a temperature of 175 °C under a pressure of 16 bar O<sub>2</sub>.

Subsequently, xylanase GH30 enzymes (EC 3.2.1.8) were used in the liquid fraction that resulted from beech wood ethanol pretreatment to reduce the oligosaccharides' degree of polymerization so they can be used for prebiotic tests in

probiotic bacteria. The enzymatic reaction reduced xylotriose, xylotetraose, xylopentaose and xylohexaose concentrations, while significantly increasing xylobiose concentration after the first two hours.

# Περιεχόμενα

<b>1</b>	<b>ΘΕΩΡΗΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ.....</b>	<b>9</b>
1.1	Εισαγωγή .....	9
1.2	Βιομάζα .....	9
1.2.1	Λιγνοκυτταρινούχος βιομάζα .....	10
1.2.1.1	Δομή.....	10
1.2.1.1.1	Κυτταρίνη .....	11
1.2.1.1.2	Ημικυτταρίνη .....	11
1.2.1.1.3	Λιγνίνη .....	12
1.2.1.2	Πλατύφυλλα και κωνοφόρα .....	13
1.3	Αξιοποίηση της λιγνοκυτταρινούχου βιομάζας.....	14
1.3.1	Βιοκαύσιμα .....	14
1.3.2	Χημικά και άλλα προϊόντα που προέρχονται από τη βιομάζα .....	14
1.3.3	Αξιοποίηση λιγνοκυτταρινούχου βιομάζας στα πλαίσια ενός βιοδιυλιστηρίου .....	15
1.3.3.1	Παραγωγή προϊόντων σε διαφορετικά στάδια .....	17
1.4	Προκατεργασία λιγνοκυτταρινούχου βιομάζας.....	17
1.4.1	Φυσικές μέθοδοι.....	18
1.4.2	Φυσικοχημικές μέθοδοι.....	19
1.4.3	Βιολογικές μέθοδοι.....	20
1.4.4	Χημικές μέθοδοι .....	20
1.4.4.1	Οργανολυτική προκατεργασία (Organosolv) .....	21
1.4.4.1.2	Ήπια οργανολυτική οξείδωση .....	25
1.4.4.1.3	Κλάσματα οργανολυτικής προκατεργασίας .....	26
1.4.4.1.4	Υγρό κλάσμα οργανολυτικής προκατεργασίας .....	26
1.5	Ολιγοσακχαρίτες με πρεβιοτική δράση .....	28
1.5.1	Είδη πρεβιοτικών .....	29
1.5.1.2	Ολιγοσακχαρίτες από λιγνοκυτταρινούχο βιομάζα .....	30
1.5.1.2.1	Ολιγοσακχαρίτες κυτταρίνης (cello-oligosaccharides, COS) .....	30
1.5.1.2.2	Ολιγοσακχαρίτες ημικυτταρίνης .....	30
1.5.2	Τρόπος δράσης πρεβιοτικών .....	32
1.6	Προβιοτικά .....	33
1.6.1	Λακτοβάκιλλοι .....	33
1.6.2	Μπιφιδοβακτήρια .....	34
<b>2</b>	<b>ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ .....</b>	<b>36</b>
2.1	Υλικά.....	36
2.1.1	Συσκευές – Όργανα.....	36
2.1.2	Χημικά αντιδραστήρια – Εργαστηριακά υλικά .....	37
2.1.3	Διαλύτες – Διαλύματα .....	37
2.1.4	Κιτ ανάλυσης γλυκουρονικού οξέος .....	37



2.1.5 Ένζυμο .....	37
2.1.6 Υγρά κλάσματα οργανολυτικής προκατεργασίας.....	38
<b>2.2 Μέθοδοι .....</b>	<b>39</b>
2.2.1 Απομάκρυνση οργανικού διαλύτη.....	39
2.2.2 Αποτοξικοποίηση υγρών κλασμάτων με ενεργό άνθρακα.....	39
2.2.3 Παρουσία ολιγοσακχαριτών στο υγρό κλάσμα προκατεργασίας .....	40
2.2.4 Ανάλυση σύστασης κλάσματος ολιγοσακχαριτών .....	41
2.2.5 Προσδιορισμός ποσότητας γλυκουρονικού οξέος .....	42
2.2.6 Ανίχνευση σακχάρων και οξικού οξέος .....	43
2.2.7 Ανίχνευση φαινολικών ενώσεων στα υγρά κλάσματα .....	45
2.2.8 Ενζυμική υδρόλυση.....	45
<b>3 ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ.....</b>	<b>47</b>
<b>3.1 Φαινολικές ενώσεις .....</b>	<b>48</b>
<b>3.2 Ανίχνευση ολιγοσακχαριτών .....</b>	<b>49</b>
<b>3.3 Είδος σακχάρων σε κάθε υπόστρωμα.....</b>	<b>50</b>
<b>3.4 Ποσότητα ολιγοσακχαριτών από διαφορετικές συνθήκες προκατεργασίας .....</b>	<b>53</b>
3.4.1 Επίδραση του οργανικού διαλύτη στην ανάκτηση ολιγοσακχαριτών.....	53
3.4.2 Επίδραση της θερμοκρασίας στην ανάκτηση ολιγοσακχαριτών.....	57
3.4.3 Σύγκριση ήπιας οργανολυτικής οξειδωσης με την κλασσική οργανολυτική προκατεργασία παρουσία όξινου καταλύτη .....	60
3.4.4 Επίδραση πίεσης οξυγόνου (O <sub>2</sub> ) στην ανάκτηση ολιγοσακχαριτών.....	62
<b>3.5 Υποκαταστάτες ολιγοσακχαριτών .....</b>	<b>63</b>
3.5.1 Ανίχνευση ακετυλοϋποκαταστατών μέσω της ανίχνευσης οξικού οξέος .....	64
3.5.2 Ανίχνευση ουρονικών οξέων .....	65
<b>3.6 Ενζυμική υδρόλυση .....</b>	<b>66</b>
<b>4 ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ ΚΑΙ ΣΥΖΗΤΗΣΗ.....</b>	<b>68</b>
<b>4.1 Παράμετροι ήπιας οργανολυτικής οξειδωσης .....</b>	<b>68</b>
4.1.1 Οξιά .....	68
4.1.2 Πεύκο .....	69
4.1.3 Παραγωγή σακχάρων σε άλλες μελέτες .....	69
<b>4.2 Αποτελεσματικότητα ενζυμικής υδρόλυσης .....</b>	<b>70</b>
<b>4.3 Μελλοντικοί στόχοι .....</b>	<b>71</b>
<b>5 ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ.....</b>	<b>72</b>

# 1 Θεωρητικό μέρος

---

## 1.1 Εισαγωγή

Η διατροφή αποτελεί έναν από τους σημαντικότερους παράγοντες που παίζουν ρόλο στην εμφάνιση ασθενειών και γενικότερα στην ευεξία του ανθρώπου. Τελευταία, το ενδιαφέρον του κόσμου έχει στραφεί στα λειτουργικά φαγητά, όπως είναι για παράδειγμα οι ξηροί καρποί ή τα προϊόντα ολικής άλεσης, τα συστατικά των οποίων έχει αποδειχθεί ότι δρουν ευεργετικά σε πληθώρα ασθενειών (Hong et al., 2019). Η ανακάλυψη της τεράστιας σημασίας που έχει η συμβίωση της μικροχλωρίδας του εντέρου (προκαρυωτικοί μικροοργανισμοί όπως τα βακτήρια) με το ίδιο το έντερο στην ανθρώπινη υγεία, οδήγησε στη δημιουργία της έννοιας των πρεβιοτικών, δηλαδή συστατικών τροφίμων που διεγείρουν την ανάπτυξη και τη δραστηριότητα συγκεκριμένων βακτηρίων του εντέρου βελτιώνοντας, έτσι, την υγεία του ξενιστή (Gibson & Roberfroid, 1995). Εμφανίστηκε, λοιπόν, η ανάγκη για την παραγωγή τέτοιων συστατικών.

Το ενδιαφέρον της επιστημονικής κοινότητας έχουν κεντρίσει οι ολιγοσακχαρίτες που προκύπτουν από την επεξεργασία της λιγνοκυτταρινούχου βιομάζας, του μεγαλύτερου ποσοστού της βιομάζας του πλανήτη. Η βιομάζα στο σύνολό της, έχει ήδη τραβήξει πολλή προσοχή ως εναλλακτική, φθηνή και βιώσιμη πηγή ενέργειας με ελάχιστες περιβαλλοντικές συνέπειες (Isikgor & Becer, 2015). Ειδικότερα, η αξιοποίηση της λιγνοκυτταρινούχου βιομάζας που προέρχεται από αγροτικά, βιομηχανικά ή δασικά υπολείμματα συμβάλλει τόσο στην αποτελεσματική χρήση αυτών των υπολειμμάτων όσο και στη μείωση του κόστους πρώτων υλών (Gowdhaman & Ronnusami, 2015). Επομένως, η επεξεργασία αυτής της άφθονης, φθηνής και βιοανανεώσιμης πηγής άνθρακα για την παραγωγή προϊόντων προστιθέμενης αξίας όπως είναι οι ξυλοολιγοσακχαρίτες, αποτελεί μια ιδιαίτερα ελκυστική προσέγγιση.

## 1.2 Βιομάζα

Βιομάζα είναι το υλικό που παράγεται βιολογικά από την ανάπτυξη μικροοργανισμών, φυτών ή ζώων (Nagel et al., 2007). Αποτελείται κυρίως από άνθρακα, υδρογόνο και οξυγόνο, ενώ εκτιμάται ότι η ετήσια παραγωγή της ξεπερνά τους 170 δισεκατομμύρια τόνους ξηρού υλικού. Προέρχεται από κατάλοιπα επεξεργασίας ξύλου, δασικά και γεωργικά κατάλοιπα, ενεργειακά φυτά, άγλη, αστικά και βιομηχανικά απόβλητα (Energy.gov, 2019) και μπορεί να υποστεί, μεταξύ άλλων, τις εξής μετατροπές:

- **Θερμική:** Η βιομάζα θερμαίνεται και αξιοποιείται ως καύσιμο σε θερμικές διεργασίες όπως είναι η καύση, η πυρόλυση και η αεριοποίηση (Akhtar et al., 2018).
- **Χημική:** Η βιομάζα μετατρέπεται σε ένα καύσιμο που είναι ευκολότερο στη χρήση, μεταφορά και αποθήκευση από ότι στην αρχική της μορφή.
- **Βιοχημική:** Σε αυτό το είδος μετατροπής, οι πρωτεργάτες είναι μικροοργανισμοί που χρησιμοποιούνται για την κομποστοποίηση, ζύμωση και αναερόβια χώνευση της βιομάζας.
- **Ηλεκτροχημική:** Η βιομάζα υπόκειται σε ηλεκτροχημική οξείδωση για την παραγωγή ηλεκτρικής ενέργειας.

## 1.2.1 Λιγνοκυτταρινούχος βιομάζα

Η λιγνοκυτταρινούχος βιομάζα είναι η πιο άφθονη και παγκοσμίως διαθέσιμη πηγή άνθρακα σήμερα. Από τη συνολική παραγωγή της φυτικής βιομάζας στον πλανήτη, η οποία αποτελεί το 90% της λιγνοκυτταρινούχου βιομάζας, μόλις το 10% αξιοποιείται επαρκώς (Saini et al., 2015). Οι τρεις βασικές πηγές της είναι τα δασικά κατάλοιπα, τα αγροτικά κατάλοιπα και τα αστικά στερεά απόβλητα. Στα δασικά κατάλοιπα περιλαμβάνονται κυρίως παραπροϊόντα δασοκομίας, όπως πριονίδια και κλαδιά νεκρών δέντρων, ενώ στα αγροτικά κατάλοιπα η λιγνοκυτταρινούχος βιομάζα προέρχεται κατά κύριο λόγο από καλλιέργειες καλαμποκιού, ρυζιού, σιταριού και ζαχαροκάλαμου, αλλά και από ενεργειακές καλλιέργειες ευκαλύπτου, καλαμιού, κυτταρινούχου σόργου κ.α. (Al-Battashi et al., 2019). Στα αστικά στερεά απόβλητα, βρίσκεται στα υπολείμματα φαγητού και χαρτιού, όμως η αξιοποίησή τους είναι δύσκολη λόγω των διακυμάνσεων στη σύστασή τους και της παρουσίας μολυσματικών παραγόντων (Zabed et al., 2016).

Συγκριτικά με άλλα είδη βιομάζας, η λιγνοκυτταρινούχος βιομάζα παρουσιάζει σημαντικά πλεονεκτήματα. Επειδή προέρχεται από μη εδώδιμα κατάλοιπα καλλιέργειών και δασών, όχι μόνο είναι άφθονη και φθηνή, αλλά και δεν απαιτείται διάθεση χώρου για την παραγωγή της. Έτσι, η παραγωγή γεωργικών προϊόντων θα παραμείνει ανεπηρέαστη. Επίσης, η εναπόθεση των τεράστιων ποσοτήτων της είτε στο έδαφος είτε σε χώρους υγειονομικής ταφής έχει σοβαρές περιβαλλοντικές συνέπειες, οι οποίες θα περιοριστούν σημαντικά με την αξιοποίησή της για την παραγωγή προϊόντων προστιθέμενης αξίας (Taherzadeh & Karimi, 2008).

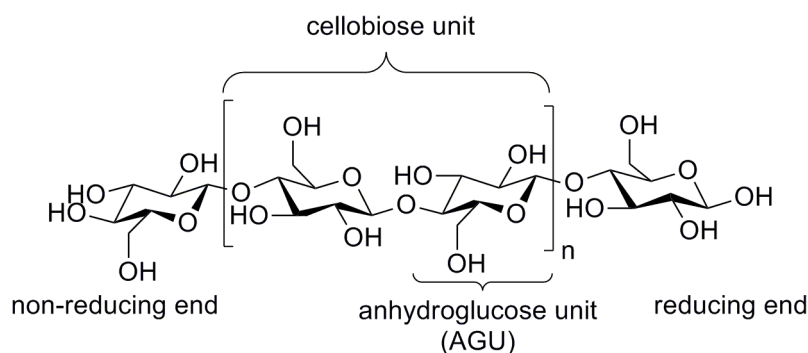
### 1.2.1.1 Δομή

Τα κύρια συστατικά των κυτταρικών τοιχωμάτων των φυτών περιγράφονται στο σύνολό τους από τον όρο λιγνοκυτταρίνη και είναι η κυτταρίνη, η ημικυτταρίνη και η λιγνίνη. Ανάλογα με το είδος του φυτού, την ηλικία του και τις συνθήκες κάτω από τις οποίες αναπτύσσεται, η σύσταση της λιγνοκυτταρίνης είναι διαφορετική. Σε

γενικές γραμμές, αποτελείται από 35-50% κυτταρίνη, 20-35% ημικυτταρίνη και 10-25% λιγνίνη. Σε σημαντικά μικρότερες ποσότητες υπάρχουν ακετυλομάδες, μεταλλικά στοιχεία και φαινολικοί υποκαταστάτες (Saha, 2005). Η κρυσταλλικότητα της κυτταρίνης και η ενθυλάκωσή της από το πλέγμα κυτταρίνης-ημικυτταρίνης, καθώς και η υδροφοβικότητα της λιγνίνης, προσδίδουν στη λιγνοκυτταρίνη αντοχή και ανθεκτικότητα δυσκολεύοντας τον αποπολυμερισμό της (Isikgor & Becer, 2015).

### 1.2.1.1.1 Κυτταρίνη

Η κυτταρίνη είναι το βασικότερο συστατικό των κυτταρικών τοιχωμάτων και το πιο άφθονο οργανικό πολυμερές στον πλανήτη. Η αλυσίδα της είναι γραμμική και αποτελείται από μονάδες D-γλυκόζης συνδεδεμένες με β-1,4 γλυκοζυτικό δεσμό. Έτσι, η δομική μονάδα της κυτταρίνης δεν είναι η γλυκόζη, αλλά ο δισακχαρίτης κελλοβιόζη που μπορεί να επαναλαμβάνεται από εκατοντάδες έως χιλιάδες φορές (Holtzapfle, 2003a). Η κυτταρίνη παρουσιάζεται με τη μορφή μικροϊνιδίων και είναι υπεύθυνη για την ακαμψία του κυτταρικού τοιχώματος των φυτών εξαιτίας των κρυσταλλικών περιοχών που σχηματίζει λόγω των δεσμών υδρογόνου μεταξύ των μορίων γλυκόζης της ίδιας αλυσίδας, διαφορετικών αλυσίδων ή ακόμα και διαφορετικών παράλληλων επιπέδων. Ωστόσο, ανάμεσα στις κρυσταλλικές περιοχές παρεμβάλλονται και άμορφες περιοχές με αποτέλεσμα ο βαθμός κρυσταλλικότητας των πρώτων να φτάνει το 40-50% στα φυτά (Klemm et al., 2005).



Εικόνα 1: Δομή της κυτταρίνης (Olsson & Westm, 2013)

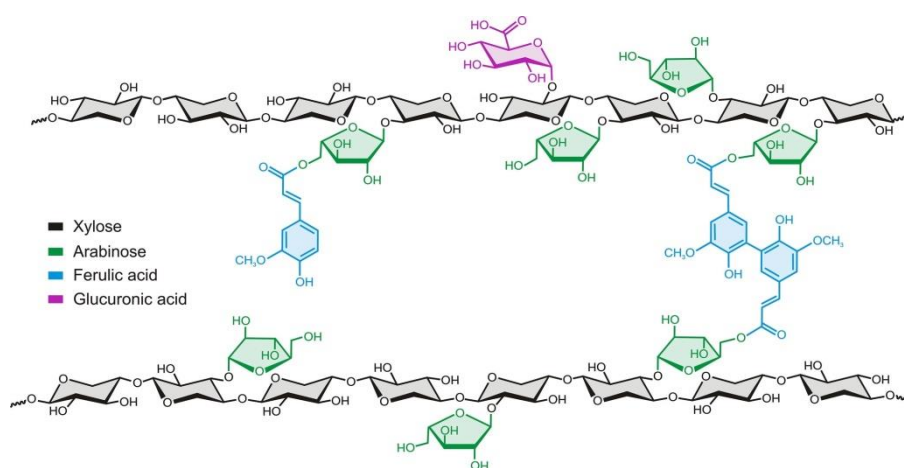
### 1.2.1.1.2 Ημικυτταρίνη

Ο όρος ημικυτταρίνη αναφέρεται στην ουσία στο μίγμα των συμπολυμερών ουσιών που μαζί με την κυτταρίνη και τη λιγνίνη οικοδομούν το κυτταρικό τοίχωμα των φυτών. Οι πολυσακχαρίτες της, αποτελούνται από μονάδες πεντοζών και εξοζών, αλλά και από ουρονικά οξέα όπως το γλυκουρονικό και το γαλακτουρονικό οξύ. Στις πεντόζες ανήκει η ξυλόζη και η αραβινόζη και στις εξόζες η γλυκόζη, η μαννόζη και η γαλακτόζη. Σε αντίθεση με την κυτταρίνη, η ημικυτταρίνη είναι άμορφη και έχει χαμηλό βαθμό πολυμερισμού. Η διάκριση μεταξύ των ημικυτταρινών βασίζεται στο μονοσάκχαρο που βρίσκεται σε μεγαλύτερη ποσότητα. Έτσι, κατηγοριοποιούνται σε

ξυλάνες, γλυκάνες, μαννάνες, αραβινάνες και γαλακτάνες. Συνήθως, όμως, τα μονοσάκχαρα που υπερτερούν σε κάθε ημικυτταρίνη είναι πάνω από ένα. Γι' αυτό και οι ημικυτταρίνες διακρίνονται, επίσης, σε γλυκομαννάνες (γλυκόζη και μαννόζη), αραβινοξυλάνες (αραβινόζη και ξυλόζη), ξυλογλυκάνες (ξυλόζη και γλυκόζη), γαλακτομαννάνες (γαλακτόζη και μαννόζη), γλυκουρονοξυλάνες (γλυκόζη, ξυλόζη και γλυκουρονικό οξύ) (Ur-Rehman et al., 2015). Στα κατάλοιπα καλλιεργειών και στα πλατύφυλλα ξύλα (hardwoods), όπως το ξύλο οξιάς και σημύδας, η ημικυτταρίνη περιέχει κυρίως ξυλογλυκάνη, ενώ στα κωνοφόρα ξύλα (softwoods), όπως το πεύκο και το έλατο, περιέχει κυρίως γλυκομαννάνη (Persson et al., 2006). Επίσης, τα πλατύφυλλα έχουν μεγαλύτερη ποσότητα ημικυτταρίνης (30±5%) σε σύγκριση με τα κωνοφόρα ξύλα (27±2%) (Wang, 2008).

## Ξυλάνη

Από τις ημικυτταρίνες, η ξυλάνη είναι η πιο άφθονη. Ανάλογα με την προέλευσή της η δομή της ποικίλλει από μια απλή γραμμική αλυσίδα χωρίς σχεδόν καθόλου υποκαταστάτες μέχρι ένα πολύπλοκο σύμπλεγμα πολυσακχαριτών με πολλαπλές διακλαδώσεις. Η κεντρική της αλυσίδα αποτελείται από ξυλόζες συνδεδεμένες με β-1,4-γλυκοζιτικούς δεσμούς. Στις περισσότερες ξυλάνες, αυτή η αλυσίδα διαθέτει πληθώρα υποκαταστατών. Τέτοιοι είναι το γλυκουρονικό και το μεθυλγλυκουρονικό οξύ, οι ακετυλομάδες και η αραβινόζη, η οποία μπορεί να είναι εστεροποιημένη με π-κουμαρικό ή φερουλικό οξύ (Bobleter, 1994). Με βάση τους υποκαταστάτες της κεντρικής αλυσίδας, οι ξυλάνες διακρίνονται σε ομοξυλάνες, γλυκουρονοξυλάνες, αραβινοξυλάνες και γλυκουρονοαραβινοξυλάνες (Ur-Rehman et al., 2015).

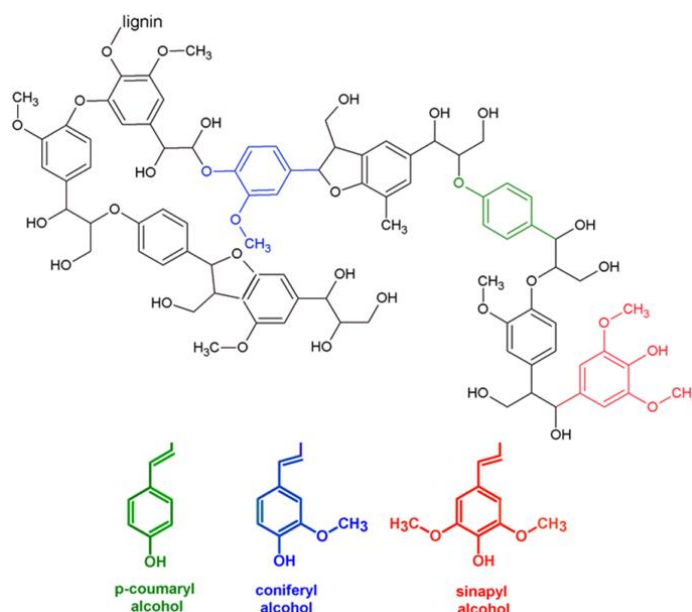


Εικόνα 2: Σχηματική αναπαράσταση της δομής της αραβινοξυλάνης (Oliveira et al., 2019)

### 1.2.1.1.3 Λιγνίνη

Η λιγνίνη είναι ένα άμορφο, υδρόφοβο και πολύπλοκο τρισδιάστατο πολυμερές με υψηλό βαθμό πολυμερισμού. Συγκροτείται από τρεις διαφορετικούς τύπους

φαινυλοπροπανίων, την *p*-κουμαρυλική αλκοόλη, την κονιφερυλική αλκοόλη και την σιναπυλική αλκοόλη οι οποίοι στο πολυμερές της λιγνίνης βρίσκονται με τις μορφές της *π*-υδροξυφαινυλικής μονάδας (H), γουαϊκυλικής μονάδας (G) και συρινγκυλικής μονάδας (S) αντίστοιχα. Ο ρόλος της είναι να προσδίδει αντοχή στην κάμψη, θλίψη και κρούση στο κυτταρικό τοίχωμα των φυτών και να το προστατεύει από τα παθογόνα και τα έντομα (Rubin, 2008).



Εικόνα 3: Σχηματική απεικόνιση της δομής της λιγνίνης και των διαφορετικών φαινυλοπροπανίων (Serrano et al., 2019)

### 1.2.1.2 Πλατύφυλλα και κωνοφόρα

Τα πλατύφυλλα και τα κωνοφόρα ξύλα, παρότι περιέχουν και τα τρία βασικά συστατικά του κυτταρικού τοιχώματος, παρουσιάζουν σημαντικές διαφορές στο είδος και στη δομή της ημικυτταρίνης και της λιγνίνης. Το κύριο μονοσάκχαρο στα κωνοφόρα είναι η μαννόζη, ενώ στα πλατύφυλλα είναι η ξυλόζη. Η γαλακτογλυκομαννάνη και η αραβινογλυκουρονοξυζυλάνη υπερτερούν στα κωνοφόρα, ενώ η γλυκουρονοξυζυλάνη και η γλυκομαννάνη είναι τα βασικά είδη ημικυτταρίνης στα πλατύφυλλα, τα οποία περιέχουν, επίσης, και σημαντικές ποσότητες ακετυλίων (Wang, 2003). Όσον αφορά τη λιγνίνη, περιέχεται σε μεγαλύτερη ποσότητα στα κωνοφόρα (26-32%) σε σχέση με τα πλατύφυλλα (20-25%) (Wang, 2008). Επίσης, διαφέρουν και στα δομικά στοιχεία του πολυμερούς της λιγνίνης, με τα πλατύφυλλα να αποτελούνται κυρίως από συμπολυμερή γουαϊκυλικών και συρινγκυλικών μονάδων, των οποίων οι αναλογίες ποικίλλουν από είδος σε είδος, και τα κωνοφόρα να αποτελούνται κυρίως από πολυμερή γουαϊκυλικών μονάδων (Sarkanen et al., 1967).

## 1.3 Αξιοποίηση της λιγνοκυτταρινούχου βιομάζας

Σήμερα, πολλές βιομηχανίες, συμπεριλαμβανομένων των βιομηχανιών φαρμάκων, πολυμερών και καλλυντικών, στηρίζονται σε πετροχημικά προϊόντα και παράγωγα πετρελαίου, εξαιτίας της χαμηλής τιμής τους, της διαθεσιμότητάς τους και της καταλληλότητάς τους για την παραγωγή τέτοιων προϊόντων. Παρόλ' αυτά, η συνεχής χρήση των ορυκτών καυσίμων έχει οδηγήσει σε σημαντική μείωση της ποσότητάς τους με αποτέλεσμα τη διαρκή αύξηση της τιμής τους, ενώ τα περιβαλλοντικά προβλήματα που συνοδεύονται από την εκπομπή αερίων του θερμοκηπίου (διοξείδιο του άνθρακα, μεθάνιο κ.α.) γίνονται ολοένα και εντονότερα. Στο πλαίσιο αυτό, η αξιοποίηση της λιγνοκυτταρινούχου βιομάζας για την παραγωγή καυσίμων αποτελεί μια ενδιαφέρουσα εναλλακτική για την αντιμετώπιση αυτών των προβλημάτων. Πέρα από τα καύσιμα, όμως, χρησιμοποιείται και για την παραγωγή μεγάλης ποικιλίας βιοπροϊόντων με εφαρμογή στη φαρμακευτική, στη βιομηχανία τροφίμων και πλαστικών.

### 1.3.1 Βιοκαύσιμα

Μερικά μόνο από τα βιοκαύσιμα που μπορούν να παραχθούν από την αξιοποίηση της λιγνοκυτταρινούχου βιομάζας είναι η βιοβουτανόλη, το βιοντίζελ, το βιοαέριο, η βιομεθανόλη και η βιοαιθανόλη, που συγκεντρώνει αρκετό ενδιαφέρον ως υποψήφιος αντικαταστάτης των μη ανανεώσιμων ορυκτών καυσίμων. Ωστόσο, η ανάπτυξη μιας οικονομικά βιώσιμης, φιλικής προς το περιβάλλον και αποτελεσματικής τεχνολογίας για αυτήν την βιομετατροπή, αποτελεί μια σημαντική πρόκληση (Soni et al., 2018).

### 1.3.2 Χημικά και άλλα προϊόντα που προέρχονται από τη βιομάζα

Είτε από τα σάκχαρα είτε από τη λιγνίνη της λιγνοκυτταρινούχου βιομάζας, μπορούν να παραχθεί ποικιλία χημικών και υλικών υψηλής αξίας, συμπεριλαμβανομένων βιοφαρμακευτικών προϊόντων, βιοκαλλυντικών, βιοθρεπτικών συστατικών, βιολιπασμάτων και βιοϋλικών (Budzianowski, 2017). Σε αυτά τα προϊόντα, ανήκουν, μεταξύ άλλων, η φουρφουράλη, αλκοόλες σακχάρων, που χρησιμοποιούνται στη βιομηχανία τροφίμων, η υδροξυμεθυλοφουρφουράλη (hydroxymethylfurfural, HMF), το λεβουλνικό οξύ, ρητίνες και ανθρακούχα υλικά, όπως ο ενεργός άνθρακας (Irmak, 2017). Από τα διάφορα βιοϋλικά, τα βιοπλαστικά (βιοπολυαιθυλένιο, βιοπολυεστέρες κ.τ.λ.) συγκεντρώνουν το μεγαλύτερο ενδιαφέρον, αφού διαθέτουν ιδιότητες που μειώνουν την εκπομπή αερίων του θερμοκηπίου (Fernández-Dacosta et al., 2015).

### 1.3.3 Αξιοποίηση λιγνοκυτταρινούχου βιομάζας στα πλαίσια ενός βιοδιυλιστηρίου

Η βιομετατροπή της λιγνοκυτταρινούχου βιομάζας σε βιοκαύσιμα και άλλα προϊόντα προστιθέμενης αξίας, περιλαμβάνει τρία βασικά στάδια: την προκατεργασία/κλασματοποίηση, την υδρόλυση και τη ζύμωση (Soni et al., 2018).

#### Προκατεργασία/Κλασματοποίηση

Τα βασικά χαρακτηριστικά της προκατεργασίας, είναι η αποτελεσματική κλασματοποίηση, δηλαδή ο διαχωρισμός στα τρία βασικά συστατικά και η τροποποίηση της δομής της βιομάζας, ώστε αυτή να καταστεί πιο επιδεκτική στη δράση των ενζύμων και, συνεπώς, στη σακχαροποίηση σε επόμενο επίπεδο. Για τον σκοπό αυτό, έχουν εφαρμοστεί πολλές μέθοδοι, συμπεριλαμβανομένων φυσικών, χημικών και βιολογικών. Το στάδιο της προκατεργασίας θα αναλυθεί εκτενώς στην επόμενη ενότητα.

#### Υδρόλυση/Σακχαροποίηση

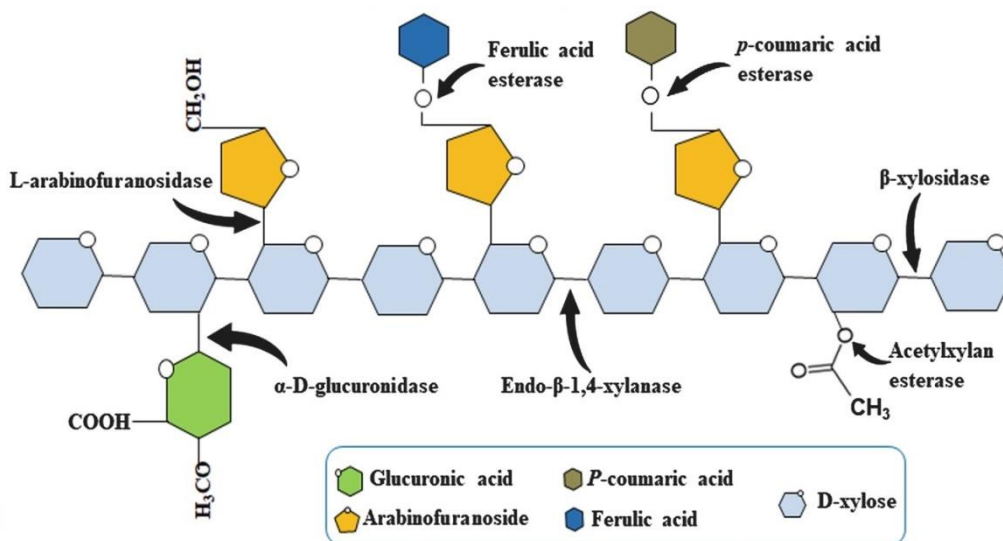
Στο στάδιο της υδρόλυσης, η κυτταρίνη και η ημικυτταρίνη της λιγνοκυτταρινούχου βιομάζας αποικοδομούνται σε επιμέρους μονοσάκχαρα ή ολιγοσάκχαρα. Η υδρόλυση της βιομάζας μπορεί να πραγματοποιηθεί είτε με τη χρήση οξέων είτε ενζυμικά, με τη δεύτερη επιλογή να προτιμάται περισσότερο λόγω της μεγαλύτερης επιλεκτικότητάς της, των ηπιότερων συνθηκών της και της υψηλότερης ανάκτησης σακχάρων που προσφέρει.

Η ενζυμική υδρόλυση της λιγνοκυτταρινούχου βιομάζας πραγματοποιείται με τη βοήθεια των κυτταρινάσων και των ημικυτταρινάσων. Ουσιαστικά πρόκειται για συστήματα ενζύμων που υδρολύουν την κυτταρίνη και την ημικυτταρίνη αντίστοιχα. Στις κυτταρινάσες ανήκουν οι ενδογλουκανάσες (EC 3.2.1.4), που δρουν τυχαία στις άμορφες περιοχές της κυτταρίνης απελευθερώνοντας μόρια κελλοβιόζης, οι εξωγλουκανάσες (EC 3.2.1.91 & EC 3.2.1.74), που δρουν στα άκρα της κυτταρίνης και στα ολιγοπολυμερή της κελλοβιόζης απελευθερώνοντας μόρια κελλοβιόζης, και οι β γλυκοζιδάσες (EC 3.2.1.21), που υδρολύουν την κελλοβιόζη παράγοντας D-γλυκόζη.

Οι ημικυτταρινάσες, λόγω της πολύπλοκης δομής τους αποτελούνται από περισσότερα ένζυμα, τα οποία είναι απαραίτητα για την υδρόλυση των δεσμών της κύριας αλυσίδας της ημικυτταρίνης προς παραγωγή ολιγοσακχαριτών, την υδρόλυση των ολιγοσακχαριτών προς τα αντίστοιχα μονοσάκχαρα, αλλά και την υδρόλυση των δεσμών μεταξύ της κύριας αλυσίδας και των υποκαταστατών. Για παράδειγμα, για τη βιοαποικοδόμηση της ξυλάνης, είναι απαραίτητη η συνεργιστική δράση των παρακάτω ενζύμων:



- Ενδοξυλανάσες (EC 3.2.1.8): «Κόβουν» την κύρια αλυσίδα της ξυλάνης σε τυχαία εσωτερικά σημεία απελευθερώνοντας ξυλοολιγοσακχαρίτες. Οι δύο κυριότερες οικογένειες ενδοξυλανασών είναι οι GH10 και GH11, με τα μέλη της πρώτης οικογένειας να παράγουν ολιγοσακχαρίτες μικρότερου μοριακού βάρους σε σχέση με τα μέλη της δεύτερης.
- Β-ξυλοζιδάσες (EC 3.2.1.37): Διασπούν τους ξυλοολιγοσακχαρίτες σε μόρια ξυλόζης.
- Εστεράσες του φερουλικού (π-κουμαρικού) οξέος (EC 3.1.1.73): Καταλύουν την υδρόλυση των πλευρικών μονάδων φερουλικού οξέος.
- Α-αραβινοφουρανοζιδάσες (EC 3.2.1.55): Καταλύουν την υδρόλυση των πλευρικών μονάδων αραβινόζης.
- Α-γλυκουρονοζιδάσες (EC 3.2.1.131): Καταλύουν την υδρόλυση των πλευρικών μονάδων γλυκουρονικού οξέος.
- Ακετυλοεστεράσες (3.1.1.72): Καταλύουν την υδρόλυση των πλευρικών μονάδων ακετυλίου.



Εικόνα 4: Συνεργιστική δράση ημικυτταρινασών για τη βιοαποικοδόμηση της ξυλάνης (Mamo, 2020)

## Ζύμωση

Τα σάκχαρα που παράχθηκαν σε προηγούμενο στάδιο από την υδρόλυση της βιομάζας, μπορούν να χρησιμοποιηθούν ως πηγή άνθρακα από διάφορους μικροοργανισμούς προς την παραγωγή επιθυμητών ενώσεων. Μερικά παραδείγματα είναι η παραγωγή βιοαιθανόλης (Kanna & Ronmani, 2009), ηλεκτρικού οξέος (R. Liu et al., 2013), βουτυρικού οξέος (Fu et al., 2017) κ.α.. Η ενζυμική υδρόλυση και η ζύμωση μπορούν να πραγματοποιηθούν είτε σε διαφορετικά στάδια (διακριτή υδρόλυση και ζύμωση, separate hydrolysis and fermentation, SHF) είτε στο ίδιο στάδιο (ταυτόχρονη σακχαροποίηση και ζύμωση, simultaneous saccharification and fermentation, SSF). Είναι, επίσης, δυνατή και η

εφαρμογή μιας ενοποιημένης διεργασίας (ενοποιημένη βιοδιεργασία, consolidated bioprocessing, CBP) στην οποία χρησιμοποιούνται μικροοργανισμοί που έχουν την ικανότητα να παράγουν τα απαραίτητα ένζυμα για την υδρόλυση της βιομάζας και να ζυμώνουν τα μονοσάκχαρα, αλλά λειτουργούν με πολύ χαμηλούς ρυθμούς (Bhatia et al., 2012).

### 1.3.3.1 Παραγωγή προϊόντων σε διαφορετικά στάδια

Είναι σημαντικό να τονιστεί ότι δεν απαιτούνται και τα τρία στάδια για την παραγωγή όλων των προϊόντων που προέρχονται από την αξιοποίηση της λιγνοκυτταρινούχου βιομάζας. Για παράδειγμα, τα καρβοξυλικά οξέα, το γαλακτικό και το ηλεκτρικό οξύ, καθώς και βιοκαύσιμα όπως η βιοαιθανόλη και η βιοβουτανόλη, παράγονται από κατάλληλους ζυμωτικούς μικροοργανισμούς στο τρίτο στάδιο. Η φουρφουράλη και το HMF σχηματίζονται από την αφυδάτωση των πεντοζών και των εξοζών αντίστοιχα, που παράγονται στο δεύτερο στάδιο κατά την ενζυμική υδρόλυση της βιομάζας. Η λιγνίνη, που μπορεί να χρησιμοποιηθεί για την παραγωγή φαινολικών ενώσεων, προκύπτει από την προκατεργασία της λιγνοκυτταρινούχου βιομάζας, η οποία αποτελεί το πρώτο στάδιο στην αξιοποίησή της. Επομένως, γίνεται αντιληπτό ότι σε κάθε στάδιο αντιστοιχούν διαφορετικά προϊόντα.

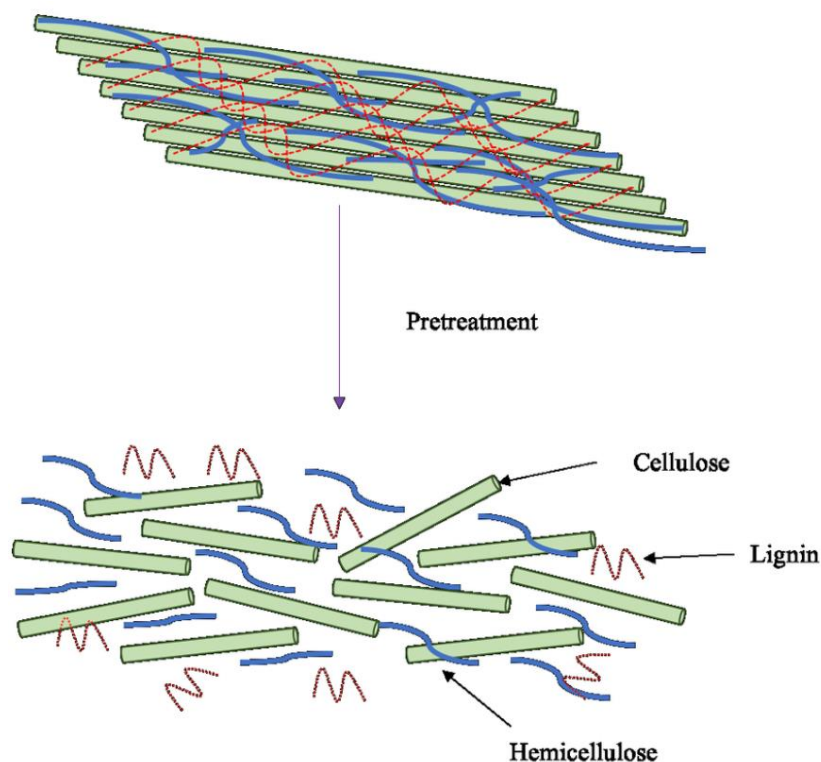
## 1.4 Προκατεργασία λιγνοκυτταρινούχου βιομάζας

Αν και η λιγνοκυτταρινούχος βιομάζα μπορεί να αξιοποιηθεί για την παραγωγή βιοκαυσίμων και άλλων υλικών προστιθέμενης αξίας, η πολύπλοκη δομή της καθιστά αυτό το εγχείρημα ιδιαίτερα δύσκολο. Προκειμένου να γίνει αυτή η μετατροπή, η κυτταρίνη και η ημικυτταρίνη πρέπει να διασπαστούν στα αντίστοιχα μονομερή σάκχάρά τους. Ωστόσο, η παρουσία της λιγνίνης στο κυτταρικό τοίχωμα των φυτικών κυττάρων, αλλά και η κρυσταλλική δομή της κυτταρίνης, εμποδίζουν την αποικοδόμησή τους (Kumar et al., 2009). Επομένως, η κλασματοποίηση της λιγνοκυτταρινούχου βιομάζας στα συστατικά της, είναι απαραίτητη για την αποτελεσματική αξιοποίησή της. Αυτό επιτυγχάνεται στο στάδιο της προκατεργασίας της λιγνοκυτταρινούχου βιομάζας, κατά το οποίο αφαιρείται ή τροποποιείται η λιγνίνη, απομακρύνεται η ημικυτταρίνη, μειώνεται η κρυσταλλικότητα της κυτταρίνης και αυξάνεται το πορώδες του υλικού με αποτέλεσμα την αύξηση της διαθέσιμης ειδικής επιφάνειας (Kucharska et al., 2018). Τα παραπάνω στοχεύουν στην αύξηση της ικανότητας των ενζύμων να υδρολύσουν την κυτταρίνη και την ημικυτταρίνη στα επιμέρους μονοσάκχαρα.

Μια προκατεργασία προκειμένου να είναι αποτελεσματική και οικονομικά βιώσιμη, πρέπει να εξασφαλίζει (Jönsson & Martín, 2016):

- Υψηλή ανάκτηση σακχάρων
- Χαμηλή συγκέντρωση τοξικών παρεμποδιστών
- Υψηλή ανάκτηση ημικυτταρίνης και λιγνίνης
- Χαμηλές απαιτήσεις ενέργειας, χημικών και νερού

Λόγω της πολυπλοκότητας της δομής της λιγνοκυτταρινούχου βιομάζας, πολλές μέθοδοι προκατεργασίας έχουν αναπτυχθεί έως τώρα. Σε αυτές περιλαμβάνονται φυσικές, χημικές, φυσικοχημικές, βιολογικές, ηλεκτρικές και συνδυασμοί τους. Παρόλη την προσπάθεια που έχει γίνει για την εξέλιξη των παραπάνω μεθόδων όσον αφορά την αποτελεσματικότητα και το κόστος τους, η προκατεργασία της λιγνοκυτταρινούχου βιομάζας εξακολουθεί να ανήκει στα πιο κοστοβόρα στάδια στη μετατροπή της σε βιολογικά προϊόντα προστιθέμενης αξίας (Kucharska et al., 2018).



Εικόνα 5: Διαχωρισμός συστατικών λιγνοκυτταρινούχου βιομάζας κατά την προκατεργασία (Kataria et al., n.d.)

### 1.4.1 Φυσικές μέθοδοι

Οι φυσικές μέθοδοι στοχεύουν στη μείωση του μεγέθους των σωματιδίων της βιομάζας με αποτέλεσμα την αύξηση της διαθέσιμης επιφάνειας και του μεγέθους των πόρων της και ταυτόχρονα τη μείωση της κρυσταλλικότητας και του βαθμού πολυμερισμού της κυτταρίνης (Nauman Aftab et al., 2019). Σε αυτές συγκαταλέγονται, μεταξύ άλλων η άλεση και η πυρόλυση:

Άλεση: Ανάλογα με την υγρασία της βιομάζας χρησιμοποιούνται διάφορα είδη μύλων. Τέτοιοι είναι οι φυγόκεντροι, οι κολλοειδείς, οι δονούμενοι, οι σφαιρικοί κ.α. (Cheng & Timilsina, 2011). Αυτή η μέθοδος είναι πολύ γρήγορη, αλλά απαιτεί υψηλά ποσά ενέργειας (Seidl & Goulart, 2016).

Πυρόλυση: Η λιγνοκυτταρινούχος βιομάζα υποβάλλεται σε θερμοκρασία άνω των 300 °C. Ανάλογα με το ύψος της θερμοκρασίας η πυρόλυση διακρίνεται σε αργή (πιο χαμηλές θερμοκρασίες) και σε γρήγορη (πιο υψηλές θερμοκρασίες), ενώ παρουσία οξυγόνου η όλη διεργασία είναι αποτελεσματικότερη (Shafizadeh & Bradbury, 1979). Τα μειονεκτήματά της είναι η υψηλή θερμοκρασία, που συνεπάγεται και υψηλότερες ενεργειακές απαιτήσεις, και η παραγωγή στάχτης (Kumar et al., 2009).

### 1.4.2 Φυσικοχημικές μέθοδοι

Η κυτταρίνη ξεκινά να αποικοδομείται μετά τους 240 °C, ενώ η ημικυτταρίνη και η λιγνίνη σε μικρότερες θερμοκρασίες (περίπου στους 180 °C). Οι φυσικοχημικές μέθοδοι προκατεργασίας της λιγνοκυτταρινούχου βιομάζας εκμεταλλεύονται αυτή τη διαφορά στις θερμικές σταθερότητες των συστατικών της προκειμένου να τα διαχωρίσουν. Οι σημαντικότερες μέθοδοι αυτής της κατηγορίας είναι η έκρηξη ατμού, αμμωνίας και διοξειδίου του άνθρακα.

Έκρηξη ατμού: Η βιομάζα θερμαίνεται με ατμό υψηλής πίεσης και σε υψηλή θερμοκρασία (160 – 240 °C) για μερικά λεπτά. Σε αυτήν τη φάση υδρολύεται μερικώς η ημικυτταρίνη και η λιγνίνη, αλλά όχι η κυτταρίνη. Ύστερα, το μίγμα υφίσταται απότομη εκτόνωση σε ατμοσφαιρική πίεση και η ημικυτταρίνη και η λιγνίνη μεταφέρονται στην υγρή φάση, ενώ η κυτταρίνη, της οποίας το δυναμικό αποικοδόμησης βελτιώθηκε, παραμένει σε στερεή μορφή. Επίσης, τα οξέα που παράγονται κατά τη διεργασία ευνοούν ακόμα περισσότερο την υδρόλυση της ημικυτταρίνης (Mok & Antal, 1992).

Έκρηξη CO<sub>2</sub>: Ο μηχανισμός σε αυτήν την περίπτωση είναι παρόμοιος με αυτόν της έκρηξη ατμού. Χρησιμοποιείται υπερκρίσιμο διοξείδιο του άνθρακα το οποίο κάτω από υψηλή πίεση και θερμοκρασία δρα σαν διαλύτης και διεισδύει στη βιομάζα. Αφού το μίγμα αφεθεί σε ηρεμία για μερικά λεπτά, αποσυμπιέζεται ξαφνικά με αποτέλεσμα την κλασματοποίηση της βιομάζας στα συστατικά της. Είναι σημαντικό το γεγονός ότι στην έκρηξη CO<sub>2</sub> δεν παράγονται παρεμποδιστές (Nauman Aftab et al., 2019).

Έκρηξη αμμωνίας: Η βιομάζα κατεργάζεται με υγρή αμμωνία σε υψηλή πίεση. Βασίζεται στην ίδια αρχή με τις εκρήξεις ατμού και διοξειδίου του άνθρακα, αλλά ο χρόνος προκατεργασίας είναι μεγαλύτερος και η θερμοκρασία είναι αρκετά χαμηλότερη (Holtzapfle et al., 1991). Μετά την προκατεργασία, η αμμωνία, λόγω

της πτητικότητάς της σε ατμοσφαιρική πίεση, μπορεί να ανακυκλωθεί και να επαναχρησιμοποιηθεί.

### 1.4.3 Βιολογικές μέθοδοι

Σε αυτήν την κατηγορία μεθόδων, για την προκατεργασία της λιγνοκυτταρινούχου βιομάζας χρησιμοποιούνται μικροοργανισμοί που παρουσιάζουν κυτταρινολυτικές, ημικυτταρινολυτικές και λιγνινολυτικές ιδιότητες. Κατά κύριο λόγο, οι μικροοργανισμοί αυτοί είναι μύκητες που έχουν την ικανότητα παραγωγής ενζύμων για τη διάσπαση της κυτταρίνης, της ημικυτταρίνης και της λιγνίνης και διακρίνονται σε μύκητες καστανής, λευκής και μαλακής σήψης. Οι βιολογικές μέθοδοι είναι φιλικές προς το περιβάλλον και έχουν πολύ χαμηλές απαιτήσεις σε ενέργεια. Ωστόσο, ο ρυθμός της διεργασίας είναι πολύ χαμηλός και μπορεί να φτάσει μέχρι και δύο εβδομάδες, ενώ υπάρχει και η πιθανότητα οι μικροοργανισμοί να καταναλώσουν ένα μέρος των σακχάρων (Amin et al., 2017).

### 1.4.4 Χημικές μέθοδοι

Εφαρμόζονται συχνότερα από τις φυσικές και τις βιολογικές μεθόδους. Στις χημικές μεθόδους, η αποικοδόμηση της λιγνοκυτταρινούχου βιομάζας επιτυγχάνεται μέσω χημικών αντιδράσεων με τη χρήση υδατικών διαλυμάτων οξέων και βάσεων, καθώς και με τη χρήση οργανικών διαλυτών. Στις χημικές μεθόδους περιλαμβάνονται, επίσης, η οζονόλυση, η οξειδωση και η προκατεργασία με ιοντικά υγρά (Sun & Cheng, 2002).

Όξινη προκατεργασία: Χρησιμοποιούνται διαλύματα οξέων, κυρίως υδροχλωρικού και θειικού οξέος, για τη διάσπαση των δεσμών που συγκρατούν τα συστατικά της βιομάζας με αποτέλεσμα τη διαλυτοποίηση της ημικυτταρίνης και τη μείωση του βαθμού κρυσταλλικότητας της λιγνίνης (Amin et al., 2017). Όταν τα διαλύματα είναι αραιά, η προκατεργασία μπορεί να γίνει είτε σε υψηλή θερμοκρασία (άνω των 180 °C) για 1 – 5 λεπτά είτε σε χαμηλή θερμοκρασία (κάτω των 120 °C) για 30 – 90 λεπτά. Τα πυκνά διαλύματα, αν και είναι πολύ αποτελεσματικά όσον αφορά την υδρόλυση της βιομάζας, είναι πολύ διαβρωτικά και απαιτούν τη χρήση ειδικού εξοπλισμού αυξάνοντας σημαντικά το κόστος της προκατεργασίας. Το βασικότερο μειονέκτημα της όξινης προκατεργασίας είναι η μεγάλη παραγωγή τοξικών παρεμποδιστών (HMF, φουρφουράλη, οξικό οξύ, φαινολικές ενώσεις κ.α.) λόγω της αποικοδόμησης των μονοσακχάρων (Hendriks & Zeeman, 2009).

Αλκαλική προκατεργασία: Πρόκειται για την προκατεργασία της βιομάζας με βάσεις όπως είναι το υδροξείδιο του νατρίου, που είναι και το συνηθέστερο, το υδροξείδιο του καλίου και το υδροξείδιο του ασβεστίου (Kim et al., 2016). Επιτυγχάνεται η αφαίρεση του μεγαλύτερου μέρους της λιγνίνης και της ημικυτταρίνης με τη λιγνίνη

να διαλυτοποιείται και την ημικυτταρίνη να διατηρείται σχεδόν ανέπαφη και αδιαλυτοποιήτη (Rabemanolontsoa & Saka, 2016). Οι συνθήκες πίεσης και θερμοκρασίας είναι ηπιότερες σε σχέση με την όξινη προκατεργασία, η παραγωγή τοξικών ενώσεων είναι μικρότερη, ενώ η απομάκρυνση και η ανάκτηση των βάσεων είναι ευκολότερη. Ωστόσο, ο χρόνος της προκατεργασίας είναι σημαντικά μεγαλύτερος και κάποια ποσότητα από τα άλατα που παράγονται συγκεντρώνονται στη βιομάζα και δεν είναι δυνατό να ανακτηθούν (Kumar et al., 2009; Nauman Aftab et al., 2019).

Υγρή οξείδωση: Σε αυτό το είδος προκατεργασίας, η βιομάζα κατεργάζεται με θερμό νερό και αέρα ή καθαρό οξυγόνο σε θερμοκρασίες 170 – 200 °C, σε πίεση 10 – 12 bar για 5 – 15 λεπτά (Karaçajı & Felby, 2010). Η προσθήκη του οξυγόνου σε θερμοκρασίες μεγαλύτερες των 170 °C, ελαττώνει σημαντικά τις ενεργειακές απαιτήσεις. Τα σημαντικά πλεονεκτήματα της υγρής οξείδωσης είναι η σχετικά χαμηλή θερμοκρασία και η μειωμένη παραγωγή παρεμποδιστών (Tomás-Rejó et al., 2011).

#### **1.4.4.1 Οργανολυτική προκατεργασία (Organosolv)**

Στην οργανολυτική προκατεργασία, η λιγνοκυτταρινούχος βιομάζα κατεργάζεται με οργανικούς διαλύτες ή διαλύματα οργανικών διαλυτών και νερού σε θερμοκρασίες 100 °C – 220 °C με ή χωρίς την προσθήκη καταλυτών, οι οποίοι ενισχύουν την απολιγνοποίηση και την υδρόλυση της βιομάζας (Taherzadeh & Karimi, 2008). Σε προκατεργασίες που γίνονται σε υψηλές θερμοκρασίες (πάνω από 180 °C), δεν χρησιμοποιούνται συνήθως καταλύτες, αφού λόγω της θερμοκρασίας, τα ίδια τα οργανικά οξέα που παράγονται, δρουν καταλυτικά για τη διάσπαση του λιγνοϋδατανθρακικού συμπλέγματος (Duff & Murray, 1996). Οι διαλύτες που χρησιμοποιούνται πρέπει να απομακρυνθούν και να ανακυκλωθούν τόσο για τη βελτίωση της οικονομικής βιωσιμότητας της προκατεργασίας όσο και για την εξάλειψη της παρεμποδιστικής δράσης που έχουν στην ανάπτυξη των μικροοργανισμών και στην υδρόλυση των συστατικών της βιομάζας (Kumar et al., 2009).

Συγκριτικά με τις προαναφερθείσες μεθόδους, η οργανολυτική προκατεργασία παρουσιάζει σημαντικά πλεονεκτήματα. Καταρχάς, οδηγεί στην κλασματοποίηση της κυτταρίνης, της ημικυτταρίνης και της λιγνίνης με τη λιγνίνη και την κυτταρίνη να ανακτώνται σε δύο ξεχωριστά στερεά ρεύματα και την ημικυτταρίνη μαζί με τα προϊόντα αποικοδόμησης των σακχάρων σε ένα υγρό ρεύμα (Sannigrahi & Ragauskas, 2013). Επίσης, αν και η απομάκρυνση των διαλυτών είναι απαραίτητη, εντούτοις είναι πολύ εύκολη και μπορεί να γίνει με απόσταξη και οι διαλύτες να ανακυκλωθούν και να επαναχρησιμοποιηθούν (Zhao et al., 2009).

Στους διαλύτες που έχουν χρησιμοποιηθεί σε αυτού του είδους την προκατεργασία ανήκουν διαλύτες με χαμηλό σημείο βρασμού όπως είναι η μεθανόλη, η αιθανόλη, η ακετόνη και το τετραϋδροφουράνιο, αλλά και με υψηλότερο σημείο βρασμού όπως είναι η γλυκερόλη, η αιθυλενογλυκόλη και η βουτανόλη. Το φορμικό και το οξικό οξύ έχουν, επίσης, χρησιμοποιηθεί (Zhao et al., 2009). Όσον αφορά τους καταλύτες, συχνή είναι η χρήση θειικού, φωσφορικού και υδροχλωρικού οξέος, καυστικού νατρίου και οργανικών οξέων όπως το οξαλικό, το σαλικυλικό και το ακετυλοσαλικυλικό οξύ (Sarkanen, 1980). Ο συνδυασμός οργανικών διαλυτών και οξειδωτικών συνθηκών με τη χρήση ηπιότερων οξέων ή ακόμα και καθαρού οξυγόνου, αντί για όξινους καταλύτες, αποτελεί μια ελκυστική προσέγγιση για την αποφυγή της διάβρωσης του εξοπλισμού και τη μείωση των ενεργειακών απαιτήσεων της προκατεργασίας (Kalogiannis et al., 2018).

### **Αιθανόλη – Μεθανόλη**

Από τους διαλύτες με χαμηλό σημείο βρασμού, η αιθανόλη είναι αυτή που χρησιμοποιείται πιο συχνά για την οργανολυτική προκατεργασία της λιγνοκυτταρινούχου βιομάζας. Αυτό οφείλεται τόσο στο χαμηλό της κόστος όσο και στην ευκολία ανάκτησής της. Οι καταλύτες μπορεί να είναι όξινοι, όπως υδροχλωρικό, θειικό και οξικό οξύ, βασικοί, όπως το υδροξείδιο του καλίου και του νατρίου ή και άλατα όπως το χλωριούχο μαγνήσιο, το χλωριούχο ασβέστιο και ο τριχλωριούχος σίδηρος (Sannigrahi & Ragauskas, 2013; Zhang et al., 2016).

Κατά την προκατεργασία με αιθανόλη παρατηρούνται τα παρακάτω (Sannigrahi & Ragauskas, 2013):

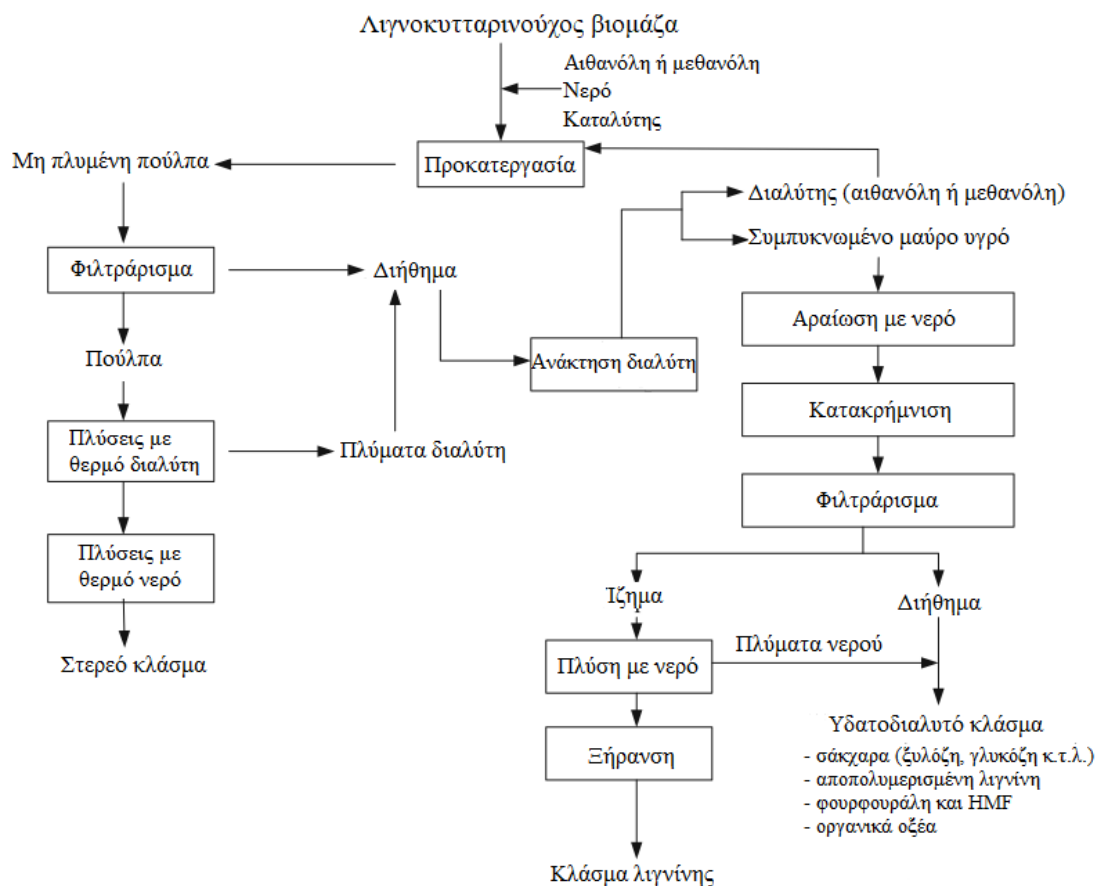
- Υδρόλυση των δεσμών μεταξύ των φαινυλομάδων της λιγνίνης και μεταξύ της λιγνίνης και της ημικυτταρίνης
- Διάσπαση των γλυκοζιτικών δεσμών των μονομερών, κυρίως της ημικυτταρίνης και λιγότερο της κυτταρίνης
- Αποικοδόμηση των μονοσακχάρων προς παραγωγή τοξικών παρεμποδιστών λόγω της ύπαρξης όξινων καταλυτών

Η προκατεργασία με αιθανόλη έχει εφαρμοστεί σε πολλά υποστρώματα με διαφορετικούς καταλύτες. Μερικά παραδείγματα αποτελούν η προκατεργασία πεύκου (Zhang et al., 2016) και μίσχανθου (Brosse et al., 2009) με καταλύτη θειικό οξύ σε συγκεντρώσεις 1.1% και 0.5% της ξηρής βιομάζας αντίστοιχα, πεύκου με υδροξείδιο του νατρίου 20% (Del Rio et al., 2010) και ευκαλύπτου με οξικό οξύ συγκέντρωσης 1% (Teramoto et al., 2008).

Η μεθανόλη είναι άλλος ένας διαλύτης με χαμηλό σημείο βρασμού που χρησιμοποιείται στην οργανολυτική προκατεργασία και έχει παρόμοιο μηχανισμό δράσης με την αιθανόλη (Zhao et al., 2009). Ωστόσο, η χρήση της δεν είναι τόσο

συχνή όσο η χρήση της αιθανόλης, κυρίως λόγω της τοξικότητας και της ευφλεκτότητάς της (Gandolfi et al., 2014).

Κατά την προκατεργασία με αιθανόλη και μεθανόλη, η βιομάζα κατεργάζεται με οργανικό διαλύτη, νερό και καταλύτη σε θερμοκρασία μικρότερη των 180 °C. Η προκατεργασία μπορεί να γίνει και στους 185 °C – 210 °C χωρίς την προσθήκη καταλύτη. Ακολουθεί φιλτράρισμα και έκπλυση του στερεού υπολείμματος με οργανικό διαλύτη και ζεστό νερό για την παραλαβή του στερεού κλάσματος που περιέχει την κυτταρίνη. Μετά την έκπλυση με τον οργανικό διαλύτη, το υγρό συλλέγεται και αποστάζεται σε κατάλληλη θερμοκρασία, ώστε αυτός να ανακυκλωθεί. Το υπόλοιπο συμπυκνωμένο υγρό, αραιώνεται με νερό για να ιζηματοποιηθεί η λιγνίνη και, ύστερα, φιλτράρεται. Το ίζημα εκπλένεται με νερό και ξηραίνεται για την παραλαβή της στερεής, πλέον, λιγνίνης, ενώ τα υδατοδιαλυτά συστατικά της βιομάζας περιέχονται στο νερό από την έκπλυση και στο διήθημα από το φιλτράρισμα (Zhao et al., 2009).



Εικόνα 6: Σχεδιαγραμματική απεικόνιση της προκατεργασίας της λιγνοκυτταρινούχου βιομάζας με αιθανόλη και μεθανόλη (Zhao et al., 2009)



## Ακετόνη

Από τις κετόνες, η ακετόνη είναι αυτή που προτιμάται περισσότερο, λόγω της υψηλής διαλυτότητας της λιγνίνης σε αυτήν, με τα μεταλλικά οξέα όπως το θειικό, υδροχλωρικό ή το φωσφορικό οξύ να χρησιμοποιούνται, συνήθως, ως καταλύτες. Ωστόσο, είναι πολύ εύφλεκτη και έχει αυξημένη τάση ατμών σε υψηλές θερμοκρασίες (Zhang et al., 2016).

Η προκατεργασία με ακετόνη μπορεί να πραγματοποιηθεί είτε σε ένα είτε σε δύο στάδια. Πριονίδια ξύλου έχουν προκατεργαστεί σε ένα στάδιο με διάλυμα ακετόνης – νερού 1:1, 0.9% H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> και σε θερμοκρασία από 185 °C – 195 °C (Araque et al., 2009), αλλά και σε δύο στάδια με τη βιομάζα να προκατεργάζεται πρώτα με νερό στους 180 °C για την ανάκτηση της ημικυτταρίνης και, στη συνέχεια, με διάλυμα ακετόνης – νερού στους 230 °C και στα 10 MPa για τον διαχωρισμό της κυτταρίνης και της λιγνίνης (Sannigrahi & Ragauskas, 2013). Μια ενδιαφέρουσα προσέγγιση είναι η χρήση διαφορετικών διαλυτών για τη διάλυση κάθε βασικού συστατικού της βιομάζας. Για παράδειγμα, έχει χρησιμοποιηθεί πυκνό φωσφορικό οξύ, ακετόνη και νερό σε ατμοσφαιρική πίεση στους 50 °C, με στόχο τη διάλυση της κυτταρίνης, της λιγνίνης και της ημικυτταρίνης αντίστοιχα (Zhang et al., 2007).

## Τετραϋδροφουράνιο

Το τετραϋδροφουράνιο (THF) έχει χαμηλό ιξώδες και αρκετά χαμηλό σημείο βρασμού. Αν και αυτές οι ιδιότητες συμβάλλουν στην ευκολότερη απομάκρυνσή του από τη βιομάζα μετά την προκατεργασία, εντούτοις το καθιστούν έναν επικίνδυνο διαλύτη λόγω της ευφλεκτότητάς του. Όταν το τετραϋδροφουράνιο χρησιμοποιηθεί σε συνδυασμό με αραιό οξύ ως καταλύτη, αυξάνεται σημαντικά η απομάκρυνση της λιγνίνης και η διαλυτοποίηση της κυτταρίνης (Nguyen et al., 2015).

## Πολυυδροξυαλκοόλες

Από τις πολυυδροξυαλκοόλες, η αιθυλενογλυκόλη και η γλυκερόλη είναι αυτές που χρησιμοποιούνται συχνότερα. Λόγω του υψηλού σημείου βρασμού τους, η προκατεργασία με τη χρήση τους ως διαλύτες μπορεί να πραγματοποιηθεί σε ατμοσφαιρική πίεση, αλλά οι υψηλές ενεργειακές απαιτήσεις για την ανάκτησή τους σε συνδυασμό με το υψηλό τους κόστος, περιορίζουν σημαντικά την εφαρμογή τους. Βέβαια, η αντικατάσταση της επεξεργασμένης γλυκερόλης με ακατέργαστη γλυκερόλη που προκύπτει ως παραπροϊόν από την παραγωγή βιοντίζελ, έχει αποδειχθεί ότι μειώνει την απαιτούμενη ενέργεια ανάκτησης (Zhao et al., 2009).

## Οργανικά οξέα

Το οξικό και το φορμικό οξύ είναι τα οργανικά οξέα που έχουν χρησιμοποιηθεί κατά κύριο λόγο ως διαλύτες στην οργανολυτική προκατεργασία. Τα σχετικά υψηλά σημεία βρασμού τους (118 °C του οξικού οξέος και 100.8 °C του φορμικού οξέος) επιτρέπουν την προκατεργασία σε ατμοσφαιρική πίεση και σε χαμηλή θερμοκρασία (Ligero et al., 2008). Ωστόσο, μέρος των οξέων καταναλώνονται για τη φορμυλίωση και την ακετυλίωση της κυτταρίνης μειώνοντας την αποτελεσματικότητα της ενζυμικής υδρόλυσης, ενώ προκαλούν και έντονη διάβρωση του εξοπλισμού. Επομένως, δεν προτιμούνται συχνά για την προκατεργασία της λιγνοκυτταρινούχου βιομάζας (Zhao et al., 2009).

## Οργανικά υπεροξέα

Αντί για φορμικό και οξικό οξύ, μπορούν να χρησιμοποιηθούν και τα αντίστοιχα υπεροξέα τους. Το υπερφορμικό και το υπεροξικό οξύ παράγονται εύκολα από το φορμικό και το οξικό οξύ υπό την παρουσία υπεροξειδίου του υδρογόνου, με ή χωρίς καταλύτη (Villaverde et al., 2012). Ωστόσο, το υπερφορμικό οξύ είναι πολύ ασταθές και γι' αυτό δεν προτιμάται. Η προκατεργασία με υπεροξικό οξύ μπορεί να γίνει σε χαμηλή θερμοκρασία και σε ατμοσφαιρική πίεση μειώνοντας την παραγωγή τοξικών παρεμποδιστών, ενώ με αύξηση της θερμοκρασίας ο χρόνος προκατεργασίας μπορεί να ελαττωθεί (Mussatto & Roberto, 2004). Η αποικοδόμηση του υπεροξικού οξέος παράγει νερό, οξυγόνο και οξικό οξύ το οποίο μπορεί να επαναχρησιμοποιηθεί για τον σχηματισμό του υπεροξικού οξέος. Το κόστος, όμως, των απαραίτητων αντιδραστηρίων, η διαβρωτική φύση του οξέος και η πιθανότητα έκρηξης που συνοδεύει τη χρήση του, δεν το καθιστούν μια ιδιαίτερα ελκυστική επιλογή (Zhao et al., 2009).

### 1.4.4.1.2 Ήπια οργανολυτική οξειδωση

Η οργανολυτική οξειδωση είναι μια μέθοδος οργανολυτικής προκατεργασίας που αναπτύχθηκε πρόσφατα ως εξέλιξη της υγρής προκατεργασίας. Περιλαμβάνει την κατεργασία της λιγνοκυτταρινούχου βιομάζας με ένα μίγμα νερού και οργανικού διαλύτη, αλλά και καθαρού οξυγόνου, χωρίς την προσθήκη όξινου καταλύτη. Πέρα από τα πλεονεκτήματα της υγρής οξειδωσης, δηλαδή τη χαμηλή θερμοκρασία και την ελάχιστη παραγωγή παρεμποδιστών, επιτυγχάνεται και μεγαλύτερη απομάκρυνση λιγνίνης (Katsimprouras et al., 2018). Τα υγρά κλάσματα που αξιολογήθηκαν στα πλαίσια της παρούσας διπλωματικής εργασίας έχουν προέλθει από προκατεργασία οργανολυτικής οξειδωσης ξύλων οξιάς και πεύκου.

### 1.4.4.1.3 Κλάσματα οργανολυτικής προκατεργασίας

Το σημαντικό πλεονέκτημα της οργανολυτικής προκατεργασίας είναι η κλασματοποίηση της λιγνοκυτταρινούχου βιομάζας στα βασικά συστατικά της. Πιο συγκεκριμένα, τα κλάσματα που προκύπτουν είναι τα παρακάτω (Zhao et al., 2009):

- Ένα στερεό κλάσμα που περιέχει την κυτταρίνη και μικρές ποσότητες ημικυτταρίνης και λιγνίνης
- Ένα στερεό κλάσμα που περιέχει τη λιγνίνη
- Ένα υγρό κλάσμα στο οποίο βρίσκεται διαλυμένη η ημικυτταρίνη

### 1.4.4.1.4 Υγρό κλάσμα οργανολυτικής προκατεργασίας

Το υδατοδιαλυτό κλάσμα της οργανολυτικής προκατεργασίας διαθέτει μεγάλη ποικιλία διαλυμένων ουσιών. Εκτός από τους ολιγοσακχαρίτες και μονοσακχαρίτες της ημικυτταρίνης (γλυκόζη, μαννόζη, ξυλόζη, γαλακτόζη, αραβινόζη και τα ολιγοπολυμερή τους), περιέχονται, επίσης, υδατοδιαλυτές φαινολικές ενώσεις (για παράδειγμα συμπλέγματα ενώσεων της λιγνίνης με σάκχαρα, lignin-carbohydrate complexes, LCCs), προϊόντα αποικοδόμησης των σακχάρων (HMF, φουρφουράλη) και οργανικά οξέα (οξικό οξύ, λεβουλνικό οξύ, γλυκουρονικό οξύ). Αυτά τα συστατικά του υγρού κλάσματος ονομάζονται τοξικοί παρεμποδιστές, διότι δρουν ανασταλτικά στην ανάπτυξη των μικροοργανισμών. Γι' αυτό, επιδιώκεται η ελάχιστη δυνατή παραγωγή τους κατά την προκατεργασία και η απομάκρυνσή τους μετά από αυτήν.

### Ολιγοσακχαρίτες της ημικυτταρίνης στο υγρό κλάσμα

Η ημικυτταρίνη του κυτταρικού τοιχώματος των φυτών περιέχει όλα τα είδη μονοσακχάρων που είναι πολυμερισμένα σχηματίζοντας τους διάφορους πολυσακχαρίτες. Βέβαια, όπως έχει ήδη αναφερθεί, υπάρχουν διαφορές στη σύσταση της ημικυτταρίνης ανάμεσα στα διαφορετικά είδη ξύλων. Τα κωνοφόρα ξύλα περιέχουν κυρίως μαννόζη, με τη γλυκομαννάνη να είναι το βασικό είδος ημικυτταρίνης, ενώ τα πλατύφυλλα περιέχουν κυρίως ξυλόζη, με την γλυκουρονοξυλάνη να είναι το βασικό είδος ημικυτταρίνης (Holtzapfle, 2003b). Επομένως, μετά την οργανολυτική προκατεργασία διαφορετικών ειδών ξύλου, στο υγρό κλάσμα εμπεριέχονται και διαφορετικά είδη ολιγοσακχαριτών. Στο υγρό κλάσμα των κωνοφόρων υπάρχουν, κατά κύριο λόγο, ολιγοπολυμερή και συμπολυμερή της μαννόζης και της γλυκόζης (μαννο-ολιγοσακχαρίτες, γλυκο-ολιγοσακχαρίτες, μαννο-γλυκο-ολιγοσακχαρίτες) από τη γλυκομαννάνη, ενώ στο υγρό κλάσμα των πλατύφυλλων, υπερτερούν οι ολιγοσακχαρίτες της ξυλόζης (ξυλο-ολιγοσακχαρίτες).

## Παρεμποδιστές

Είναι σημαντικό να τονιστεί ότι κατά την οργανολυτική προκατεργασία παράγονται μόνο οξικό οξύ σε μικρές αλλά υπολογίσιμες ποσότητες, καθώς και φαινολικές ενώσεις. Οι ποσότητες των υπόλοιπων παρεμποδιστών είναι αμελητέες.

### Φουρφουράλη

Η φουρφουράλη σχηματίζεται από την αφυδάτωση των πεντοζών (κυρίως της ξυλόζης) που συμβαίνει παρουσία οξέος. (Sannigrahi & Ragauskas, 2013). Σε θερμοκρασίες μικρότερες από 190 °C, η ξυλόζη είναι το βασικό προϊόν υδρόλυσης της ημικυτταρίνης (Huijgen et al., 2010), ενώ σε θερμοκρασίες μεγαλύτερες από 205 °C, η φουρφουράλη αντιδρά με την ξυλόζη προς παραγωγή ψευδο-λιγνίνης (Kim & Pan, 2010). Επομένως, η μεγαλύτερη συγκέντρωση φουρφουράλης επιτυγχάνεται σε θερμοκρασίες 190 °C – 205 °C.

### Υδροξυμεθυλοφουρφουράλη (hydroxymethylfurfural, HMF)

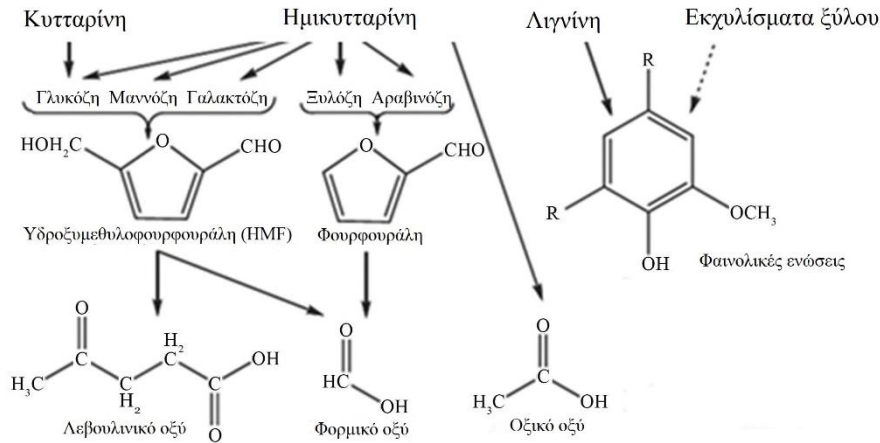
Ο σχηματισμός του HMF ευνοείται σε υψηλές θερμοκρασίες που φτάνουν μέχρι και τους 200 °C, σε χαμηλό pH και σε μεγάλους χρόνους προκατεργασίας και συμβαίνει παρουσία οξέος λόγω της αφυδάτωσης των εξοζών (γλυκόζη, γαλακτόζη, μαννόζη). Περαιτέρω αποικοδόμησή του οδηγεί σε παραγωγή λεβουλινικού και φορμικού οξέος (Kim & Pan, 2010).

### Λεβουλινικό οξύ

Σε θερμοκρασίες πάνω από τους 200 °C, το HMF αποικοδομείται με αποτέλεσμα τον σχηματισμό λεβουλινικού οξέος, το οποίο χρησιμοποιείται για την παραγωγή πολυμερών, διαλυτών, πλαστικοποιητών κ.α. (Kim & Pan, 2010). Σε ηπιότερες συνθήκες προκατεργασίας, το λεβουλινικό οξύ βρίσκεται σε πολύ χαμηλές συγκεντρώσεις στο υγρό κλάσμα (Sannigrahi & Ragauskas, 2013).

### Οξικό οξύ

Το οξικό οξύ προκύπτει κατά την προκατεργασία της βιομάζας από την υδρόλυση των ακετυλομάδων της ημικυτταρίνης εξαιτίας της παρουσίας όξινων καταλυτών. Η παραγωγή του έχει ως αποτέλεσμα τη μείωση του pH και την περεταίρω υδρόλυση της βιομάζας (Sannigrahi & Ragauskas, 2013).



Εικόνα 7: Προϊόντα και παραπροϊόντα της προκατεργασίας της λιγνοκυτταρινούχου βιομάζας (Reginatto & Antônio, 2015)

## Αξιοποίηση υγρού κλάσματος

Αν και η παραγωγή βιοκαυσίμων βασίζεται κατά κύριο λόγο στην κυτταρίνη του στερεού κλάσματος, υπάρχουν αναφορές για την προσπάθεια αξιοποίησης των ημικυτταρινών του υγρού κλάσματος για τον ίδιο σκοπό. Βέβαια, εξαιτίας της ύπαρξης των παρεμποδιστών, πρέπει πρώτα να εφαρμοστούν μέθοδοι αποτοξικοποίησης για την απομάκρυνσή τους. Το υγρό κλάσμα από την προκατεργασία γλυκού σόργου (Mirfakhar et al., 2020), λεύκας και πεύκου (Guan et al., 2018) με ζεστό νερό, έχει χρησιμοποιηθεί για την παραγωγή ακετόνης, βουτανόλης και αιθανόλης (acetone-butanol-ethanol, ABE) από το ζυμωτικό βακτήριο *Clostridium acetobutylicum*, ώστε να ελεγχθεί η βιωσιμότητα και η εφικτότητα της διεργασίας. Στην περίπτωση του γλυκού σόργου, οι καλλιέργειες έγιναν σε περιστρεφόμενο επωαστήρα στους 37 °C, με τις καλλιέργειες στις οποίες, εκτός από το υδρόλυμα, προστέθηκαν και σπόροι σόργου ως πηγή άνθρακα, να παρουσιάζουν μεγαλύτερη κατανάλωση πεντοζών και μεγαλύτερη παραγωγή ABE (Mirfakhar et al., 2020). Στην περίπτωση της λεύκας και του πεύκου, εφαρμόστηκε ταυτόχρονη σακχαροποίηση και ζύμωση (simultaneous saccharification and fermentation, SSF), με ικανοποιητική απόδοση παραγωγής βιοκαυσίμων (Guan et al., 2018). Επίσης, το υγρό κλάσμα από την προκατεργασία όξινης υδρόλυσης ξύλου ευκαλύπτου και καλαμποκιού έχει χρησιμοποιηθεί για την παραγωγή ξυλιτόλης από τον μύκητα *Candida guilliermondii* (Villarreal et al., 2006) και αιθανόλης από το βακτήριο *Zymomonas mobilis*, αντίστοιχα (Mohagheghi et al., 2006).

## 1.5 Ολιγοσακχαρίτες με πρεβιοτική δράση

Στο κλίμα της διατροφικής συνείδησης που επικρατεί τελευταία, το ενδιαφέρον των ερευνητών έχει στραφεί στην εύρεση θρεπτικών συστατικών που ενισχύουν την ανάπτυξη και τον πολλαπλασιασμό των προβιοτικών, δηλαδή των μικροοργανισμών του πεπτικού συστήματος με ευεργετική δράση (Samanta et al., 2015). Έτσι, το 1995

εμφανίστηκε η έννοια των πρεβιοτικών σύμφωνα με την οποία τα πρεβιοτικά ορίζονται ως «μη εύπεπτα συστατικά τροφών που επηρεάζουν ευεργετικά τον ξενιστή διεγείροντας επιλεκτικά την ανάπτυξη ή/και τη δράση ενός ή περισσότερων βακτηρίων του παχέος εντέρου» (Gibson & Roberfroid, 1995). Τα κριτήρια που πρέπει να πληροί μια ουσία ώστε να οριστεί ως πρεβιοτικό είναι (Gibson et al., 2004):

1. Να είναι ανθεκτική στη γαστρική οξύτητα, στην υδρόλυση από ένζυμα θηλαστικών και στην απορρόφηση από τον γαστρεντερικό σωλήνα.
2. Να μπορεί να ζυμωθεί από μικροοργανισμούς του εντέρου.
3. Να διεγείρει επιλεκτικά την ανάπτυξη ή/και τη δραστηριότητα των προβιοτικών που βοηθούν στην υγεία και ευεξία του ξενιστή.

### 1.5.1 Είδη πρεβιοτικών

Προς το παρόν, μελετώνται ολιγοσακχαρίτες μικρού μοριακού βάρους των οποίων οι μονοσακχαρίτες συνδέονται μεταξύ τους με β-δεσμούς, επειδή μπορούν να αποτελέσουν πηγές άνθρακα για τους μικροοργανισμούς του παχέος εντέρου. Αντιθέτως, οι α-δεσμοί υδρολύονται από τα ένζυμα του ανθρώπινου οργανισμού με αποτέλεσμα να μην μπορούν να αποτελέσουν τροφή για τα προβιοτικά. Ορισμένα παραδείγματα πρεβιοτικών είναι τα παρακάτω.

#### **Γαλακτοολιγοσακχαρίτες (galacto-oligosaccharides, GOS)**

Οι γαλακτοολιγοσακχαρίτες υπάρχουν στο ανθρώπινο και στο αγελαδινό γάλα, στο γιαούρτι και μπορούν να συντεθούν από τη λακτόζη με τη βοήθεια της β-γαλακτοζιδάσης. Δεν πέπτονται από τα ένζυμα του λεπτού εντέρου, αλλά μπορούν να υδρολυθούν από μικροοργανισμούς του παχέος εντέρου, όπως τα μπιφιδοβακτήρια, παράγοντας λιπαρά οξέα μικρής αλυσίδας (short chain fatty acids, SCFAs) (Thammarutwasik et al., 2009).

#### **Φρουκτάνες**

Σε αυτήν την κατηγορία ανήκουν οι φρουκτοολιγοσακχαρίτες (fructo-oligosaccharides, FOS) και η ινουλίνη. Η δομή τους είναι μια γραμμική αλυσίδα φρουκτοζών στο τέλος της οποίας υπάρχουν, συνήθως, μονάδες γλυκόζης. Οι FOS έχουν βαθμό πολυμερισμού μικρότερο από 10, ενώ η ινουλίνη μέχρι και 60 (Louis et al., 2016).

## 1.5.1.2 Ολιγοσακχαρίτες από λιγνοκυτταρινούχο βιομάζα

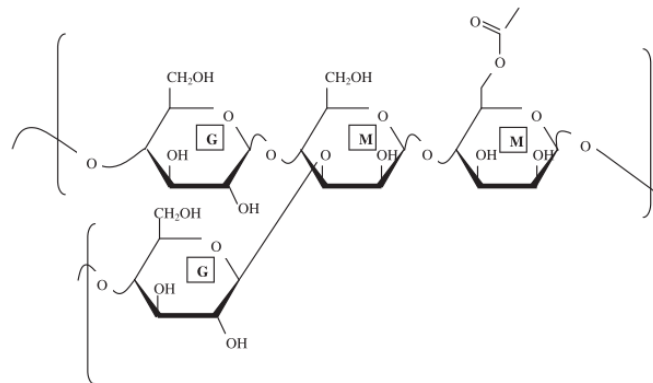
### 1.5.1.2.1 Ολιγοσακχαρίτες κυτταρίνης (cello-oligosaccharides, COS)

Είναι γραμμικοί ολιγοσακχαρίτες με δομική μονάδα τη γλυκοπυρανόζη που προέρχονται από την κυτταρίνη της λιγνοκυτταρινούχου βιομάζας. Η χρήση τους ως πρεβιοτικά προτάθηκε, επειδή έχει παρατηρηθεί ότι ευνοούν την ανάπτυξη των γαλακτικών βακτηρίων. Ωστόσο, λίγα πειράματα έχουν γίνει έως τώρα για τον προσδιορισμό της αποτελεσματικότητάς τους στην ανάπτυξη των προβιοτικών. Οι δύο μέθοδοι που εφαρμόζονται για την παραγωγή τους από λιγνοκυτταρινούχο βιομάζα είναι η όξινη και η ενζυματική υδρόλυση της κυτταρίνης, με την τελευταία να προτιμάται λόγω των ηπιότερων συνθηκών και της μικρότερης παραγωγής μονοσακχάρων και παρεμποδιστών (Yan & Liao, 1998a), ενώ είναι δυνατή και η συνθετική παραγωγή τους με τη χρήση ενζύμων (Yan & Liao, 1998b).

### 1.5.1.2.2 Ολιγοσακχαρίτες ημικυτταρίνης

#### Ολιγοσακχαρίτες γλυκομαννάνης (glucomanno-oligosaccharides, GMO)

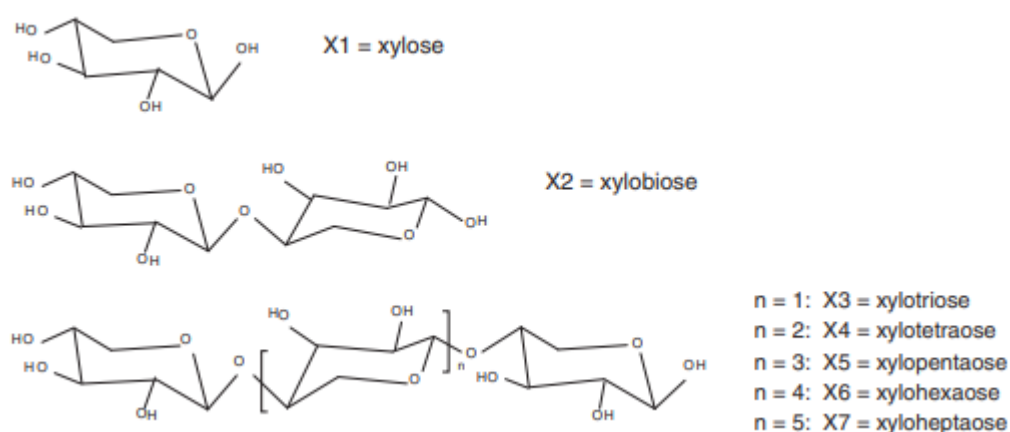
Προέρχονται κατά κύριο λόγο από τη ρίζα κοηας και αποτελούνται από μονάδες γλυκόζης και μαννόζης σε μοριακή αναλογία 1.6:1. Για την παραγωγή τους μπορεί να εφαρμοστεί ενζυμική υδρόλυση, με τη βοήθεια μαννανασών και κυτταρινασών, ή όξινη υδρόλυση των πολυσακχαριτών (Al-Ghazzewi & Tester, 2012). Λόγω της πολύπλοκης δομής των πολυσακχαριτών (διακλαδώσεις, ακετυλιωμένες μονάδες) οι ολιγοσακχαρίτες από τη γλυκομαννάνη παρουσιάζουν ποικιλία στις δομές τους, κάτι που επηρεάζει την ικανότητα ζύμωσής τους από τα προβιοτικά (Albrecht et al., 2011).



Εικόνα 8: Χημική δομή ενός τμήματος γλυκομαννάνης. G: γλυκόζη, M: μαννόζη (Tester & Al-Ghazzewi, 2013)

## Ολιγοσακχαρίτες γλυκουρονοξυλάνης (xylo-oligosaccharides, XOS)

Είναι ολιγοσακχαρίτες με δομική μονάδα την ξυλόζη και προέρχονται από λιγνοκυτταρινούχο βιομάζα πλούσια σε ξυλάνη. Ανάλογα με την προέλευση της ξυλάνης που χρησιμοποιείται για την παραγωγή τους, η δομή των ξυλοολιγοσακχαριτών διαφέρει ως προς τον βαθμό πολυμερισμού, τα είδη δεσμών μεταξύ των μονάδων ξυλόζης, καθώς και την ύπαρξη ή μη διακλαδώσεων. Σε γενικές γραμμές, οι ξυλοολιγοσακχαρίτες αποτελούνται από μονομερή ξυλόζης συνδεδεμένα με β-1,4-γλυκοζιτικό δεσμό και με βάση τον αριθμό τους, που μπορεί να ποικίλλει από 2 έως 10, ονομάζονται ξυλοβιόζη (δύο μονομερή ξυλόζης), ξυλοτριόζη (τρία μονομερή ξυλόζης) κ.ο.κ. (Aachary & Prapulla, 2011), με αυτούς που έχουν χαμηλό βαθμό πολυμερισμού να εμφανίζουν υψηλότερη πρεβιοτική δράση (Falck et al., 2013).



Εικόνα 9: Σχηματική απεικόνιση της δομής της ξυλόζης και των ξυλοολιγοσακχαριτών (Carvalho et al., 2013)

Η παραγωγή τους είναι δυνατή είτε με χημικές μεθόδους (με ατμό, αραιωμένα διαλύματα ανόργανων οξέων, αλκαλικά διαλύματα) είτε με ενζυματική υδρόλυση είτε με συνδυασμό και των δύο (Katapodis et al., 2002; Katapodis & Christakopoulos, 2005; Vardakou et al., 2004). Όσον αφορά τις χημικές μεθόδους, έχει πραγματοποιηθεί αυτοϋδρόλυση για την παραγωγή ξυλοολιγοσακχαριτών από διάφορα είδη βιομάζας όπως τα πλατύφυλλα (G. Garrote & Parajó, 2002; Vázquez et al., 2005), τα κωνοφόρα (Palm & Zacchi, 2003), το καλαμπόκι (Garrote et al., 2002) κ.α., ενώ με κατεργασία αλεσμένου ξύλου με φούρνο μικροκυμάτων έχει εξαχθεί υδατοδιαλυτή ημικυτταρίνη από την οποία στη συνέχεια με χρωματογραφία αποκλεισμού μεγέθους απομονώθηκαν οι διάφοροι ολιγοσακχαρίτες (Teleman et al., 2000). Στις ενζυματικές μεθόδους, οι ξυλοολιγοσακχαρίτες παράγονται από την ξυλάνη ξύλου οξιάς (Freixo & De Pinho, 2002), σημύδας (Aachary & Prapulla, 2008), από άχυρο σίτου (Pellerin et al., 1991) κ.α., με τη βοήθεια ενδοξυλανασιών, β-ξυλοζιδασιών και γλυκοσυνασιών. Όταν υποστούν κατεργασία με ατμό ή νερό, παράγονται και τοξικοί παρεμποδιστές, οι οποίοι πρέπει να απομακρυνθούν, ώστε οι ξυλοολιγοσακχαρίτες να έχουν τη



μεγαλύτερη δυνατή καθαρότητα για τη χρήση τους ως πρεβιοτικά. Για την απομάκρυνσή τους έχουν εφαρμοστεί διάφορες μέθοδοι, είτε ξεχωριστά είτε συνδυαστικά, μεταξύ των οποίων είναι η προσρόφησή τους σε ενεργό άνθρακα (Montané et al., 2006), η εξαγωγή και ιζηματοποίησή τους με τη χρήση διαλυτών (αιθανόλη, ακετόνη) και η χρήση μεμβρανών (Yuan et al., 2004).

## 1.5.2 Τρόπος δράσης πρεβιοτικών

Ένα μέρος από την τροφή που καταναλώνεται πέπτεται και απορροφάται ως θρεπτικά συστατικά στο λεπτό έντερο. Το υπόλοιπο, δηλαδή τα πρεβιοτικά, περνάει στο παχύ έντερο και αξιοποιείται από τα προβιοτικά με αποτέλεσμα την παραγωγή μεγάλων ποσοτήτων γαλακτικού οξέος που μειώνουν το pH και αναστέλλουν τη δράση των παθογόνων. Παράλληλα, παράγονται και SCFAs, όπως είναι το οξικό, το προπιονικό και το βουτυρικό οξύ, που απορροφώνται από τον ξενιστή (Thammarutwasik et al., 2009). Το μικρό τους μέγεθος τους επιτρέπει να διαχέονται από τα εντερικά κύτταρα και να διέρχονται στην κυκλοφορία του αίματος. Επομένως, τα πρεβιοτικά εκτός από τη γαστρεντερική οδό, μπορούν να επηρεάσουν και με άλλους τρόπους τον ανθρώπινο οργανισμό (Den Besten et al., 2013). Ωστόσο, πρέπει να σημειωθεί ότι αν και όλα τα είδη πρεβιοτικών έχουν πολλές κοινές ιδιότητες, δεν έχουν όλα την ίδια επίδραση στον οργανισμό. Μερικά παραδείγματα ευεργετικής δράσης των πρεβιοτικών είναι τα παρακάτω:

- Μείωση του κινδύνου εμφάνισης καρκίνου του παχέος εντέρου, καθώς και της εξέλιξης της νόσου μέσω απόπτωσης (Candela et al., 2011)
- Βελτίωση του ανοσοποιητικού συστήματος μέσω της αύξησης του αριθμού των προβιοτικών
- Βελτίωση της μνήμης και ορισμένων ψυχιατρικών δυσλειτουργιών με αλλαγή της δραστηριότητας και της σύστασης των προβιοτικών (X. Liu et al., 2015)
- Μείωση της πιθανότητας εμφάνισης, αλλά και της σοβαρότητας δερματικών ασθενειών (Moro et al., 2006)
- Αυξημένη απορρόφηση ασβεστίου (Carlson et al., 2018)

Λόγω των πολλαπλών θετικών επιδράσεων των πρεβιοτικών στον ανθρώπινο οργανισμό, βρίσκουν εφαρμογή σε πολλά προϊόντα διατροφής. Η ινουλίνη μαζί με φρουκτοολιγοσακχαρίτες βρίσκονται σε αρκετά λειτουργικά ποτά και σε συνδυασμό με γαλακτοολιγοσακχαρίτες προστίθενται σε βρεφικές τροφές με αποτελέσματα παρόμοια με αυτά του θηλασμού όσον αφορά την επίδραση στον αριθμό των προβιοτικών τους πρώτους μήνες. Πρεβιοτικά υπάρχουν και σε διάφορα δημητριακά, σε γαλακτοκομικά προϊόντα όπως το γιαούρτι, όπου σε συνδυασμό με

τα ήδη υπάρχοντα προβιοτικά βελτιώνουν την απορρόφηση ασβεστίου, σε φαρμακευτικά διατροφικά προϊόντα κ.α. (Thammarutwasik et al., 2009).

Μεταξύ των διάφορων πρεβιοτικών, οι ξυλοολιγοσακχαρίτες κατέχουν μια ιδιαίτερη θέση λόγω της πολύπλευρης επιρροής που έχουν στην ανθρώπινη υγεία σε συνδυασμό με τη δυνατότητά τους να χρησιμοποιηθούν για την αντιμετώπιση αρκετών γαστρεντερικών δυσλειτουργιών. Η σημασία τους, οφείλεται, επίσης, στο γεγονός ότι προέρχονται από λιγνοκυτταρινούχα υλικά, τα οποία όχι μόνο είναι ακατάλληλα για ανθρώπινη κατανάλωση, αλλά και βρίσκονται σε αφθονία. Επομένως, η αξιοποίησή τους ως προϊόντα προστιθέμενης αξίας όπως είναι τα πρεβιοτικά, θα έχει ως αποτέλεσμα τόσο τη βελτίωση της ανθρώπινης υγείας όσο και την εκμετάλλευση των άφθονων και, προς το παρόν, ανεκμετάλλευστων αποθεμάτων λιγνοκυτταρινούχου βιομάζας.

## 1.6 Προβιοτικά

Αποτελούνται κυρίως από λακτοβάκιλλους και μπιφιδοβακτήρια και βοηθούν στη διατήρηση της ισορροπίας του μικροβιακού φορτίου στο έντερο (Thammarutwasik et al., 2009). Τα χαρακτηριστικά που έχουν τα προβιοτικά είναι τα εξής:

- Αντέχουν την οξύτητα του στομάχου (Kontula et al., 1998).
- Αντέχουν τα χολικά άλατα, τα οποία εκκρίνονται από το συκώτι στο λεπτό έντερο ώστε να πεπτούν οι παχυντικές τροφές (Erkkilä & Petäjä, 2000).
- Μπορούν να αναστείλουν την ανάπτυξη παθογόνων (Fuller, 1993):
  - Ανταγωνίζοντάς τα στην αποίκιση του εντερικού τοιχώματος και στην εύρεση τροφής.
  - Παράγοντας ανασταλτικές ουσίες όπως οργανικά οξέα, υπεροξειδίου του υδρογόνου κ.α..
- Βελτιώνουν το ανοσοποιητικό σύστημα του ξενιστή (Fuller, 1993).
- Μειώνουν την πιθανότητα εμφάνισης καρκίνου του παχέος εντέρου με μείωση του αριθμού των υπεύθυνων ενζύμων (Kontula et al., 1998).
- Μειώνουν τη χοληστερόλη του αίματος (Buck & Gilliland, 1994).

### 1.6.1 Λακτοβάκιλλοι

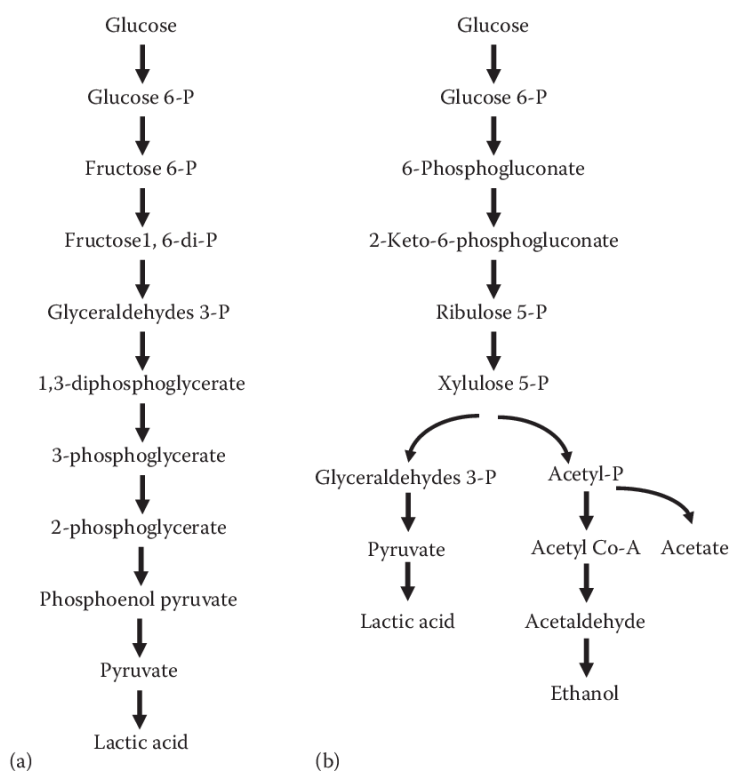
Οι λακτοβάκιλλοι είναι οργανοτροφικά, αυστηρά ζυμωτικά, θετικά κατά Gram και κατά κανόνα προαιρετικά αναερόβια βακτήρια. Συνήθως, έχουν ραβδοειδές σχήμα, αλλά κάτω από συγκεκριμένες συνθήκες παίρνουν σπειροειδείς και κοκκοειδείς μορφές, ενώ δε σχηματίζουν σπόρια (Claesson et al., n.d.). Βρίσκονται σε αρκετές περιοχές της γαστρεντερικής και της γεννητικής οδού και αποτελούν ένα σημαντικό κομμάτι της ενδογενούς μικροχλωρίδας του ανθρώπου και των ανώτερων ζώων. Η

κατανομή τους εξαρτάται από διάφορους περιβαλλοντικούς παράγοντες όπως το pH, η διαθεσιμότητα του οξυγόνου κ.α. (Socol et al., 2010).

Οι λακτοβάκιλλοι ανήκουν στα βακτήρια που παράγουν γαλακτικό οξύ (γαλακτοβακτήρια) και αποτελούν το μεγαλύτερο μέρος αυτής της κατηγορίας. Ανάλογα με τον μεταβολισμό τους διακρίνονται σε (Coeuret et al., 2003):

1. Ομοζυμωτικούς
2. Ετεροζυμωτικούς

Χρησιμοποιώντας κυρίως τη γλυκόζη ως πηγή άνθρακα, οι ομοζυμωτικοί παράγουν πρωτίστως γαλακτικό οξύ (άνω του 85% των ζυμωτικών προϊόντων), ενώ οι ετεροζυμωτικοί παράγουν, εκτός από γαλακτικό οξύ, και ισομοριακές ποσότητες αιθανόλης, διοξειδίου του άνθρακα και οξικού οξέος (Танноск, 2004). Αυτός ο μηχανισμός παραγωγής οξέων αναστέλλει την ανάπτυξη παθογόνων και ευνοεί την ανάπτυξη των λακτοβάκιλλων, οι οποίοι ευδοκιμούν σε χαμηλές τιμές pH.



Εικόνα 10: Ομοζυμωτικό (a) και ετεροζυμωτικό (b) μονοπάτι των LAB βακτηρίων (Kumar et al., 2015)

## 1.6.2 Μπιφιδοβακτήρια

Τα μπιφιδοβακτήρια είναι θετικοί κατά Gram, ετεροζυμωτικοί και αναερόβιοι μικροοργανισμοί που δε σχηματίζουν σπόρια. Έχουν διάφορα σχήματα όπως κοντοί καμπυλωτοί ράβδοι, ράβδοι σε σχήμα μπαστουνιού και διχαλωτές ράβδοι που μοιάζουν με το γράμμα Y (Sgorbati et al., 1995). Βρίσκονται κυρίως στη γαστρεντερική οδό και είναι από τα πρώτα βακτήρια που την αποικούν. Στα βρέφη

που θηλάζονται και γεννούνται με φυσικό τοκετό αποτελούν μέχρι και το 90% της εντερικής μικροχλωρίδας κατά τη διάρκεια του πρώτου χρόνου της ζωής τους (Tannock, 2010). Με την πάροδο του χρόνου, ο αριθμός τους μειώνεται σημαντικά, με το ποσοστό τους να γίνεται μικρότερο του 5% σε ενήλικες και ακόμα μικρότερο σε ηλικιωμένους (Arumugam et al., 2011).

Λόγω της παραγωγής γαλακτικού οξέος ως ένα από τα κύρια προϊόντα της ζύμωσής τους, τα μπιφιδοβακτήρια κατατάσσονται συχνά στα γαλακτοβακτήρια. Ανάλογα με το είδος και το γένος τους, είναι ικανά να ζυμώσουν πολύπλοκες πηγές άνθρακα, όπως οι ξυλοολιγοσακχαρίτες, οι φρουκτοολιγοσακχαρίτες και οι γαλακτοολιγοσακχαρίτες (De Vrese & Schrezenmeir, 2008), τις οποίες μετατρέπουν τελικά σε SCFAs και άλλες οργανικές ενώσεις, κάποιες από τις οποίες δρουν ευεργετικά για τον ξενιστή (Pokusaeva et al., 2011).

## 2 Πειραματικό μέρος

---

### 2.1 Υλικά

#### 2.1.1 Συσκευές – Όργανα

Για την εκτέλεση της παρούσας διπλωματικής εργασίας, έγινε χρήση των παρακάτω συσκευών και οργάνων:

- ❖ pH-μετρο 537, WTW (Γερμανία)
- ❖ Αντλία με ανακυκλοφορία νερού Heto Master Jet SUE 300Q
- ❖ Περιστρεφόμενος εξατμιστήρας Rotavapor RE 111, Buchi (Ελβετία)
- ❖ Αντλία κενού Vacuum Pump V-100, Interface I-100, Buchi (Ελβετία)
- ❖ Θερμαινόμενες πλάκες με μαγνητική ανάδευση Nuova II Stir Plate της Thermolyne, Stirrer Magnetic w Hotplate της Bioline scientific (Ελλάδα) και ARE Heating Magnetic Stirrer της VELP Scientifica (Ιταλία)
- ❖ Θερμαινόμενος ανακινούμενος επωαστήρας Eppendorf Thermomixer Comfort, Eppendorf (Γερμανία)
- ❖ Σύστημα υγρής χρωματογραφίας υψηλής πίεσης, στήλες Aminex HPX 87P (P-στήλη) και Aminex HPX 87H (H-στήλη), Shimadzu (Ιαπωνία)
- ❖ Σύστημα χρωματογραφίας ανταλλαγής ανιόντων υψηλής απόδοσης υψηλής απόδοσης, στήλη Dionex CarboPac PA1, ThermoFischer SCIENTIFIC (Γερμανία)
- ❖ Φυγόκεντρος TJ-6, Beckman Coulter (Η.Π.Α.)
- ❖ Ψυχόμενοι φυγόκεντροι 4239R της Hellenic Labware s.a. (Ελλάδα) και Rotanta 460R της Hettich Zentrifugen (Γερμανία)
- ❖ Ηλεκτρονικοί ζυγοί Mark 2060, Mark 4065 (BEL Engineering, Γερμανία) και Abs 120-4 (KERN & Sohn GmbH, Γερμανία)
- ❖ Συσκευή ανάδευσης Vortex Mixer RSLAB-6PRO (Γαλλία)
- ❖ Αυτόκαυστο Labo Autoclave, SANYO (Η.Π.Α.)
- ❖ Σύστημα παραγωγής υπερκιάθρου νερού Direct-Q, Millipore (Η.Π.Α.)
- ❖ Περιστρεφόμενοι επωαστήρες ZHWY 211-C, ZWHY 100-B, ZHICHENG Analytical Instruments Manufacturing Co. Ltd (Κίνα)
- ❖ Φωτόμετρο UV 2000, Hitachi (Η.Π.Α.)
- ❖ Συσκευή φασματοφωτομέτρησης microplate reader Spectra Max 250 (Molecular Devices)
- ❖ Πιπέτες όγκου 100-1000  $\mu\text{L}$  της HTL (Πολωνία) και 20-200  $\mu\text{L}$  της RAININ (Η.Π.Α.)

## 2.1.2 Χημικά αντιδραστήρια – Εργαστηριακά υλικά

Τα χημικά αντιδραστήρια που χρησιμοποιήθηκαν στα διάφορα στάδια της πειραματικής διαδικασίας κατά την εκπόνηση της παρούσας διπλωματικής εργασίας ήταν αναλυτικού βαθμού και προμηθεύτηκαν από τις εταιρείες PanReac Applichem, Duchefa Biochemie, Sigma Aldrich, Fischer Chemical/Scientific, Acros Organics και Lachner. Τα γυάλινα και πλαστικά εργαστηριακά υλικά ήταν των εταιρειών SCHOTT AG, Eppendorf, Whatman, Millipore, ISOLAB, Greiner Bio-One, Bomex, Membrane Solutions, TGI, Sterilin Ltd, Kavalier, MACHEREY – NAGEL και Witeg.

## 2.1.3 Διαλύτες – Διαλύματα

Οι διαλύτες που χρησιμοποιήθηκαν είναι οι εξής:

- ❖ Υπερκάθαρο νερό αντίστασης 18.2 MΩ·cm
- ❖ H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> συγκέντρωσης 0.3 g/L
- ❖ NaOH 100 mM
- ❖ CH<sub>3</sub>COONa 500 mM

Τα διαλύματα που χρησιμοποιήθηκαν είναι τα παρακάτω:

- ❖ NaOH συγκέντρωσης 10 M
- ❖ H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 72% (w/w)
- ❖ Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> 7.5% (w/v)
- ❖ Ρυθμιστικό διάλυμα (buffer) CH<sub>3</sub>COONa 60 mM με pH=5

## 2.1.4 Κιτ ανάλυσης γλυκουρονικού οξέος

Το κιτ που χρησιμοποιήθηκε για τον υπολογισμό της ποσότητας του γλυκουρονικού οξέος στα υγρά κλάσματα της οργανολυτικής προκατεργασίας, προμηθεύτηκε από την εταιρεία Megazyme.

## 2.1.5 Ένζυμο

Το ένζυμο που χρησιμοποιήθηκε στην παρούσα διπλωματική εργασία είναι ενδοξυλανάση της οικογένειας 30 της ομάδας των γλυκοζυλυδρολασών (glucoside hydrolase family 30, GH30) από τον θερμοφιλο μικροοργανισμό *Thermothelomyces thermophile* (Katsimpouras et al., 2019), αντίστοιχα, που έχει εκφραστεί ετερόλογα και έχει παραχθεί από τον μικροοργανισμό *Pichia pastoris* στο εργαστήριο Βιοτεχνολογίας του τμήματος Χημικών Μηχανικών του Εθνικού Μετσόβιου Πολυτεχνείου.

## 2.1.6 Υγρά κλάσματα οργανολυτικής προκατεργασίας

Τα υγρά κλάσματα της οργανολυτικής προκατεργασίας ξύλων οξιάς (Lignocel HBS 150/500) και πεύκου, που χρησιμοποιήθηκαν για τον προσδιορισμό της πρεβιοτικής δράσης των ολιγοσακχαριτών τους, προμηθεύτηκαν από το Ινστιτούτο Χημικών Διεργασιών και Ενεργειακών Πόρων (Ι.Δ.Ε.Π.) του Εθνικού Κέντρου Έρευνας & Τεχνολογικής Ανάπτυξης της Θεσσαλονίκης στα πλαίσια του προγράμματος «No Waste BioTech: Νέες τεχνολογίες μετατροπής βιομάζας αποβλήτων σε πρόσθετα τροφίμων και εξευγενισμένα χημικά». Η προκατεργασία των ξύλων έγινε με τη χρήση νερού σε συνδυασμό με ακετόνη (ACO), αιθανόλη (EtOH) ή τετραϋδροφουράνιο (THF) σε αναλογία 1:1 για 60 και 120 λεπτά, σε θερμοκρασία 150 °C, 160 °C και 175 °C με εφαρμογή αρχικής πίεσης οξυγόνου (O<sub>2</sub>) 8, 12 και 16 bar ή θειικού οξέος 1%.

Πίνακας 1: Συνθήκες οργανολυτικής προκατεργασίας των δειγμάτων ξύλου οξιάς και πεύκου

Είδος ξύλου	Διαλύτης	Αριθμός δειγματος	Αρχική πίεση (bar)	Θερμοκρασία (°C)	Χρόνος (min)
ΟΞΙΑ (Lignocel HBS 150/500)	ACO	1	16	160	60
		2	16	175	60
		3	16	150	120
		4	16	160	120
		5	16	175	120
		6	12	175	120
		7	8	175	120
		8	1% H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	150	60
		9	1% H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	160	60
		10	1% H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	175	60
	EtOH	11	16	150	60
		12	16	160	60
		13	16	175	60
		14	16	150	120
		15	16	160	120
		16	16	175	120
		17	12	175	120
		18	8	175	120
	THF	19	16	150	60
		20	16	160	60
		21	16	175	60
		22	16	150	120
		23	16	160	120
		24	16	175	120

		25	12	175	120
		26	8	175	120
	ACO	27	16	175	60
	EtOH	28	16	175	60
	THF	29	16	175	60
<b>ΠΕΥΚΟ</b>	ACO	30	1% H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	175	60
	EtOH	31	16	175	120
	THF	32	16	175	120
	ACO	33	1% H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	175	120

## 2.2 Μέθοδοι

### 2.2.1 Απομάκρυνση οργανικού διαλύτη

Για την απομάκρυνση του οργανικού διαλύτη, η παρουσία του οποίου δρα αρνητικά στην ανάπτυξη των βακτηρίων, χρησιμοποιήθηκε περιστρεφόμενος εξατμιστήρας για την απομάκρυνσή τους. Με τη θέρμανση του υγρού κλάσματος σε υδατόλουτρο, ο διαλύτης φτάνει σε θερμοκρασία βρασμού και αρχίζει να εξατμίζεται. Η μείωση της πίεσης στο σύστημα μειώνει και το σημείο βρασμού του διαλύτη με αποτέλεσμα η εξάτμισή του να γίνεται ευκολότερη. Οι ατμοί του διαλύτη, καθώς έρχονται σε επαφή με την κρύα επιφάνεια του ψυκτήρα (εξαιτίας του νερού που ρέει σε αυτόν), συμπυκνώνονται και μεταφέρονται στη φιάλη συλλογής.

Το υγρό κλάσμα μεταφέρεται στη σφαιρική φιάλη εξάτμισης των 500 mL του περιστρεφόμενου εξατμιστήρα μέσα σε υδατόλουτρο του οποίου η θερμοκρασία είναι χαμηλότερη από το σημείο βρασμού του εκάστοτε διαλύτη. Αφού ξεκινήσει η φιάλη να περιστρέφεται, μειώνεται σταδιακά η πίεση του συστήματος με την αντλία κενού, για να διευκολυνθεί η εξάτμιση του διαλύτη. Όταν ο ρυθμός συμπύκνωσής του διαλύτη είναι ικανοποιητικός η ελάττωση της πίεσης σταματά και το σύστημα αφήνεται στην ηρεμία. Με το πέρας της εξάτμισης, ό,τι έμεινε από το υγρό κλάσμα διαλύεται σε υπερκάθαρο νερό μέχρι ο όγκος του νέου διαλύματος να φτάσει τον όγκο του υγρού κλάσματος πριν την εξάτμιση.

### 2.2.2 Αποτοξικοποίηση υγρών κλασμάτων με ενεργό άνθρακα

Κατά την οργανολυτική προκατεργασία της λιγνοκυτταρινούχου βιομάζας, οι διάφορες οργανικές ενώσεις που παράγονται λόγω της αποικοδόμησης των σακχάρων και της λιγνίνης, δρουν ανασταλτικά στην ανάπτυξη των βακτηρίων. Η αποτοξικοποίηση των υγρών κλασμάτων με ενεργό άνθρακα πραγματοποιείται με



προσρόφηση αυτών των τοξικών παρεμποδιστών στην επιφάνειά του και στη συνέχεια με απομάκρυνσή τους με διήθηση υπό κενό.

Ζυγίζεται ποσότητα ενεργού άνθρακα ίση με 2.5 % w/v του κάθε υδρολύματος, η οποία και προστίθεται σε όλον τον όγκο τους. Στη συνέχεια, τα υδρολύματα τοποθετούνται σε περιστρεφόμενο επωαστήρα στους 60 °C για 2 ώρες και στα 150 rpm. Μετά την επώαση, γίνεται προσθήκη πυκνού διαλύματος NaOH 10 M, ώστε η τιμή του pH να φτάσει 5-6 προκειμένου να μη διασπαστούν οι ΧΟΣ και οι εστερικοί δεσμοί, κάτι που γίνεται σε όξινο και αλκαλικό pH αντίστοιχα. Ακολουθεί διήθηση υπό κενό των υδρολυμάτων για την απομάκρυνση του ενεργού άνθρακα και των προσροφημένων σε αυτόν τοξικών παρεμποδιστών. Αυτή η διαδικασία επαναλαμβάνεται μέχρι να μειωθεί σε σημαντικό βαθμό η συγκέντρωση των φαινολικών ενώσεων στο υγρό κλάσμα.

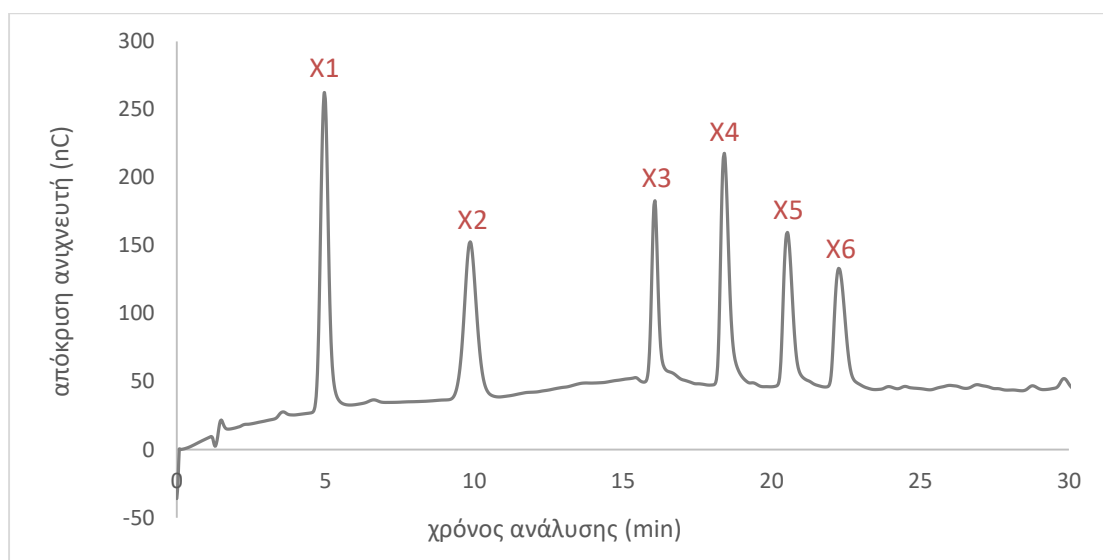
### 2.2.3 Παρουσία ολιγοσακχαριτών στο υγρό κλάσμα προκατεργασίας

Για την επιβεβαίωση της παρουσίας ολιγοσακχαριτών στο υγρό κλάσμα της προκατεργασίας, χρησιμοποιήθηκε χρησιμοποιείται χρωματογραφία ανταλλαγής ανιόντων υψηλής απόδοσης με αμπερομετρική παλμική ανίχνευση (High Performance Anion-Exchange Chromatography with pulsed amperometric detection, HPAEC-PAD). Η στατική φάση της χρωματογραφικής στήλης είναι θετικά φορτισμένη, ενώ ως διαλύτες έκλουσης χρησιμοποιούνται υδατικά διαλύματα NaOH και NaOH σε συνδυασμό με CH<sub>3</sub>COONa.

Το υψηλό pH στη στήλη, λόγω της παρουσίας του NaOH, έχει ως αποτέλεσμα τον ιονισμό των καρβοξυλικών ομάδων και την παραγωγή ασθενών όξινων ανιόντων, που αλληλεπιδρούν με τη θετικά φορτισμένη στατική φάση και διαχωρίζονται ανάλογα με το μέγεθος, τη σύνθεση και το είδος των δεσμών τους. Η προσθήκη του CH<sub>3</sub>COONa επιταχύνει την έκλυση των ισχυρά δεσμευμένων ανιόντων στη στατική φάση, ενώ βοηθά στον διαχωρισμό και την ανίχνευση των μεγαλύτερων σε μέγεθος ολιγοσακχαριτών, καθώς εμφανίζουν καλύτερη διαλυτότητα στον συνδυασμό των διαλυτών NaOH και CH<sub>3</sub>COONa.

**Πίνακας 2:** Συνθήκες της στήλης Dionex CarboPac PA1 ιοντικής χρωματογραφικής ανάλυσης για την επιβεβαίωση της παρουσίας ολιγοσακχαριτών στο υγρό κλάσμα προκατεργασίας

Dionex CarboPac PA1	
<b>Πίεση</b>	80-90 bar
<b>Συνθήκες έκλουσης</b>	0 – 5 min: 100 mM NaOH (100%) 5.1 – 30 min: CH <sub>3</sub> COONa (500 mM) σε 100 mM NaOH (0-20%) 30.1 – 35 min: CH <sub>3</sub> COONa (500 mM) σε 100 mM NaOH (100%)



Εικόνα 11: Χρωματογράφημα HPAEC-PAD. Οι κορυφές X1, X2, X3, X4, X5 και X6 αντιστοιχούν στην ξυλόζη, ξυλοβιόζη, ξυλοτριόζη, ξυλοτετραόζη, ξυλοπενταόζη και ξυλοεξαόζη

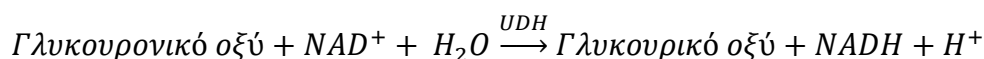
## 2.2.4 Ανάλυση σύστασης κλάσματος ολιγοσακχαριτών

Προκειμένου να υπολογιστεί η ακριβής συγκέντρωση των ολιγοσακχαριτών και η σύσταση των υγρών κλασμάτων, πραγματοποιείται όξινη υδρόλυση με τη χρήση θειικού οξέος, ώστε να σπάσουν οι γλυκοζιτικοί δεσμοί μεταξύ των μονοσακχάρων. Έτσι, η συγκέντρωση των ολιγοσακχαριτών είναι ίση με τη διαφορά των συγκεντρώσεων των μονοσακχάρων πριν και μετά την υδρόλυση.

Σε μπουκάλια αποστείρωσης, προστίθεται 1 mL από το κάθε υγρό κλάσμα μαζί με υπερκάθαρο νερό και θειικό οξύ σε συγκέντρωση 4%, μέχρι τελικού όγκου 10 mL (αραίωση 10 φορές). Στη συνέχεια, τα μπουκάλια αναδεύονται, σφραγίζονται πολύ καλά και αποστειρώνονται στους 121 °C για 60 λεπτά. Με το πέρας της αποστείρωσης, τα όξινα υδρολύματα αφήνονται σε θερμοκρασία δωματίου για 15 λεπτά και, στη συνέχεια, ογκομετρούνται. Για να εξουδετερωθεί το οξύ, ακολουθεί προσθήκη CaCO<sub>3</sub> μέχρι το pH τους να φτάσει 5-6 και διήθηση υπό κενό, ώστε να απομακρυνθεί το σχηματιζόμενο ίζημα.

## 2.2.5 Προσδιορισμός ποσότητας γλυκουρονικού οξέος

Αρχή της μεθόδου: Το γλυκουρονικό οξύ παρουσία  $NAD^+$  οξειδώνεται από το ένζυμο ουρονική αφυδρογονάση (urionate dehydrogenase, UDH) σε γλυκουρικό οξύ, ενώ παράλληλα, σχηματίζεται και NADH σε ποσότητα στοιχειομετρική με την ποσότητα γλυκουρονικού οξέος που οξειδώθηκε. Η αντίδραση που λαμβάνει χώρα είναι η παρακάτω:



Έτσι, ο προσδιορισμός του οξέος γίνεται με βάση το NADH το οποίο απορροφά το φως στα 340 nm.

Για τον προσδιορισμό της συγκέντρωσης του γλυκουρονικού οξέος (Glucuronic acid, GlcA) των υγρών κλασμάτων, χρησιμοποιήθηκε κατάλληλο κιτ, που περιείχε τα εξής:

- Ρυθμιστικό διάλυμα με αζίδιο του νατρίου 0.02% w/v
- $NAD^+$  που διαλύθηκε σε 22 mL υπερκάθαρου νερού
- Ουρονική αφυδρογονάση
- Υδατικό διάλυμα γλυκουρονικού οξέος συγκέντρωσης 0.5 mg/mL

10  $\mu$ L από κάθε όξινο υδρόλυμα εισάγονται σε ένα κελί microplate μαζί με 200  $\mu$ L υπερκάθαρο νερό, 20  $\mu$ L ρυθμιστικού διαλύματος και 20  $\mu$ L διαλύματος  $NAD^+$ . Το microplate τοποθετείται στο φασματοφωτόμετρο και καταγράφεται η τιμή της απορρόφησης κάθε κυψελίδας ( $A_1$ ). Στη συνέχεια, σε κάθε κελί προστίθενται 2  $\mu$ L ενζύμου UDH και το microplate επανατοποθετείται στο φασματοφωτόμετρο, όπου και αφήνεται για 5 λεπτά στους 37 °C για να ξεκινήσει ο σχηματισμός του NADH. Με το πέρας των 5 λεπτών, καταγράφεται η νέα τιμή της απορρόφησης ( $A_2$ ). Για τον υπολογισμό της συγκέντρωσης του γλυκουρονικού οξέος κατασκευάζεται καμπύλη αναφοράς. Για την κατασκευή της καμπύλης ακολουθείται η παραπάνω διαδικασία με τη διαφορά ότι αντί για δείγμα, εισάγονται στα κελιά 10  $\mu$ L υδατικού διαλύματος γλυκουρονικού οξέος συγκεντρώσεων 0.01 mg/mL, 0.05 mg/mL, 0.1 mg/mL, 0.25 mg/mL, 0.5 mg/mL. Από την καμπύλη, προέκυψε η παρακάτω συσχέτιση:

$$(A_2 - A_1) = 1.129 \cdot \text{Απορρόφηση}$$

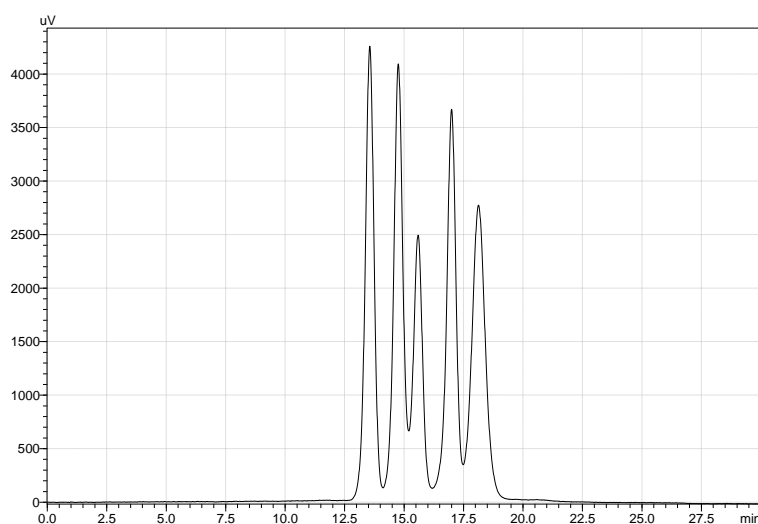
Επειδή η διαφορά  $A_2 - A_1$ , αντιστοιχεί σε μια συγκεκριμένη συγκέντρωση γλυκουρονικού οξέος, χρησιμοποιήθηκε η παρακάτω σχέση για τον υπολογισμό της:

$$C_{GlcA} = 1.129 \cdot \text{Απορρόφηση} \cdot \text{Αραίωση}$$

## 2.2.6 Ανίχνευση σακχάρων και οξικού οξέος

Για την ανίχνευση των μονοσακχάρων και του οξικού οξέος, χρησιμοποιήθηκε υγρή χρωματογραφία υψηλής απόδοσης (High Performance Liquid Chromatography, HPLC). Για την ανίχνευση του οξικού οξέος, όπως και για την ανίχνευση των μονοσακχάρων γλυκόζη, ξυλόζη, γαλακτόζη, αραβινόζη και μαννόζη χρησιμοποιήθηκε η στήλη Aminex HPX 87H. Για τα μονοσάκχαρα πριν και μετά την όξινη υδρόλυση χρησιμοποιήθηκε η στήλη Aminex HPX 87P. Τα σάκχαρα και το οξικό οξύ ανιχνεύθηκαν με ανιχνευτή RI.

Στην υγρή χρωματογραφία, το προς ανάλυση δείγμα διαλύεται σε μια υγρή κινητή φάση, τη φάση του διαλύτη, η οποία διέρχεται μέσω μιας στατικής φάσης που είναι καθηλωμένη σε μια στήλη. Η επιλογή των δύο αυτών φάσεων είναι τέτοια ώστε τα διάφορα συστατικά του δείγματος να κατανέμονται μεταξύ της κινητής και της στατικής φάσης σε διαφορετικό βαθμό. Ανάλογα με τα φυσικοχημικά χαρακτηριστικά του κάθε συστατικού, αυτό αλληλεπιδρά ισχυρότερα ή ασθενέστερα με τη στατική φάση και αντιστρόφως με την κινητή. Έτσι, τα διάφορα συστατικά του δείγματος κατακρατούνται περισσότερο ή λιγότερο από τη στατική φάση με αποτέλεσμα να εξέρχονται από τη στήλη σε διαφορετικούς χρόνους. Κατά την έξοδό τους, αναγνωρίζονται από έναν ανιχνευτή και τα σήματά τους καταγράφονται σε λογισμικό υπολογιστή και μετατρέπονται σε ένα γράφημα που ονομάζεται χρωματογράφημα.



Εικόνα 12: Χρωματογράφημα HPLC. Οι κορυφές από τα αριστερά προς τα δεξιά αντιστοιχούν στη γλυκόζη, ξυλόζη, γαλακτόζη, αραβινόζη, μαννόζη

Πίνακας 3: Συνθήκες υγροχρωματογραφικής ανάλυσης για κάθε στήλη

	Aminex HPX 87H	Aminex HPX 87P
Ροή κινητής φάσης	0.6 mL/min	0.6 mL/min
Θερμοκρασία	50 °C	85 °C
Διαλύτης	0.3 g/L H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	Υπερκάθαρο νερό

Για τον προσδιορισμό των σακχάρων και του οξικού οξέος πριν και μετά την όξινη υδρόλυση, τα προς ανάλυση δείγματα προετοιμάστηκαν με τους παρακάτω τρόπους:

Πριν την όξινη υδρόλυση: Σε erpendorf των 1.5 mL, 167 μικρή ποσότητα υγρού κλάσματος αραιώνεται τρεις φορές με υπερκάθαρο νερό. Το αραιωμένο δείγμα φιλτράρεται με φιλτράκια σύριγγας των 0.45 μm, εισάγεται σε vials και αναλύεται στο HPLC.

Μετά την όξινη υδρόλυση: Σε erpendorf των 1.5 mL, εισάγονται 500 μL από το όξινο υδρόλυμα, φιλτράρονται με φιλτράκια σύριγγας των 0.45 μm, εισάγονται σε vials και αναλύονται στο HPLC.

Ποσοτικός προσδιορισμός σακχάρων και οξικού οξέος: Για τον ποσοτικό προσδιορισμό των επιθυμητών συστατικών από τα χρωματογραφήματα, χρησιμοποιήθηκε το λογισμικό LC-Solution στο οποίο υπολογίστηκαν τα εμβαδά της κάθε κορυφής. Για τη μετατροπή των εμβαδών σε συγκεντρώσεις, αλλά και για την αντιστοίχιση της κάθε κορυφής σε ένα μόνο συστατικό είναι απαραίτητη η κατασκευή καμπυλών αναφοράς για καθένα από αυτά. Για τις καμπύλες των σακχάρων χρησιμοποιήθηκαν εμπορικά σκευάσματα και με κατάλληλες αραιώσεις με υπερκάθαρο νερό, σχηματίστηκαν διαλύματα συγκεντρώσεων 5 mg/mL, 2 mg/mL, 1 mg/mL, 0.5 mg/mL, 0.4 mg/mL, 0.2 mg/mL, 0.1 mg/mL, ενώ για την καμπύλη του οξικού οξέος οι συγκεντρώσεις ήταν 5 mg/mL, 2 mg/mL, 1 mg/mL, 0.5 mg/mL, 0.2 mg/mL. Από τα πρότυπα διαλύματα, λήφθηκαν 500 μL και έγινε ανάλυσή τους στο HPLC. Από αυτήν την ανάλυση, προσδιορίστηκε ο χρόνος κατακράτησής τους και έγινε η συσχέτιση μεταξύ του εμβαδού των κορυφών τους και της συγκέντρωσής τους.

Πίνακας 4: Συντελεστές συσχέτισης εμβαδού - συγκέντρωσης και χρόνοι κατακράτησης των σακχάρων και του οξικού οξέος που προέκυψαν από την ανάλυση των πρότυπων διαλυμάτων τους στο HPLC

Συστατικό	Συντελεστής συσχέτισης	Χρόνος έκλουσης (min)
Γλυκόζη (P-στήλη)	0.0000182	13.483-13.537
Ξυλόζη (P-στήλη)	0.0000182	14.682-14.730
Γαλακτόζη (P-στήλη)	0.0000293	15.559-15.584
Αραβινόζη (P-στήλη)	0.0000194	16.980-17.023
Μαννόζη (P-στήλη)	0.0000184	18.091-18.163
Οξικό οξύ (H-στήλη)	0.0000006	15.140-15.234

Ο υπολογισμός της συγκέντρωσης των σακχάρων και του οξικού οξέος σε γραμμάρια ανά λίτρο υγρού κλάσματος (g/L<sub>liquid fraction</sub>) έγινε με τη χρήση της σχέσης:

$$\text{Συγκέντρωση συστατικού} = \text{Συντελεστής συσχέτισης} \cdot \text{Εμβαδόν κορυφής} \cdot \text{Αραιώση}$$

## 2.2.7 Ανίχνευση φαινολικών ενώσεων στα υγρά κλάσματα

Η ανίχνευση της ποσότητας των φαινολικών ενώσεων στα υγρά κλάσματα. Το αντιδραστήριο Folin περιέχει, μεταξύ άλλων, μολυβδαίνιο και βολφράμιο, που βρίσκονται σε κατάσταση οξειδωσης. Όταν έρθουν σε επαφή με φαινολικές ενώσεις, ανάγονται με αποτέλεσμα την παραγωγή μπλε χρώματος, λόγω του σχηματισμού του μπλε του μολυβδαινίου και του μπλε του βολφραμίου, το οποίο απορροφά στα 765 nm.

12.5 mL υγρού κλάσματος εισάγονται σε erpendorf μαζί με 0.5 mL αντιδραστηρίου Folin 1:10 (v/v), και αφήνονται να ηρεμήσουν σε θερμοκρασία δωματίου για 3 λεπτά. Στη συνέχεια, προστίθεται 0.5 mL υδατικού διαλύματος  $\text{Na}_2\text{CO}_3$  7.5% (w/v), το μίγμα αναδεύεται και τοποθετείται στον θερμαινόμενο επωαστήρα για erpendorf στους 45 °C για 15 λεπτά. Ακολουθεί φωτομέτρηση του δείγματος στα 765 nm. Αν η τιμή απορρόφησης του δείγματος είναι μεγαλύτερη 0.8, τότε το δείγμα αραιώνεται και φωτομετρείται ξανά, ώστε η τιμή της απορρόφησης να είναι αξιόπιστη. Για τον προσδιορισμό της συγκέντρωσης των φαινολικών ενώσεων στο υγρό κλάσμα, κατασκευάζεται καμπύλη αναφοράς απορρόφησης-συγκέντρωσης γαλλικού οξέος (Gallic acid, GA) και το τελικό αποτέλεσμα εκφράζεται ως g GA-equivalent/Liquid fraction. Για την κατασκευή της καμπύλης, χρησιμοποιήθηκαν υδατικά διαλύματα γαλλικού οξέος σε συγκεντρώσεις 0.2 g/L, 0.4 g/L, 0.6 g/L, 0.8 g/L. Η συσχέτιση που προέκυψε είναι:

$$\text{Συγκέντρωση GA} = 0.8888 \cdot \text{Απορρόφηση}$$

Για τον υπολογισμό της συγκέντρωσης των φαινολικών ενώσεων, χρησιμοποιήθηκε η επόμενη σχέση:

$$\text{Συγκέντρωση φαινολικών ενώσεων} = 0.8888 \cdot \text{Απορρόφηση} \cdot \text{Αραίωση}$$

## 2.2.8 Ενζυμική υδρόλυση

Για τον σχηματισμό ολιγοσακχαριτών χαμηλότερου βαθμού πολυμερισμού χρησιμοποιείται ενδοξυλανάση της οικογένειας GH30. Η αντίδραση που πραγματοποιείται για τη μελέτη της δράσης του ενζύμου, γίνεται σε θερμοκρασία 50 °C και σε pH=5 με τη βοήθεια buffer  $\text{CH}_3\text{COONa}$  60 mM, ενώ λαμβάνεται δείγμα στις 0, 2 και 4 ώρες. Η ποσότητα ενζύμου που προστίθεται στην αντίδραση είναι 15 mg ενδοξυλανάσης GH30 ανά g ξυλοολιγοσακχαριτών.

Για την ποσοτικοποίηση της ξυλόζης και των ολιγοσακχαριτών με βαθμό πολυμερισμού 2-6, παρασκευάζονται διαλύματα των αντίστοιχων σακχάρων συγκέντρωσης 0.125 mM, 0.250 mM και 0.500 mM. Ωστόσο, μόνο η ξυλοβιόζη

εμφανίζει γραμμική συσχέτιση σε αυτές τις συγκεντρώσεις, η οποία και είναι η παρακάτω:

$$\text{Ξυλοβιόζη} \left( \frac{g}{L} \right) = \frac{\text{Εμβαδόν κορυφής}}{351429} \cdot \text{Αραίωση} \cdot \text{Μοριακό βάρος Ξυλοβιόζης}$$

Η ανίχνευση των σακχάρων γίνεται με ιοντική χρωματογραφία ΗΡΑΕC-PAD.

## 3 Αποτελέσματα

---

Σε αυτήν την ενότητα, εκτός από το είδος των σακχάρων και τον βαθμό πολυμερισμού των ολιγοσακχαριτών κάθε υποστρώματος, θα αναλυθεί, επίσης, η επίδραση των διαφορετικών συνθηκών προκατεργασίας ξύλων οξιάς και πεύκου, στην ποσότητα των ολιγοσακχαριτών, αλλά και στην ποσότητα του οξικού και του γλυκουρονικού οξέος των δειγμάτων βιομάζας, που απελευθερώθηκε στο υγρό κλάσμα μετά την προκατεργασία τους. Αυτή η ποσότητα εκφράζεται σε μιλιγραμμάρια συστατικού ανά γραμμάριο (mg/g) αρχικής ακατέργαστης βιομάζας. Επειδή οι αναλυτικές τεχνικές που εφαρμόστηκαν, επιτρέπουν τον προσδιορισμό της συγκέντρωσης αυτών των συστατικών στο υγρό κλάσμα, για τον υπολογισμό της ποσότητάς τους χρησιμοποιείται η παρακάτω εξίσωση:

$$C_{biomass} \left( \frac{mg}{g} \right) = \frac{C \cdot V}{m}$$

Όπου:

- C: συγκέντρωση συστατικού (g/L<sub>liquid fraction</sub>)
- V: αρχικός όγκος υγρού κλάσματος (mL<sub>liquid fraction</sub>)
- m: αρχική μάζα δείγματος (50 g)

Οι συνθήκες προκατεργασίας του κάθε δείγματος ξύλου, φαίνονται στον πίνακα 1 της υποενότητας 2.1.6 και οι συντελεστές συσχέτισης των σακχάρων παρουσιάζονται στον πίνακα 4 της υποενότητας 2.2.6. Πιο συγκεκριμένα, οι παράμετροι που θα μελετηθούν είναι ο οργανικός διαλύτης, η θερμοκρασία, η πίεση οξυγόνου, η χρήση οξέος αντί οξυγόνου και ο χρόνος προκατεργασίας:

- ❖ Διαλύτες: Ακετόνη (acetone, ACO), αιθανόλη (ethanol, EtOH), τετραϋδροφουράνιο (tetrahydrofurane, THF)
- ❖ Θερμοκρασίες: 150 °C, 160 °C, 175 °C
- ❖ Πιέσεις οξυγόνου: 8 bar, 12 bar, 16 bar
- ❖ 1% θειικό οξύ (1% H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>)
- ❖ Χρόνοι προκατεργασίας: 60 min, 120 min

Επίσης, θα μελετηθεί η επίδραση της ενδοξυλανάσης GH30 στη μείωση του βαθμού πολυμερισμού των ολιγοσακχαριτών που περιέχονται στο υγρό κλάσμα προκατεργασίας ενός δείγματος οξιάς, ώστε να κατανοηθεί ο μηχανισμός δράσης.



### 3.1 Φαινολικές ενώσεις

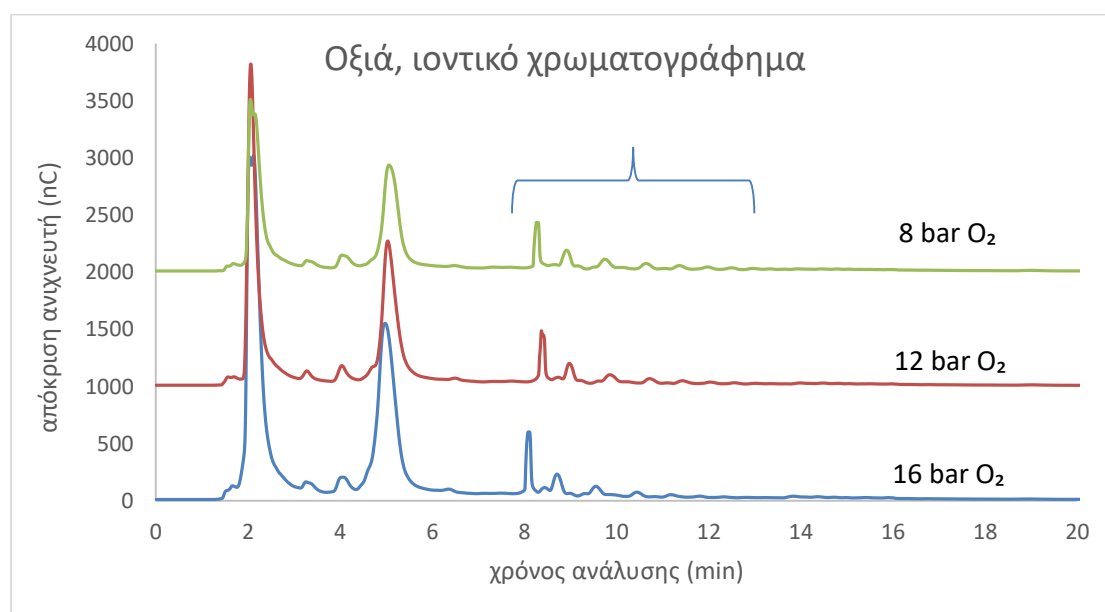
Πίνακας 5: Ποσότητα φαινολικών ενώσεων στα υγρά κλάσματα υγρών κλασμάτων προκατεργασίας των δειγμάτων οξιάς και πεύκου πριν και μετά την αποτοξικοποίησή τους

Αριθμός δείγματος	Ποσότητα ενεργού άνθρακα	Ποσότητα φαινολικών ενώσεων πριν την αποτοξικοποίηση	Ποσότητα φαινολικών ενώσεων μετά την αποτοξικοποίηση	Απομάκρυνση φαινολικών ενώσεων
	% w/v	mg GA-eq./g	mg GA-eq./g	%
1	7,5	10,28	0,30	97,0
2	5	26,76	1,06	96,0
3	2,5	11,98	0,41	96,6
4	10	18,97	0,17	99,1
5	5	29,17	0,80	97,3
6	7,5	18,93	0,34	98,2
7	5	29,30	0,37	98,7
8	2,5	13,78	0,34	97,5
9	2,5	18,08	0,43	97,6
10	2,5	22,86	1,21	94,7
11	2,5	6,05	0,41	93,3
12	7,5	5,32	0,32	93,9
13	10	8,36	0,09	99,0
14	7,5	5,02	0,40	92,0
15	7,5	11,11	0,75	93,3
16	7,5	12,73	0,34	97,3
17	7,5	12,11	0,28	97,7
18	5	12,03	0,45	96,2
19	7,5	8,35	0,37	95,6
20	7,5	9,22	0,30	96,7
21	7,5	16,72	0,49	97,1
22	7,5	11,86	0,78	93,4
23	7,5	15,41	0,57	96,3
24	7,5	13,45	0,82	93,9
25	5	14,06	0,82	94,2
26	5	13,87	0,66	95,2
27	5	17,38	0,56	96,8
28	5	5,97	0,31	94,8
29	5	9,63	0,56	94,2
30	2,5	20,02	0,31	98,5
31	2,5	9,97	0,84	91,6
32	5	9,61	0,57	94,0
33	2,5	23,09	0,84	96,4

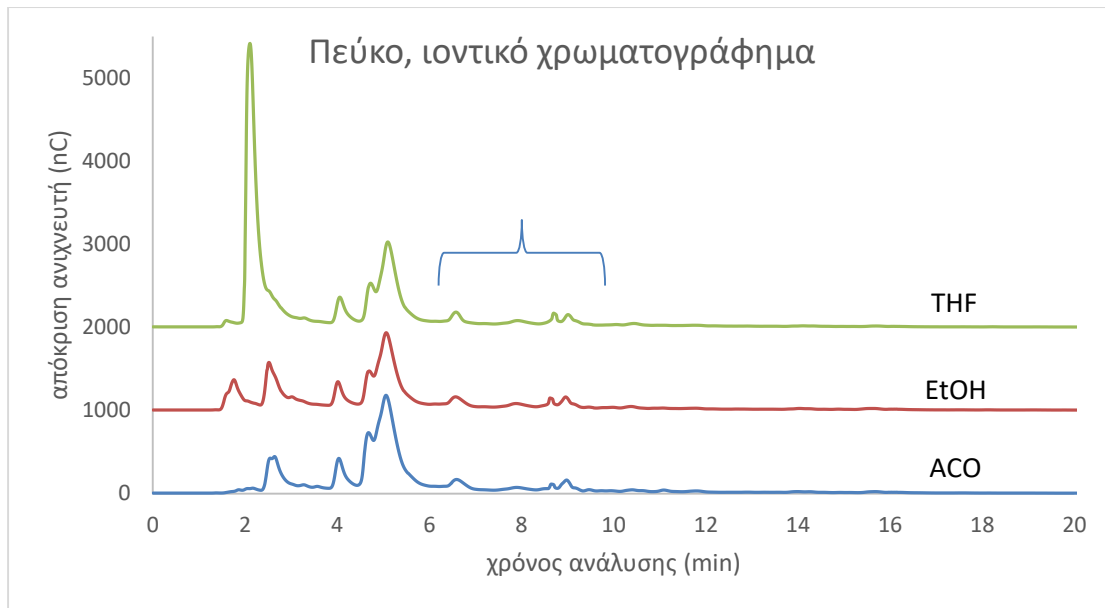
Ο βασικότερος τοξικός παρεμποδιστής στο υγρό κλάσμα της οργανολυτικής προκατεργασίας είναι οι φαινολικές ενώσεις που παράγονται από την αποικοδόμηση της λιγνίνης, κι έτσι, είναι απαραίτητη η απομάκρυνσή τους. Στον

παραπάνω πίνακα παρουσιάζονται οι ποσότητες των φαινολικών ενώσεων στα υγρά κλάσματα προκατεργασίας των δειγμάτων, πριν και μετά την αποτοξικοποίηση με ενεργό άνθρακα, καθώς και η ποσοστιαία απομάκρυνσή τους. Συγκρίνοντας, τις συνθήκες προκατεργασίας του πίνακα 1 με τις τιμές του παραπάνω πίνακα, γίνεται αντιληπτό ότι η αύξηση της θερμοκρασίας προκατεργασίας έχει ως αποτέλεσμα και την αύξηση της περιεκτικότητας του υγρού κλάσματος σε φαινολικές ενώσεις. Το ίδιο παρατηρείται και με την αντικατάσταση του  $O_2$  από  $H_2SO_4$  στα δείγματα πεύκου. Επίσης, η χρήση ACO οδηγεί στην απελευθέρωση περισσότερων φαινολικών ενώσεων από τους άλλους δύο διαλύτες με τις μικρότερες ποσότητες να παρατηρούνται με τη χρήση EtOH, ενώ είναι εμφανές ότι για την επίτευξη υψηλής απομάκρυνσης, χρησιμοποιήθηκαν διαφορετικές ποσότητες ενεργού άνθρακα σε κάθε κλάσμα. Ιδιαίτερο ενδιαφέρον παρουσιάζει το γεγονός ότι αυτές οι ποσότητες δεν εξαρτώνται από την αρχική περιεκτικότητα των κλασμάτων σε φαινολικές ενώσεις.

### 3.2 Ανίχνευση ολιγοσακχαριτών



Εικόνα 13: Χρωματογράφημα HPAEC-PAD δειγμάτων οξιάς που έχουν προκατεργαστεί με THF για 120 λεπτά στους 175 °C σε τρεις διαφορετικές πιέσεις  $O_2$



Εικόνα 14: Χρωματογράφημα HPAEC-PAD δειγμάτων πεύκου που έχουν προκατεργαστεί για 60 λεπτά στους 175 °C σε πίεση 16 bar O<sub>2</sub> με τρεις διαφορετικούς διαλύτες

Οι δύο παραπάνω εικόνες χρωματογραφημάτων HPAEC-PAD, επιβεβαιώνουν την ύπαρξη ολιγοσακχαριτών στα υγρά κλάσματα οργανολυτικής προκατεργασίας των δειγμάτων οξιάς και πεύκου και είναι αντιπροσωπευτικά του συνόλου των δειγμάτων κάθε υποστρώματος. Οι κορυφές που αντιστοιχούν στους ξυλοολιγοσακχαρίτες της οξιάς και στους μαννοολιγοσακχαρίτες του πεύκου περικλείονται στις αγκύλες και ο βαθμός πολυμερισμού τους αυξάνεται από τα αριστερά προς τα δεξιά. Στην περίπτωση της οξιάς, όσο χαμηλότερος είναι ο βαθμός πολυμερισμού τόσο δυσκολότερη είναι η ανίχνευση των ολιγοσακχάρων, ενώ οι ολιγοσακχαρίτες με βαθμό πολυμερισμού μεγαλύτερο από 7 δεν μπορούν να ανιχνευθούν. Από την άλλη, στα υγρά κλάσματα των δειγμάτων πεύκου, ανιχνεύεται κυρίως μαννοτριόζη και μαννοτετραόζη.

### 3.3 Είδος σακχάρων σε κάθε υπόστρωμα

Πίνακας 6: Ποσότητα των επιμέρους μονοσακχάρων και ολιγοσακχάρων των δειγμάτων ξύλου οξιάς στο υγρό κλάσμα (Γλυκ.=Γλυκόζη, Ξυλ.=Ξυλόζη, Γαλ.=Γαλακτόζη, Αραβ.=Αραβινόζη, Μαν.=Μαννόζη)

Οργανικός διαλύτης	Αριθμός δείγματος	Μονοσάκχαρα (mg/g αρχικής βιομάζας)					Ολιγοσάκχαρα (mg/g αρχικής βιομάζας)				
		Γλυκ.	Ξυλ.	Γαλ.	Αραβ.	Μαν.	Γλυκ.	Ξυλ.	Γαλ.	Αραβ.	Μαν.
ACO	1	0,5	1,6	1,7	2,8	trace	1,8	24,8	5,7	0,2	0,8
	2	1,3	18,5	5,0	4,3	0,3	3,9	57,7	8,7	trace	3,0
	3	0,2	0,2	trace	0,1	0,2	0,8	15,6	2,4	0,1	0,5
	4	1,6	16,0	5,1	trace	0,7	3,7	24,6	4,7	3,2	1,9
	5	4,5	34,5	4,2	trace	trace	3,6	26,3	5,7	2,4	6,1
	6	3,1	37,4	1,5	trace	trace	3,0	33,9	1,2	trace	17,5
	7	2,1	16,8	4,2	trace	trace	4,7	45,3	5,0	2,3	2,5
	8	1,1	14,7	4,7	3,5	1,7	2,3	24,1	4,2	trace	0,8

	9	2,2	28,2	6,8	3,5	1,2	1,9	30,6	5,9	0,3	0,8
	10	3,9	48,0	8,7	3,6	4,0	1,4	19,2	3,9	0,1	1,0
	11	0,5	0,3	0,8	1,3	0,5	0,9	12,5	4,4	1,1	0,6
EtOH	12	0,5	0,7	1,0	1,3	2,4	1,5	20,9	5,1	1,7	4,7
	13	0,8	7,8	4,7	0,9	2,3	6,0	51,3	2,8	0,1	5,7
	14	0,6	0,8	1,2	1,9	trace	1,7	21,3	4,8	0,9	trace
	15	0,9	6,3	4,5	1,9	trace	2,5	46,0	3,5	0,1	trace
	16	1,8	23,2	2,1	0,9	trace	3,1	37,3	6,4	trace	10,3
	17	1,7	19,7	0,7	0,8	0,2	2,7	46,6	5,8	0,3	9,4
	18	1,0	11,3	7,5	1,1	0,1	3,1	57,9	0,7	0,2	10,3
THF	19	0,4	0,8	trace	0,7	3,2	4,9	32,8	3,0	trace	9,2
	20	0,5	2,4	0,6	0,6	3,2	2,7	45,1	2,3	0,1	11,3
	21	1,1	12,8	1,2	0,5	3,9	4,0	64,3	2,3	0,1	14,3
	22	0,4	3,7	trace	0,1	3,1	7,0	74,8	3,2	trace	12,8
	23	0,7	12,3	1,4	0,4	3,7	3,6	55,7	2,1	0,1	12,1
	24	3,2	33,0	2,4	trace	5,9	2,6	35,8	0,2	trace	11,0
	25	1,6	22,0	2,2	trace	5,2	2,9	45,1	1,9	trace	11,4
	26	0,7	14,5	2,1	trace	5,1	1,9	21,5	0,2	trace	16,4

Πίνακας 7: Ποσότητα των επιμέρους μονοσακχάρων και ολιγοσακχάρων των δειγμάτων ξύλου πεύκου στο υγρό κλάσμα (Γλυκ.=Γλυκόζη, Ξυλ.=Ξυλόζη, Γαλ.=Γαλακτόζη, Αραβ.=Αραβινόζη, Μαν.=Μαννόζη)

Οργανικός διαλύτης	Αριθμός δείγματος	Μονοσάκχαρα (mg/g αρχικής βιομάζας)					Ολιγοσάκχαρα (mg/g αρχικής βιομάζας)				
		Γλυκ.	Ξυλ.	Γαλ.	Αραβ.	Μαν.	Γλυκ.	Ξυλ.	Γαλ.	Αραβ.	Μαν.
ACO	27	15,9	25,2	12,8	4,5	21,4	3,1	0,1	5,5	2,5	28,9
EtOH	28	6,7	13,4	10,6	1,5	trace	4,6	3,7	1,2	1,1	32,7
THF	29	9,1	16,9	3,4	0,6	9,3	4,2	0,9	3,4	trace	32,8
ACO (1% H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> )	30	32,6	15,5	9,3	2,2	25,5	0,9	0,9	0,6	0,2	16,3
EtOH	31	10,0	19,3	13,3	0,5	12,9	8,9	0,9	1,1	3,3	46,8
THF	32	13,8	15,0	4,7	0,1	15,3	1,2	0,2	1,6	0,7	24,5
ACO (1% H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> )	33	37,4	11,6	9,7	2,1	20,6	trace	0,5	2,8	0,7	0,2

Στους παραπάνω πίνακες απεικονίζονται οι ποσότητες των διαφορετικών ειδών μονοσακχάρων και ολιγοσακχάρων που υπάρχουν στα δείγματα ξύλου οξιάς και πεύκου. Είναι εμφανές, ότι το ξύλο οξιάς περιέχει ως επί το πλείστον ξυλοολιγοσακχαρίτες, και το ξύλο πεύκου μαννοολιγοσακχαρίτες, με την αραβινόζη βρίσκεται σε μικρές ποσότητες σε όλα τα δείγματα. Αυτό είναι αναμενόμενο, αφού το ξύλο οξιάς κατατάσσεται στα πλατύφυλλα ξύλα, των οποίων η ημικυτταρίνη περιέχει κατά κύριο λόγο ξυλόζη, και το ξύλο πεύκου στα κωνοφόρα, που η μαννόζη αποτελεί το βασικό σάκχαρο της ημικυτταρίνης τους. Σε αντίθεση με τα δείγματα οξιάς, στα δείγματα πεύκου η γλυκόζη, η ξυλόζη και η γαλακτόζη συμμετέχουν σε σημαντικό βαθμό στον συνολικό αριθμό σακχάρων, αλλά όσον αφορά μόνο τους

ολιγοσακχαρίτες, οι μαννοολιγοσακχαρίτες αποτελούν τη συντριπτική πλειονότητα. Είναι σημαντικό να τονιστεί, ότι ένα μέρος της γλυκόζης προέρχεται από την υδρόλυση της κελλοβιόζης, της δομικής μονάδας της κυτταρίνης των ξύλων.

Πίνακας 8: Ποσότητα των συνολικών μονοσακχάρων και ολιγοσακχάρων και αντίστοιχη ανάκτηση ημικυτταρίνης στο υγρό κλάσμα των δειγμάτων οξιάς

Αριθμός δείγματος	Μονοσάκχαρα		Ολιγοσάκχαρα	
	Ποσότητα (mg/g αρχικής βιομάζας)	Ανάκτηση ημικυτταρίνης (%)	Ποσότητα (mg/g αρχικής βιομάζας)	Ανάκτηση ημικυτταρίνης (%)
1	6,5	3,1	33,3	16,0
2	29,4	14,1	73,4	35,2
3	0,7	0,4	19,5	9,3
4	23,3	11,2	38,0	18,3
5	43,3	20,8	44,2	21,2
6	42,0	20,2	55,6	26,7
7	23,1	11,1	59,8	28,7
8	25,7	12,3	31,4	15,1
9	41,9	20,1	39,6	19,0
10	68,2	32,8	25,7	12,3
11	3,4	1,6	19,5	9,4
12	5,9	2,8	34,0	16,3
13	16,5	7,9	65,8	31,6
14	4,5	2,2	28,7	13,8
15	13,7	6,6	52,1	25,0
16	27,9	13,4	57,0	27,4
17	23,1	11,1	64,8	31,1
18	21,0	10,1	72,3	34,7
19	5,2	2,5	50,0	24,0
20	7,3	3,5	61,6	29,6
21	19,5	9,4	84,9	40,8
22	7,2	3,5	97,8	47,0
23	18,5	8,9	73,6	35,4
24	44,6	21,4	49,7	23,9
25	31,0	14,9	61,3	29,4
26	22,4	10,8	40,0	19,2

Πίνακας 9: Ποσότητα των συνολικών μονοσακχάρων και ολιγοσακχάρων και αντίστοιχη ανάκτηση ημικυτταρίνης στο υγρό κλάσμα των δειγμάτων οξιάς

Αριθμός δείγματος	Μονοσάκχαρα		Ολιγοσάκχαρα	
	Ποσότητα (mg/g αρχικής βιομάζας)	Ανάκτηση ημικυτταρίνης (%)	Ποσότητα (mg/g αρχικής βιομάζας)	Ανάκτηση ημικυτταρίνης (%)
27	79,8	39,8	40,1	20,0
28	32,2	16,1	43,3	21,6
29	39,4	19,6	41,5	20,7
30	84,9	42,3	18,8	9,4
31	56,0	27,9	60,9	30,4

<b>32</b>	48,9	24,4	28,3	14,1
<b>33</b>	81,5	40,7	4,2	2,1

Ο παραπάνω πίνακας, εκτός από την ποσότητα των μονοσακχάρων και των ολιγοσακχάρων, παρουσιάζει, επίσης, την ανάκτηση ημικυτταρίνης, δηλαδή το ποσοστό της ημικυτταρίνης που βρίσκεται διαλυμένο στο υγρό κλάσμα της προκατεργασίας των δειγμάτων με τη μορφή μονοσακχάρων και ολιγοσακχάρων. Για τον υπολογισμό της ανάκτησης της ημικυτταρίνης, χρησιμοποιήθηκε η παρακάτω εξίσωση:

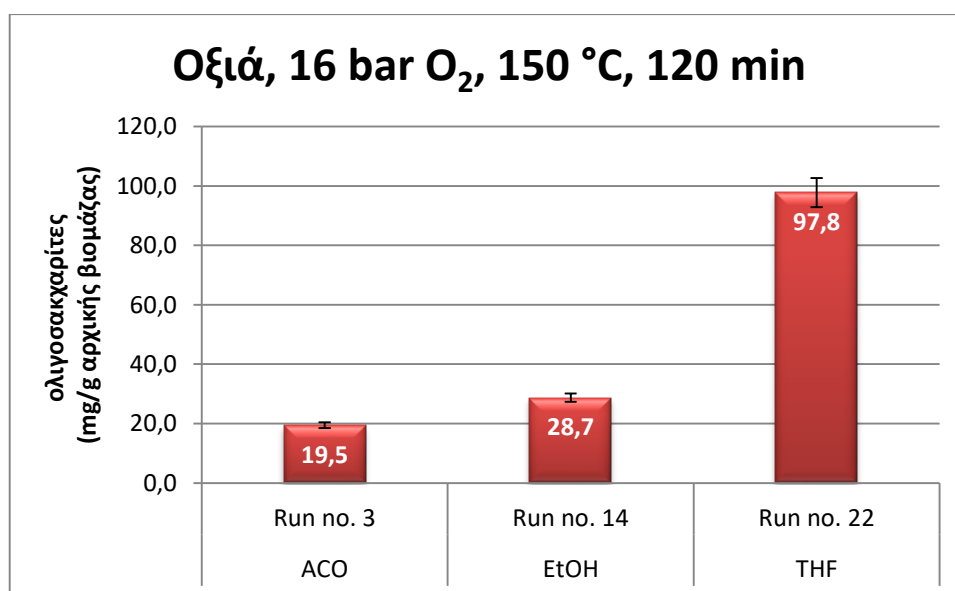
$$\% \text{ Ανάκτηση ημικυτταρίνης} = \frac{C \cdot V}{m \cdot 1000 \cdot x \cdot D} \cdot 100$$

Όπου:

- x: ποσοστό ημικυτταρίνης στο δείγμα (0.191 στα δείγματα οξιάς και 0.184 στα δείγματα πεύκου)
- D: συντελεστής μετατροπής της ημικυτταρίνης σε σάκχαρα (1.09)

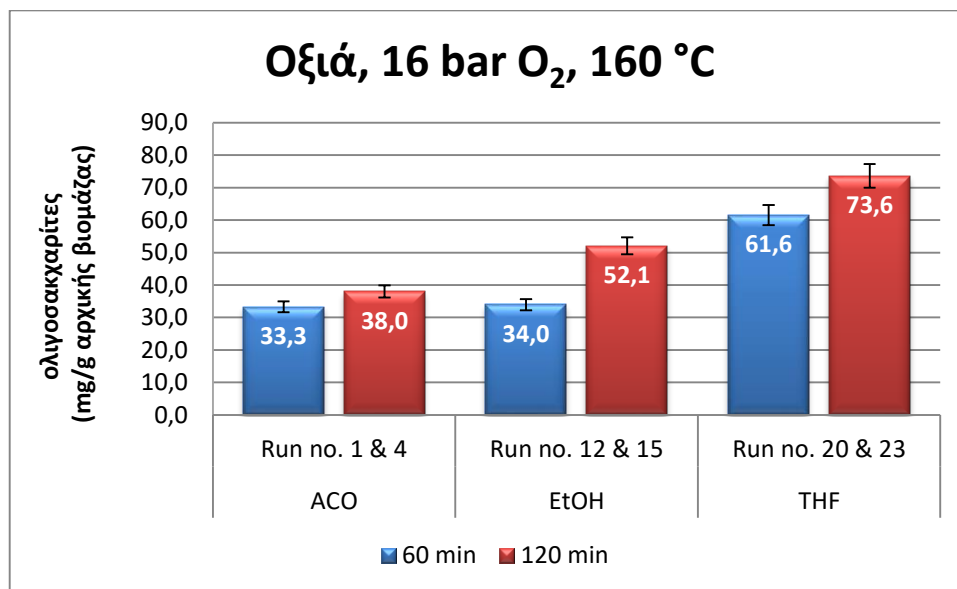
### 3.4 Ποσότητα ολιγοσακχαριτών από διαφορετικές συνθήκες προκατεργασίας

#### 3.4.1 Επίδραση του οργανικού διαλύτη στην ανάκτηση ολιγοσακχαριτών



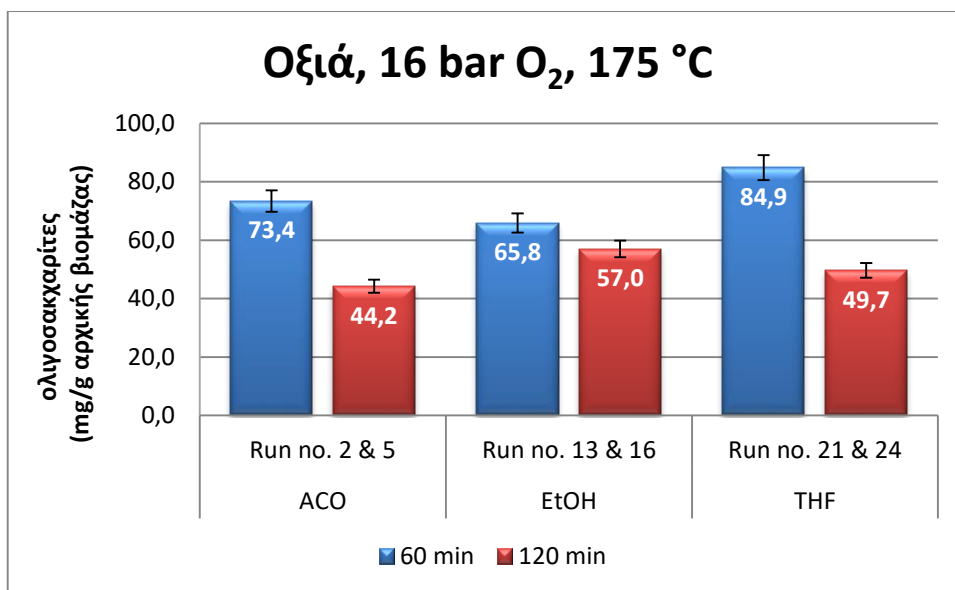
Διάγραμμα 1: Ποσότητα ολιγοσακχαριτών στο υγρό κλάσμα προκατεργασμένου ξύλου οξιάς σε πίεση 16 bar O<sub>2</sub>, θερμοκρασία 175 °C και για χρόνο προκατεργασίας 120 min με τη χρήση διαφορετικών διαλυτών

Από το παραπάνω διάγραμμα είναι εμφανές ότι η χρήση THF στην προκατεργασία ξύλου οξιάς οδηγεί σε πολύ μεγαλύτερη ποσότητα ολιγοσακχαριτών στο υγρό κλάσμα από ότι η χρήση ACO ή EtOH, όταν η πίεση προκατεργασίας είναι 16 bar O<sub>2</sub>, η θερμοκρασία είναι 150 °C και ο χρόνος είναι 120 λεπτά, καθιστώντας το τον ιδανικό διαλύτη σε αυτές τις συνθήκες.



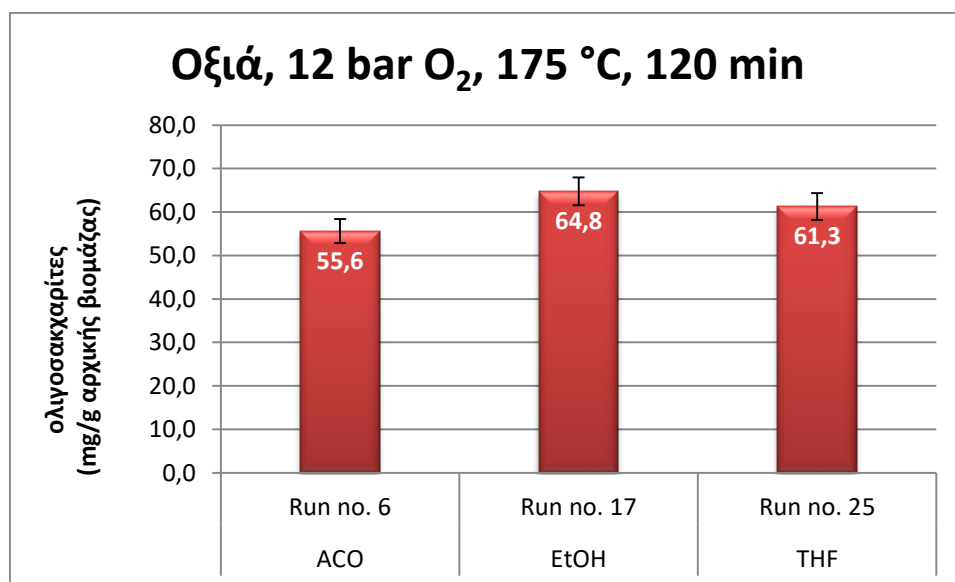
Διάγραμμα 2: Ποσότητα ολιγοσακχαριτών στο υγρό κλάσμα προκατεργασμένου ξύλου οξιάς σε πίεση 16 bar O<sub>2</sub>, θερμοκρασία 160 °C και για χρόνο προκατεργασίας 60 και 120 min με τη χρήση διαφορετικών διαλυτών

Από το παραπάνω διάγραμμα παρατηρείται, ότι, όταν η προκατεργασία ξύλου οξιάς πραγματοποιείται υπό πίεση 16 bar O<sub>2</sub>, σε θερμοκρασία 160 °C για 60 λεπτά, η ποσότητα των ολιγοσακχαριτών στο υγρό κλάσμα είναι μεγαλύτερη στην περίπτωση που χρησιμοποιείται THF και μικρότερη στην περίπτωση που χρησιμοποιείται EtOH ή ACO. Ωστόσο, αν ληφθεί υπόψη το πειραματικό σφάλμα κατά τον υπολογισμό των εμβαδών των κορυφών των αντίστοιχων χρωματογραφημάτων, η διαφορά στην ποσότητα των ολιγοσακχαριτών στις περιπτώσεις της EtOH και της ACO δεν είναι στατιστικά σημαντική. Με την αύξηση του χρόνου προκατεργασίας στα 120 min, δεν αλλάζει η συσχέτιση μεταξύ των τριών διαλυτών, αλλά σε κάθε περίπτωση αυξάνεται η ποσότητα των ολιγοσακχαριτών, με τη μεγαλύτερη αύξηση να παρατηρείται στην EtOH και την μικρότερη στην ACO.



Διάγραμμα 3: Ποσότητα ολιγοσακχαριτών στο υγρό κλάσμα προκατεργασμένου ξύλου οξιάς σε πίεση 16 bar O<sub>2</sub>, θερμοκρασία 175 °C και για χρόνο προκατεργασίας 60 και 120 min με τη χρήση διαφορετικών διαλυτών

Από το διάγραμμα 3 προκύπτει ότι η χρήση THF έχει ως αποτέλεσμα μεγαλύτερη ποσότητα απελευθερωμένων ολιγοσακχαριτών στο υγρό κλάσμα προκατεργασίας από ότι η χρήση ACO ή EtOH, όταν η υδρόλυση γίνεται για 60 λεπτά υπό πίεση 16 bar O<sub>2</sub>, στους 175 °C. Η αύξηση του χρόνου προκατεργασίας, επιδρά αρνητικά στην ποσότητα των ολιγοσακχαριτών, με τη μεγαλύτερη ποσότητα να εμφανίζεται με τη χρήση EtOH αντί για THF. Αυτή η μείωση ίσως οφείλεται σε καταστροφή ολιγοσακχαριτών εξαιτίας των έντονων συνθηκών προκατεργασίας.

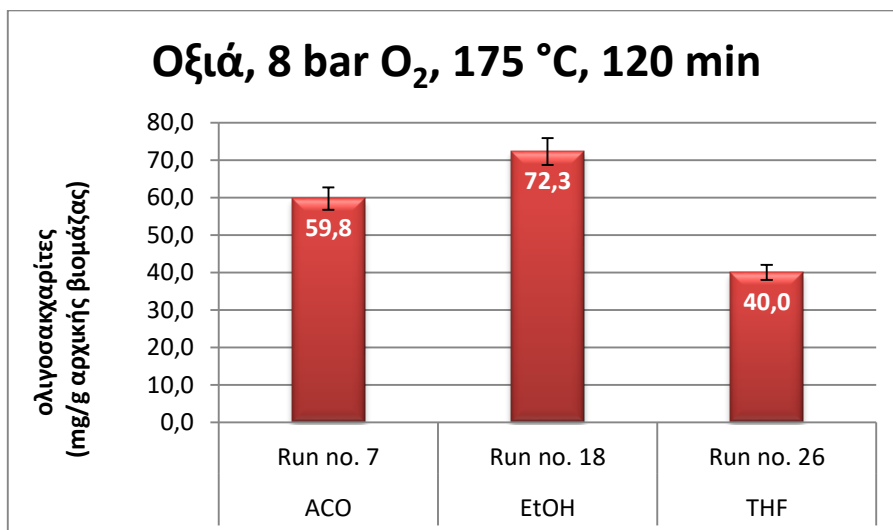


Διάγραμμα 4: Ποσότητα ολιγοσακχαριτών στο υγρό κλάσμα προκατεργασμένου ξύλου οξιάς σε πίεση 12 bar O<sub>2</sub>, θερμοκρασία 175 °C και για χρόνο προκατεργασίας 120 min με τη χρήση διαφορετικών διαλυτών

Σύμφωνα με το παραπάνω διάγραμμα, η επίδραση των διαλυτών ACO, EtOH και THF στην ποσότητα των ολιγοσακχαριτών στο υγρό κλάσμα, όταν η προκατεργασία

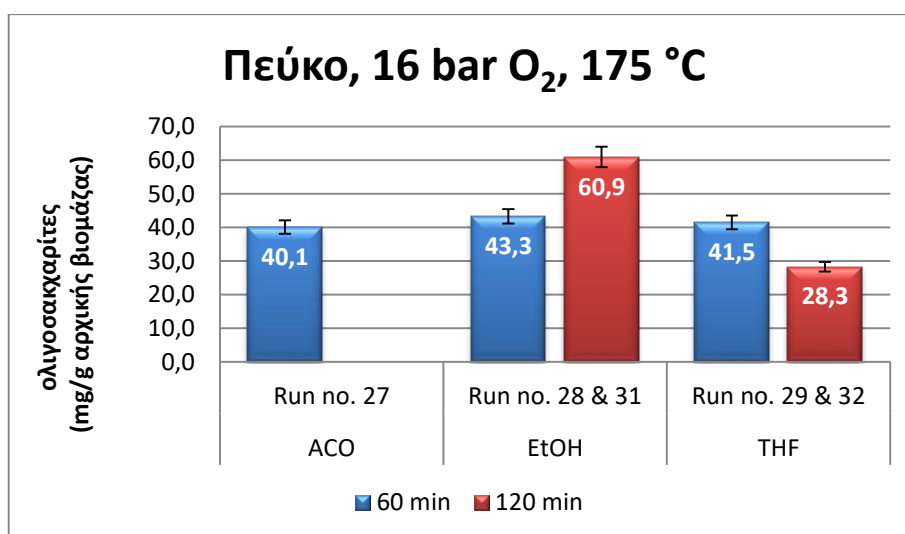


ξύλου οξιάς πραγματοποιείται στους 175 °C, για 120 λεπτά και σε πίεση 12 bar O<sub>2</sub>, ακολουθεί την ίδια συμπεριφορά με αυτήν που απεικονίζεται στο διάγραμμα 3 για τις ίδιες συνθήκες θερμοκρασίας και χρόνου, αλλά σε πίεση 16 bar O<sub>2</sub>. Πιο συγκεκριμένα, η μεγαλύτερη συγκέντρωση παρατηρείται στην EtOH, έπειτα στο THF και, τέλος, στην ACO.



Διάγραμμα 5: Ποσότητα ολιγοσακχαριτών στο υγρό κλάσμα προκατεργασμένου ξύλου οξιάς σε πίεση 8 bar O<sub>2</sub>, θερμοκρασία 175 °C και για χρόνο προκατεργασίας 120 min με τη χρήση διαφορετικών διαλυτών

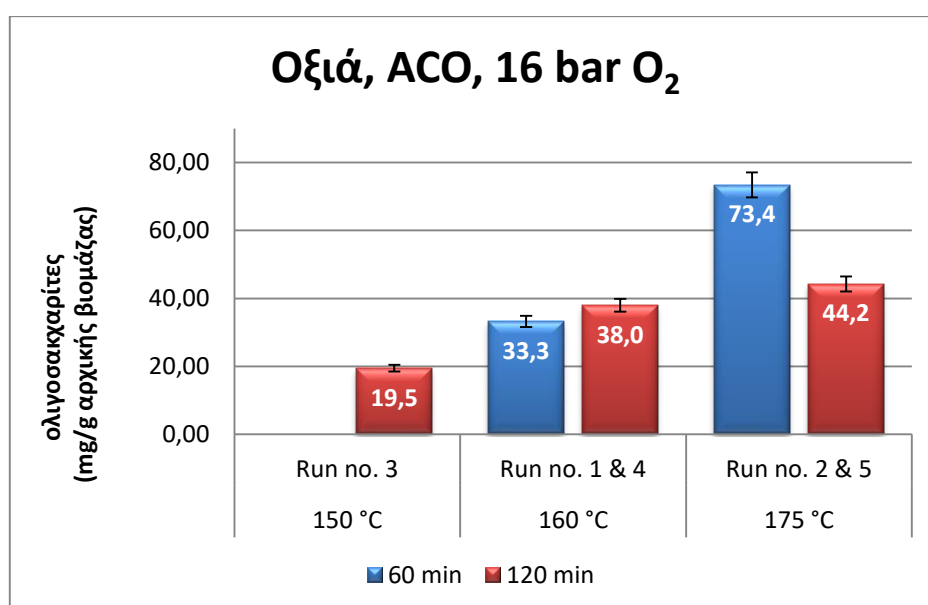
Από το διάγραμμα 5, γίνεται αντιληπτό, ότι από την προκατεργασία ξύλου οξιάς για 120 λεπτά, στους 175 °C και σε πίεση 8 bar O<sub>2</sub>, προκύπτει μεγαλύτερη συγκέντρωση ολιγοσακχαριτών όταν ως οργανικός διαλύτης χρησιμοποιείται η EtOH. Σε αντίθεση, όμως, με τις περιπτώσεις των διαγραμμάτων 3 και 4, στις οποίες η μόνη διαφορά είναι η πίεση προκατεργασίας (16 και 12 bar O<sub>2</sub> αντίστοιχα), η χρήση ACO οδηγεί σε υψηλότερη συγκέντρωση ολιγοσακχαριτών από τη χρήση THF.



Διάγραμμα 6: Ποσότητα ολιγοσακχαριτών στο υγρό κλάσμα προκατεργασμένου ξύλου πεύκου σε πίεση 16 bar O<sub>2</sub>, θερμοκρασία 175 °C και για χρόνο προκατεργασίας 60 και 120 min με τη χρήση διαφορετικών διαλυτών

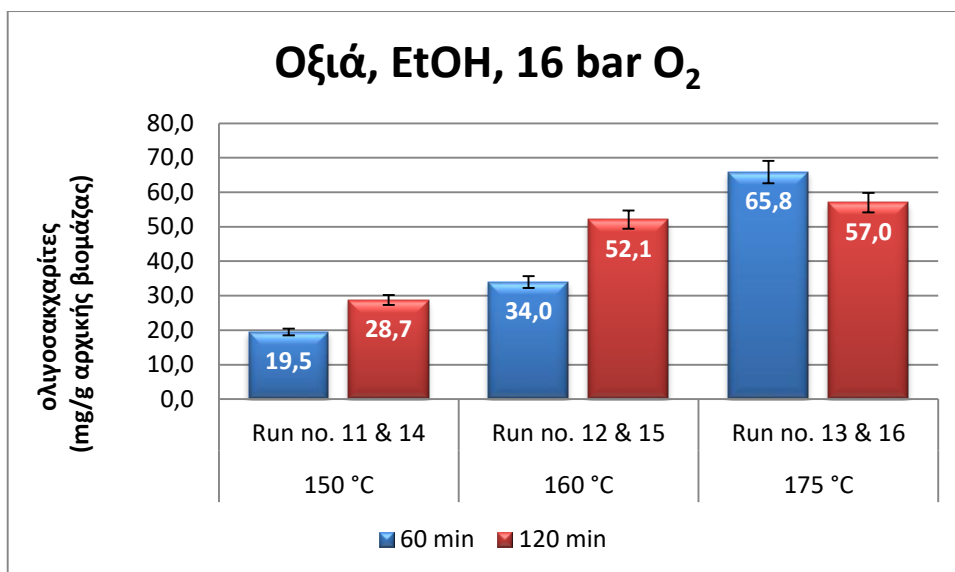
Το διάγραμμα 6 απεικονίζει την επίδραση που έχει στην ποσότητα των ολιγοσακχαριτών, η χρήση ACO, EtOH και THF ως οργανικό διαλύτη κατά την προκατεργασία δειγμάτων πεύκου σε πίεση 16 bar O<sub>2</sub>, θερμοκρασία 175 °C για χρόνο 60 και 120 λεπτά. Για 60 λεπτά προκατεργασίας, με τη χρήση EtOH απελευθερώνεται μεγαλύτερη ποσότητα ολιγοσακχαριτών στο υγρό κλάσμα σε σχέση με αυτήν που προκύπτει με τη χρήση THF και ACO, χωρίς, όμως, να υπάρχει στατιστικά σημαντική διαφορά. Για 120 λεπτά προκατεργασίας, η χρήση EtOH είναι πολύ πιο αποτελεσματική από τη χρήση THF ως προς την παραγωγή ολιγοσακχαριτών. Επίσης, η παραγόμενη ποσότητα μειώνεται στην περίπτωση του THF σε σχέση με αυτήν των 60 λεπτών, σε αντίθεση με την περίπτωση της EtOH.

### 3.4.2 Επίδραση της θερμοκρασίας στην ανάκτηση ολιγοσακχαριτών



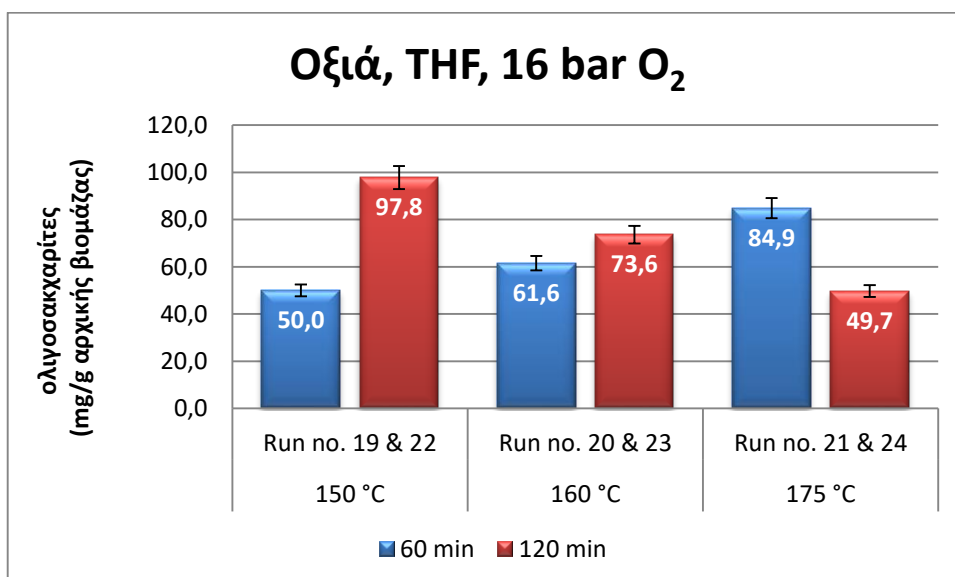
Διάγραμμα 7: Ποσότητα ολιγοσακχαριτών στο υγρό κλάσμα προκατεργασμένου ξύλου οξιάς, σε πίεση 16 bar O<sub>2</sub>, με τη χρήση ACO σε διαφορετικές θερμοκρασίες και για χρόνο προκατεργασίας 60 και 120 min

Η προκατεργασία σε θερμοκρασία 175 °C παράγει μεγαλύτερη ποσότητα ολιγοσακχαριτών στο υγρό κλάσμα από την προκατεργασία στους 160 °C, όταν και οι δύο πραγματοποιούνται υπό πίεση 16 bar O<sub>2</sub> για 60 λεπτά με τη χρήση ακετόνης. Η αύξηση του χρόνου σε 120 λεπτά, δεν αλλάζει τη συσχέτιση αυτή, αλλά οδηγεί σε μεγαλύτερη διαφορά στις δύο αντίστοιχες ποσότητες, που είναι μεγαλύτερες από αυτήν που εμφανίζει η εφαρμογή θερμοκρασίας 150 °C. Στη συνέχεια, συγκρίνοντας τις ποσότητες ολιγοσακχαριτών που προκύπτουν για την ίδια θερμοκρασία προκατεργασίας, αλλά για διαφορετικό χρόνο, παρατηρείται ότι στους 160 °C είναι ελαφρώς μεγαλύτερη στα 120 λεπτά, ενώ στους 175 °C είναι μεγαλύτερη στα 60 λεπτά προκατεργασίας.



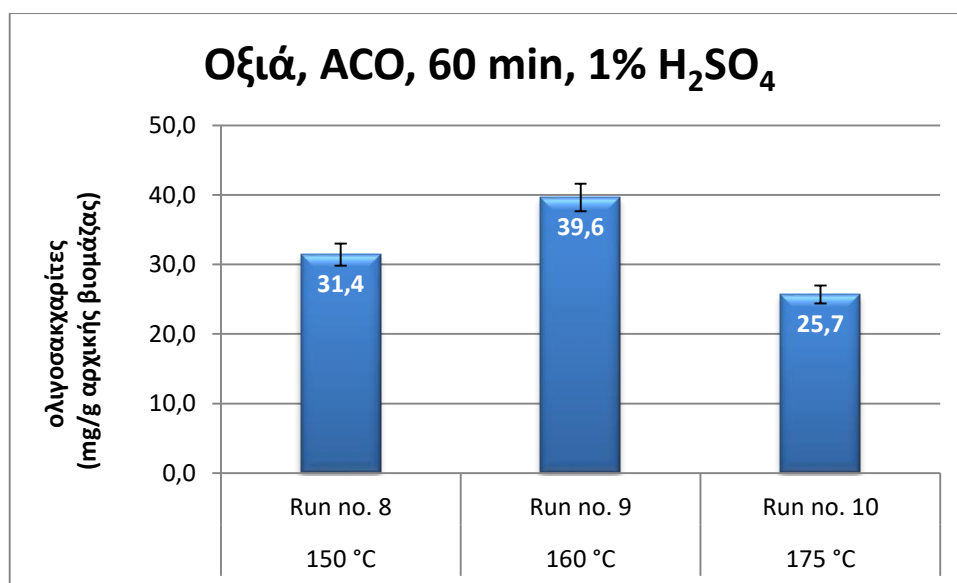
Διάγραμμα 8: Ποσότητα ολιγοσακχαριτών στο υγρό κλάσμα προκατεργασμένου ξύλου οξιάς, σε πίεση 16 bar O<sub>2</sub>, με τη χρήση EtOH σε διαφορετικές θερμοκρασίες και για χρόνο προκατεργασίας 60 και 120 min

Όταν για την προκατεργασία ξύλου οξιάς χρησιμοποιείται EtOH με εφαρμογή πίεσης 16 bar O<sub>2</sub>, η συγκέντρωση ολιγοσακχαριτών είναι μεγαλύτερη στη θερμοκρασία 175 °C, μικρότερη στους 160 °C και ακόμα μικρότερη στους 150 °C, ανεξάρτητα από τον χρόνο αντίδρασης. Στους 150 και στους 160 °C, η αύξηση του χρόνου αντίδρασης οδηγεί σε αύξηση της συγκέντρωσης ολιγοσακχαριτών, ενώ στην περίπτωση των 175 °C, η ποσότητα των ολιγοσακχαριτών είναι μεγαλύτερη στην προκατεργασία που γίνεται για 60 λεπτά και όχι σε αυτήν που γίνεται για 120 λεπτά.



Διάγραμμα 9: Ποσότητα ολιγοσακχαριτών στο υγρό κλάσμα προκατεργασμένου ξύλου οξιάς, σε πίεση 16 bar O<sub>2</sub>, με τη χρήση THF σε διαφορετικές θερμοκρασίες και για χρόνο προκατεργασίας 60 και 120 min

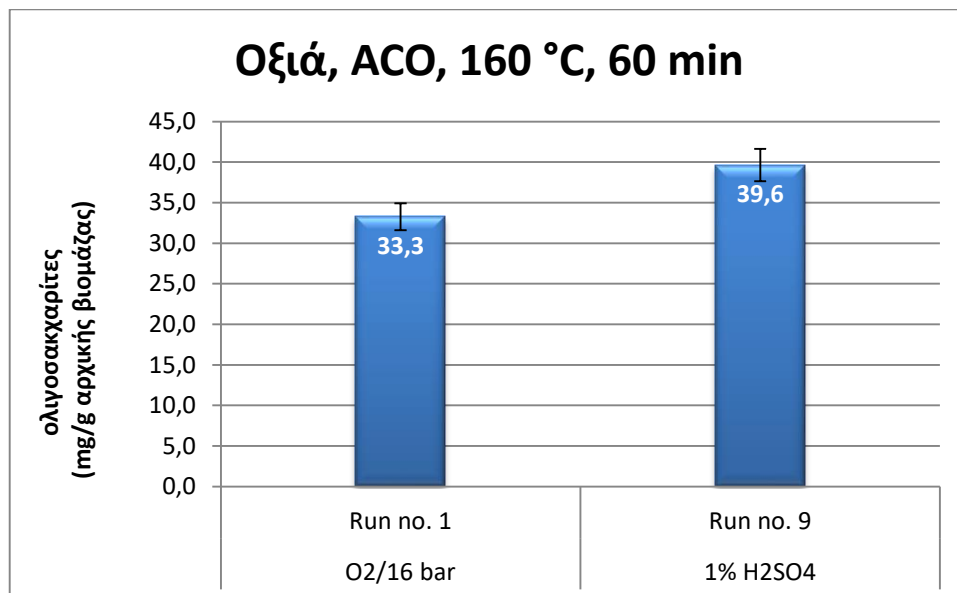
Από το παραπάνω διάγραμμα γίνεται αντιληπτό ότι η προκατεργασία σε 175 °C για 60 λεπτά, οδηγεί σε μεγαλύτερη παραγωγή ολιγοσακχαριτών από τις προκατεργασίες σε 160 και 150 °C, όταν αυτές πραγματοποιούνται υπό πίεση 16 bar O<sub>2</sub> και με τη χρήση THF για 60 λεπτά. Για χρόνο αντίδρασης 120 λεπτά, η συγκέντρωση ολιγοσακχαριτών ακολουθεί την ακριβώς αντίθετη συμπεριφορά από αυτήν στα 60 λεπτά, δηλαδή στους 150 °C παρατηρείται η μέγιστη συγκέντρωση, ύστερα στους 160 °C και μετά στους 175 °C. Συγκρίνοντας την απελευθέρωση ολιγοσακχαριτών στην ίδια θερμοκρασία αλλά σε διαφορετικό χρόνο προκατεργασίας, προκύπτει ότι στους 150 και στους 160 °C, αυτή αυξάνεται με αύξηση του χρόνου υδρόλυσης, ενώ στους 175 °C ελαττώνεται.



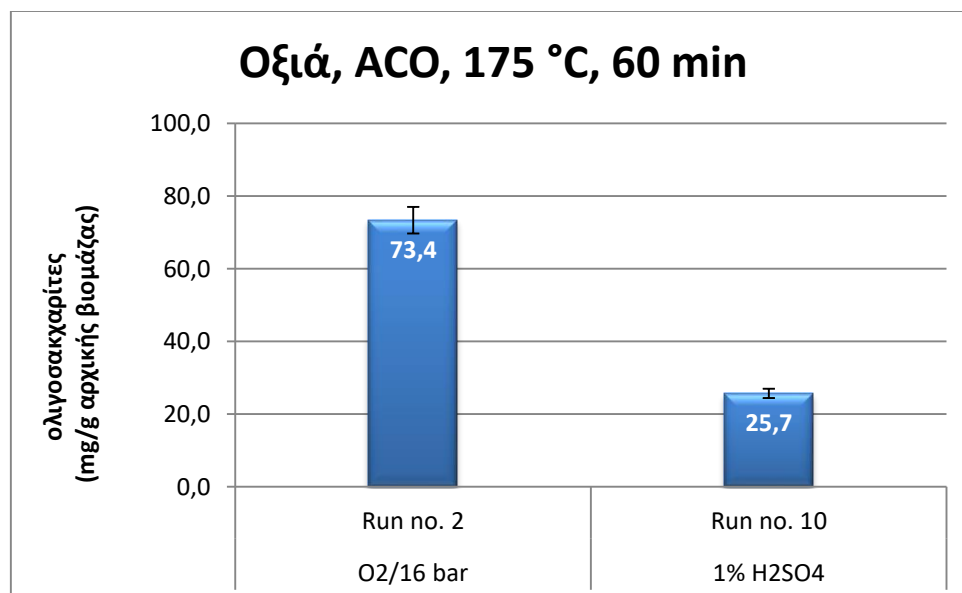
**Διάγραμμα 10:** Ποσότητα ολιγοσακχαριτών στο υγρό κλάσμα προκατεργασμένου ξύλου οξιάς με τη χρήση θετικού οξέος ως όξινο καταλύτη χωρίς την εφαρμογή πίεση O<sub>2</sub>, με διαλύτη ACO, σε διαφορετικές θερμοκρασίες και για χρόνο προκατεργασίας 60 και 120 min

Στην περίπτωση που χρησιμοποιείται καταλύτης 1% H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> αντί για O<sub>2</sub>, η προκατεργασία σε θερμοκρασία 175 °C με διαλύτη ACO οδηγεί στην απελευθέρωση της ελάχιστης ποσότητας ολιγοσακχαριτών στο υγρό κλάσμα, ενώ η μέγιστη εμφανίζεται σε θερμοκρασία 160 °C.

### 3.4.3 Σύγκριση ήπιας οργανολυτικής οξείδωσης με την κλασσική οργανολυτική προκατεργασία παρουσία όξινου καταλύτη



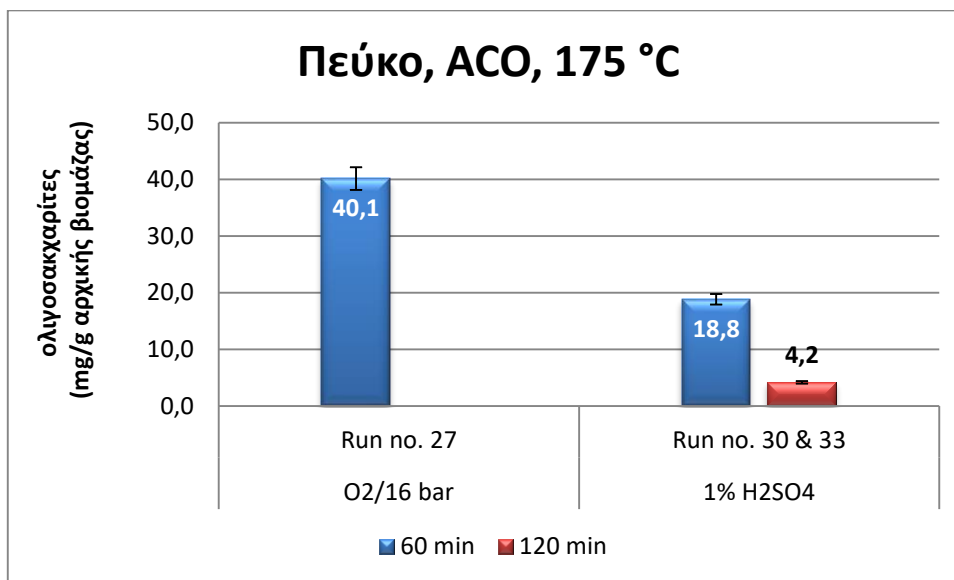
Διάγραμμα 11: Ποσότητα ολιγοσακχαριτών στο υγρό κλάσμα προκατεργασμένου ξύλου οξιάς σε θερμοκρασία 160 °C, με διαλύτη ACO, σε πίεση 16 bar O<sub>2</sub> χωρίς όξινο καταλύτη και με τη χρήση θειικού οξέος ως όξινο καταλύτη χωρίς την εφαρμογή πίεση O<sub>2</sub> για χρόνο προκατεργασίας 60 min



Διάγραμμα 12: Ποσότητα ολιγοσακχαριτών στο υγρό κλάσμα προκατεργασμένου ξύλου οξιάς σε θερμοκρασία 175 °C, με διαλύτη ACO, σε πίεση 16 bar O<sub>2</sub> χωρίς όξινο καταλύτη και με τη χρήση θειικού οξέος ως όξινο καταλύτη χωρίς την εφαρμογή πίεση O<sub>2</sub> για χρόνο προκατεργασίας 60 min

Τα διαγράμματα 11 και 12 απεικονίζουν την επίδραση που έχει η χρήση θειικού οξέος ως καταλύτη αντί για οξυγόνο σε πίεση 16 bar στην απελευθέρωση ολιγοσακχαριτών, όταν χρησιμοποιείται ACO, το δείγμα προκατεργάζεται για 60

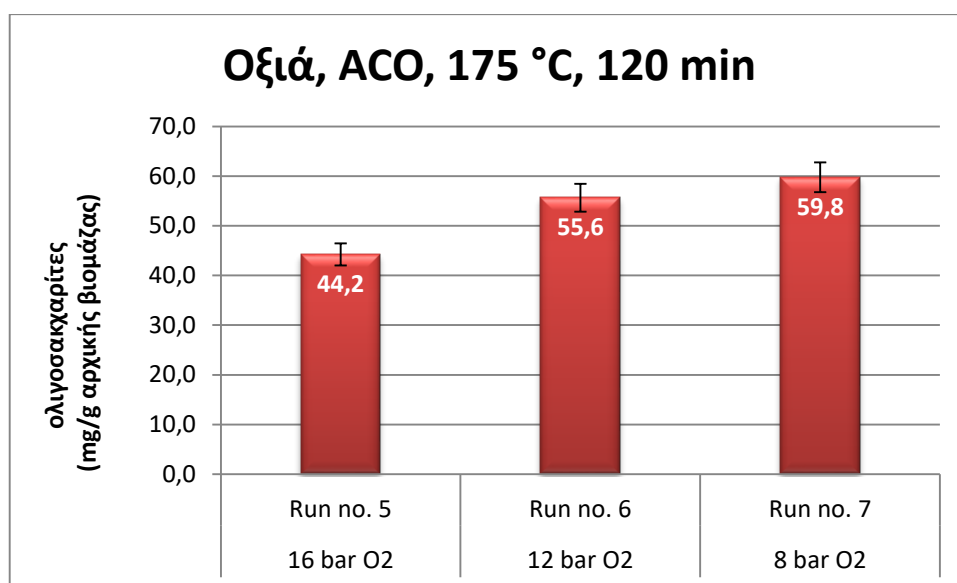
λεπτά και η θερμοκρασία είναι 160 και 175 °C. Στη μικρότερη θερμοκρασία των 160 °C, η χρήση όξινου καταλύτη αντί οξυγόνου, παράγει μεγαλύτερη ποσότητα ολιγοσακχαριτών, ενώ με αύξηση της θερμοκρασίας στους 175 °C, η προκατεργασία με οξυγόνο φαίνεται να είναι πολύ πιο αποτελεσματική, αφού παράγεται περίπου τριπλάσια ποσότητα.



Διάγραμμα 13: Ποσότητα ολιγοσακχαριτών στο υγρό κλάσμα προκατεργασμένου ξύλου πεύκου σε θερμοκρασία 175 °C, με διαλύτη ACO, σε πίεση 16 bar O<sub>2</sub> χωρίς όξινο καταλύτη και με τη χρήση θειικού οξέος ως όξινο καταλύτη χωρίς την εφαρμογή πίεση O<sub>2</sub> για χρόνο προκατεργασίας 60 και 120 min

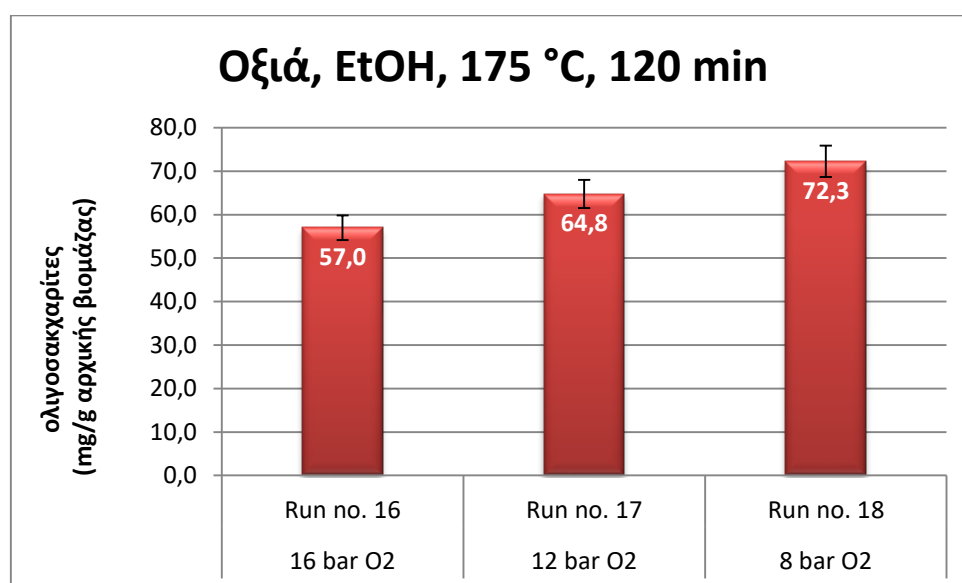
Από το παραπάνω διάγραμμα, φαίνεται ότι η χρήση 1% H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> ως καταλύτη αντί για O<sub>2</sub> σε πίεση 16 bar κατά την προκατεργασία δειγμάτων ξύλου πεύκου για 60 λεπτά, δεν ευνοεί την παραγωγή ολιγοσακχαριτών, όταν η θερμοκρασία προκατεργασίας είναι 175 °C και χρησιμοποιείται ACO ως διαλύτης. Με την αύξηση του χρόνου προκατεργασίας στην περίπτωση που χρησιμοποιείται το οξύ, μειώνεται σημαντικά η απελευθέρωση ολιγοσακχαριτών.

### 3.4.4 Επίδραση πίεσης οξυγόνου (O<sub>2</sub>) στην ανάκτηση ολιγοσακχαριτών



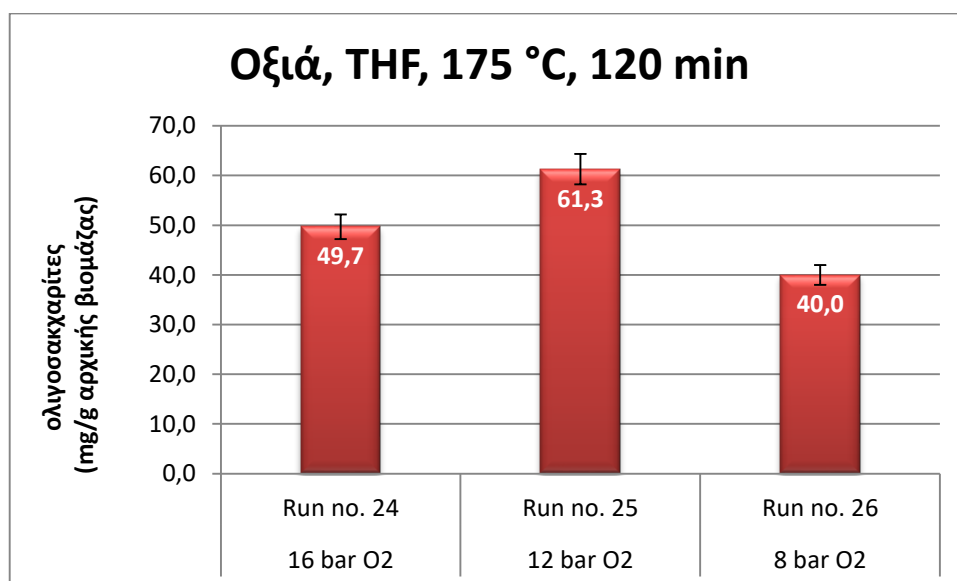
Διάγραμμα 14: Ποσότητα ολιγοσακχαριτών στο υγρό κλάσμα προκατεργασμένου ξύλου οξιάς, σε θερμοκρασία 175 °C με τη χρήση ACO και για χρόνο προκατεργασίας 120 min με την εφαρμογή διαφορετικών πιέσεων O<sub>2</sub>

Από το παραπάνω διάγραμμα γίνεται αντιληπτό ότι η προκατεργασία ξύλου οξιάς σε θερμοκρασία 175 °C για 120 λεπτά με τη χρήση ACO οδηγεί σε υψηλότερη συγκέντρωση ολιγοσακχαριτών όταν εφαρμόζεται πίεση 8 bar O<sub>2</sub> συγκριτικά με την εφαρμογή 12 και 16 bar O<sub>2</sub>.



Διάγραμμα 15: Ποσότητα ολιγοσακχαριτών στο υγρό κλάσμα προκατεργασμένου ξύλου οξιάς, σε θερμοκρασία 175 °C με τη χρήση EtOH και για χρόνο προκατεργασίας 120 min με την εφαρμογή διαφορετικών πιέσεων O<sub>2</sub>

Όταν η προκατεργασία ξύλου οξιάς πραγματοποιείται στους 175 °C, για 120 λεπτά και με τη χρήση EtOH, παράγονται μεγάλες ποσότητες ολιγοσακχαριτών σε κάθε περίπτωση πίεσης, με τη μέγιστη συγκέντρωση να παρατηρείται για πίεση 8 bar O<sub>2</sub>.



Διάγραμμα 16: Ποσότητα ολιγοσακχαριτών στο υγρό κλάσμα προκατεργασμένου ξύλου οξιάς, σε θερμοκρασία 175 °C με τη χρήση THF και για χρόνο προκατεργασίας 120 min με την εφαρμογή διαφορετικών πιέσεων O<sub>2</sub>

Σύμφωνα με το παραπάνω διάγραμμα η εφαρμογή πίεσης 12 bar O<sub>2</sub> κατά την προκατεργασία δειγμάτων ξύλου οξιάς σε θερμοκρασία 175 °C για 120 λεπτά με τη χρήση THF, οδηγεί σε υψηλότερη συγκέντρωση ολιγοσακχαριτών από την εφαρμογή 16 bar O<sub>2</sub> και αυτή σε υψηλότερη από την εφαρμογή 8 bar O<sub>2</sub>.

### 3.5 Υποκαταστάτες ολιγοσακχαριτών

Οι υποκαταστάτες που ανιχνεύθηκαν στους ολιγοσακχαρίτες στα πλαίσια της παρούσας διπλωματικής εργασίας είναι οι ακετυλομάδες και τα ουρονικά οξέα, εκ των οποίων το γλυκουρονικό οξύ συναντάται στα πλατύφυλλα ξύλα και το γαλακτουρονικό οξύ στα κωνοφόρα. Η παρουσία υποκαταστατών στους ολιγοσακχαρίτες έχει ως αποτέλεσμα την πιο αργή ζύμωσή τους από τα προβιοτικά βακτήρια, ενώ αυξάνεται η παραγωγή προπιονικού και βουτυρικού οξέος στο έντερο.



### 3.5.1 Ανίχνευση ακετυλοϋποκαταστατών μέσω της ανίχνευσης οξικού οξέος

Πίνακας 10: Ακετυλομάδες στα υγρά κλάσματα προκατεργασίας των δειγμάτων οξιάς και πεύκου

Αριθμός δειγματος	Ολιγοσακχαρα (mg)	Οξικό οξύ μετά την προκατεργασία (mg)	Οξικό οξύ μετά την όξινη υδρόλυση (mg)	Ακετυλομάδες (% κ.β.)
1	1663,0	5,00	10,34	0,30
2	3669,2	11,40	32,88	0,57
3	972,8	11,97	12,94	0,09
4	1900,4	13,90	28,37	0,70
5	2212,0	18,49	30,48	0,52
6	2781,4	16,44	32,58	0,56
7	2988,1	12,15	23,45	0,37
8	1570,8	4,83	10,59	0,32
9	1981,4	6,52	14,90	0,40
10	1284,5	10,20	19,24	0,63
11	975,2	2,07	8,53	0,59
12	1697,9	2,90	7,42	0,25
13	3292,5	4,85	14,41	0,28
14	1436,0	3,48	8,59	0,32
15	2603,5	6,82	15,21	0,30
16	2848,6	7,58	19,58	0,41
17	3238,3	6,75	19,34	0,38
18	3614,5	5,92	20,54	0,39
19	2498,2	5,50	16,78	0,42
20	3077,6	5,59	14,45	0,27
21	4243,4	8,97	20,81	0,27
22	4887,9	10,14	23,37	0,26
23	3680,3	8,68	199,87	0,29
24	2484,8	14,38	24,81	0,41
25	3063,5	11,60	22,85	0,36
26	2000,0	12,07	27,04	0,74
27	2006,8	10,54	18,04	0,36
28	2164,3	3,06	7,63	0,21
29	2074,4	4,63	9,36	0,23
30	941,8	9,71	10,08	0,04
31	3047,1	3,98	8,45	0,15
32	1414,3	6,68	11,41	0,33
33	209,9	15,25	15,55	0,14

Το οξικό οξύ προκύπτει από την υδρόλυση των ακετυλομάδων που βρίσκονται ως υποκαταστάτες στην κεντρική αλυσίδα της ημικυτταρίνης. Η δεύτερη στήλη του παραπάνω πίνακα, αντιπροσωπεύει την ποσότητα των ακετυλομάδων που

υδρολύθηκαν κατά την προκατεργασία της βιομάζας και η τρίτη στήλη την συνολική ποσότητα των ακετυλομάδων, δηλαδή το άθροισμα των ποσοτήτων που απελευθερώθηκαν κατά την προκατεργασία και κατά την όξινη υδρόλυση (υποενότητα 2.2.4). Ο υπολογισμός της % κ.β. περιεκτικότητας των υγρών κλασμάτων σε ακετυλομάδες έγινε με βάση τη διαφορά των παραπάνω δύο ποσοτήτων. Είναι σημαντικό να τονιστεί, ότι ο υπολογισμός της συγκέντρωσης του οξικού οξέος έγινε μετά την αποτοξικοποίηση των υγρών κλασμάτων. Επομένως, αναμένεται η περιεκτικότητα των δειγμάτων σε ακετυλομάδες να είναι μεγαλύτερη από αυτήν που αντιστοιχεί στις παραπάνω τιμές.

Επειδή το οξικό οξύ δρα παρεμποδιστικά στην ανάπτυξη των πρεβιοτικών, ο σχηματισμός του κατά την προκατεργασία επιδιώκεται να είναι περιορισμένος. Παρατηρώντας τον παραπάνω πίνακα και συγκρίνοντας την παραγωγή οξικού οξέος κάθε προκατεργασίας με τις αντίστοιχες συνθήκες του πίνακα 1, φαίνεται ότι για την πλειονότητα των δειγμάτων, με την αύξηση της θερμοκρασίας και του χρόνου αυξάνεται και η ποσότητα οξικού οξέος που σχηματίζεται κατά την προκατεργασία, ενώ με τη μείωση της πίεσης ελαττώνεται ο σχηματισμός του. Επίσης, συγκρίνοντας τις περιεκτικότητες σε ακετυλομάδες των δειγμάτων οξιάς και πεύκου, γίνεται αντιληπτό ότι η χρήση ACO και THF έχει ως αποτέλεσμα τον σχηματισμό ολιγοσακχαριτών με περισσότερες υποκατεστημένες ακετυλομάδες σε σχέση με τη χρήση EtOH, ενώ τα δείγματα οξιάς περιέχουν περισσότερους ακετυλιωμένους ολιγοσακχαρίτες από τα δείγματα πεύκου, κάτι που είναι αναμενόμενο, καθώς τα πλατύφυλλα ξύλα έχουν μεγαλύτερη περιεκτικότητα σε ακετυλομάδες από τα κωνοφόρα.

### 3.5.2 Ανίχνευση ουρονικών οξέων

Πίνακας 11: Ποσότητα ουρονικών οξέων στα υγρά κλάσματα προκατεργασίας των δειγμάτων οξιάς και πεύκου

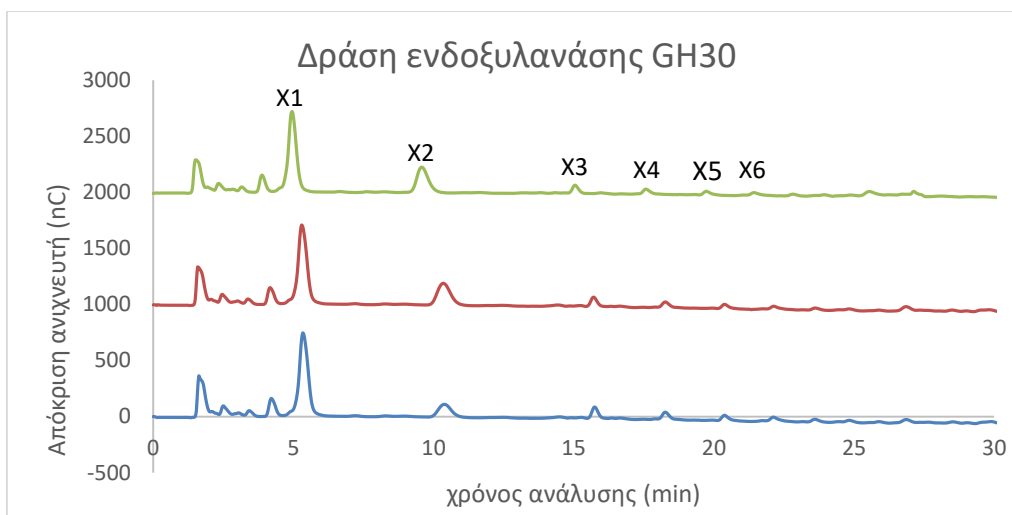
Αριθμός δειγματος	Ολιγοσάκχαρα (mg)	Ουρονικά οξέα μετά την όξινη υδρόλυση (mg)	Ουρονικά οξέα (% κ.β.)
1	1663,0	108,3	6,1
2	3669,2	90,1	2,4
3	972,8	81,0	7,7
4	1900,4	150,2	7,3
5	2212,0	69,6	3,0
6	2781,4	74,5	2,6
7	2988,1	64,2	2,1
8	1570,8	219,1	12,2
9	1981,4	127,0	6,0
10	1284,5	151,2	10,5
11	975,2	107,1	9,8
12	1697,9	109,4	6,0
13	3292,5	71,5	2,1

14	1436,0	132,9	8,4
15	2603,5	171,8	6,2
16	2848,6	37,1	1,3
17	3238,3	77,7	2,3
18	3614,5	86,1	2,3
19	2498,2	177,3	6,6
20	3077,6	177,8	5,4
21	4243,4	131,7	3,0
22	4887,9	165,2	3,3
23	3680,3	159,7	4,1
24	2484,8	30,2	1,2
25	3063,5	57,9	1,8
26	2000,0	4,7	0,2
27	2006,8	54,6	2,6
28	2164,3	55,5	2,5
29	2074,4	18,4	0,9
30	941,8	34,6	3,5
31	3047,1	6,9	0,2
32	1414,3	4,4	0,3
33	209,9	7,2	3,3

Τα ουρονικά οξέα, όπως και οι ακετυλομάδες, είναι υποκαταστάτες της κύριας αλυσίδας της ημικυτταρίνης. Μετά την όξινη υδρόλυση, έχουν απελευθερωθεί οι ομάδες ουρονικών οξέων από την αλυσίδα. Είναι εμφανές ότι τα δείγματα οξιάς περιέχουν μεγαλύτερες ποσότητες ουρονικών οξέων (κατά κύριο λόγο γλυκουρονικού οξέος) από τα δείγματα πεύκου, κάτι που είναι αναμενόμενο, αφού η κύρια ημικυτταρίνη των πλατύφυλλων είναι η γλυκουρονοξυλάνη και των κωνοφόρων η γλυκομαννάνη. Συγκρίνοντας τις παραπάνω ποσότητες με τις συνθήκες προκατεργασίας των αντίστοιχων δειγμάτων του πίνακα 1, προκύπτει ότι στις προκατεργασίες που γίνονται σε θερμοκρασίες 150 °C και 160 °C είναι υψηλότερες από αυτές που γίνονται στους 175 °C. Επίσης, η χρήση ACO και EtOH έχει ως αποτέλεσμα την παραγωγή υποκατεστημένων ολιγοσακχαριτών με περισσότερες μονάδες ουρονικών οξέων συγκριτικά με τη χρήση THF.

### 3.6 Ενζυμική υδρόλυση

Στο υγρό κλάσμα προκατεργασίας οξιάς με EtOH στους 175 °C για 60 λεπτά υπό πίεση 16 bar O<sub>2</sub> (δείγμα 22), πραγματοποιήθηκε ενζυμική υδρόλυση με τη χρήση ενδοξυλανάσης GH30 με στόχο τη μείωση του βαθμού πολυμερισμού των ολιγοσακχαριτών και, κατά συνέπεια, την ενίσχυση της πρεβιοτικής τους δράσης.



Εικόνα 15: Χρωματογράφημα ΗΡΑC-PAD. Προφίλ ολιγοσακχαριτών πριν (μπλε) και μετά τη δράση της ενδοξυλανάσης GH30 2 (κόκκινο) και 4 (πράσινο) ώρες

Από το παραπάνω χρωματογράφημα, είναι εμφανής η αύξηση της ποσότητας της ξυλοβιόζης μετά τη δράση του ενζύμου. Όσον αφορά την ποσότητα των υπόλοιπων σακχάρων, δεν είναι δυνατή η εξαγωγή κάποιου συμπεράσματος σχετικά με τη μεταβολή της παρατηρώντας μόνο το παραπάνω γράφημα.

Πίνακας 12: Εμβαδόν κορυφών χρωματογραφημάτων ΗΡΑEC-PAD των ολιγοσακχαριτών με βαθμό πολυμερισμού 2-6 πριν και μετά τη δράση της ενδοξυλανάσης GH30

Χρόνος αντίδρασης (h)	Αραίωση	Εμβαδόν κορυφής (nC*min)				
		X2	X3	X4	X5	X6
0	10	59,6	24,7	16,3	12,4	9,5
2	10	105,7	21,4	12,3	9	6,3
4	10	106,3	17,5	11	9,1	6,4

Πίνακας 13: Συγκέντρωση ξυλοβιόζης πριν και μετά τη δράση της ενδοξυλανάσης GH30

Χρόνος αντίδρασης (h)	Αραίωση	Συγκέντρωση ξυλοβιόζης (g/L αντίδρασης)
0	10	0,479
2	10	0,849
4	10	0,854

Ο πίνακας 13 επιβεβαιώνει την αύξηση της ποσότητας της ξυλοβιόζης, η οποία σχεδόν διπλασιάστηκε, αλλά δείχνει και την ταυτόχρονη μείωση των ποσοτήτων των υπόλοιπων ολιγοσακχάρων που οφείλεται στη δράση της ενδοξυλανάσης. Παρατηρείται, επίσης, ότι η μετά τις 2 ώρες αντίδρασης, οι συγκεντρώσεις των ολιγοσακχάρων δε μεταβάλλονται σημαντικά.

## 4 Συμπεράσματα και συζήτηση

### 4.1 Παράμετροι ήπιας οργανολυτικής οξείδωσης

Στην προηγούμενη ενότητα παρουσιάστηκαν, μεταξύ άλλων, τα αποτελέσματα που προέκυψαν από την ανάλυση των υγρών κλασμάτων οργανολυτικής οξείδωσης δειγμάτων οξιάς και πεύκου ως προς την ποσότητα των ολιγοσακχαριτών και μονοσακχαριτών που περιέχουν. Είναι εμφανές ότι οι διαφορετικές συνθήκες προκατεργασίας επιδρούν σημαντικά στις παραπάνω ποσότητες κι έτσι, η εύρεση των κατάλληλων συνθηκών για το επιθυμητό αποτέλεσμα έχει μεγάλη σημασία.

#### 4.1.1 Οξιά

Η μέγιστη ποσότητα ολιγοσακχάρων στα δείγματα οξιάς, παρατηρείται για προκατεργασία 120 λεπτών με THF, σε πίεση 16 bar O<sub>2</sub> και σε θερμοκρασία 150 °C και είναι ίση με 97.8 mg/g. Αυτή η προκατεργασία εμφανίζει, επίσης, και μειωμένη παραγωγή μονοσακχάρων με την ποσότητά τους να είναι ίση με 7.2 mg/g. Γενικότερα, σε πίεση 16 bar O<sub>2</sub>, το THF είναι ο ιδανικότερος διαλύτης, αφού οδηγεί στην παραγωγή περισσότερων ολιγοσακχαριτών, αλλά και μειωμένης ποσότητας μονοσακχαριτών. Εξαιρέση αποτελεί η προκατεργασία γίνεται για 120 λεπτά στους 175 °C, όπου η EtOH οδηγεί σε απελευθέρωση περισσότερων ολιγοσακχάρων. Στις χαμηλότερες πιέσεις, η EtOH εμφανίζει τα βέλτιστα αποτελέσματα, ενώ η ACO αποτελεί τη χειρότερη επιλογή στην πλειονότητα των περιπτώσεων.

Η αύξηση της θερμοκρασίας, έχει θετική επίδραση στην ποσότητα των σακχάρων, εκτός από την περίπτωση που χρησιμοποιείται THF για 120 λεπτά σε πίεση 16 bar O<sub>2</sub>, στην οποία σημειώνεται η αντίστροφη συμπεριφορά για τα ολιγοσάκχαρα. Απόκλιση από την παραπάνω συσχέτιση ποσότητας ολιγοσακχάρων και θερμοκρασίας, εμφανίζεται και στην περίπτωση που χρησιμοποιείται οξύ αντί για O<sub>2</sub> για 60 λεπτά με ACO, όπου η προκατεργασία στους 160 °C δίνει τα βέλτιστα αποτελέσματα.

Όσον αφορά την αντικατάσταση του O<sub>2</sub> από το H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, είναι ελάχιστα πιο ευνοϊκή για την παραγωγή ολιγοσακχαριτών, όταν η προκατεργασία γίνεται για 60 λεπτά στους 160 °C με τη χρήση ACO, αλλά με αύξηση της θερμοκρασίας στους 175 °C, η χρήση O<sub>2</sub> υπερτερεί σε μεγάλο βαθμό. Αντιθέτως, τα μονοσάκχαρα αυξάνονται με την αντικατάσταση του O<sub>2</sub>, κάτι που είναι αναμενόμενο λόγω της έντονης υδρολυτικής ικανότητας του οξέος. Η αύξηση της πίεσης O<sub>2</sub>, οδηγεί σε μείωση της ποσότητας των ολιγοσακχαριτών, με εξαίρεση την περίπτωση που η προκατεργασία γίνεται στους 175 °C για 120 λεπτά με THF, όπου η εφαρμογή πίεσης 12 bar O<sub>2</sub> είναι η καλύτερη επιλογή.

Η αύξηση του χρόνου προκατεργασίας επιδρά αρνητικά στην ποσότητα των ολιγοσακχάρων μόνο όταν η προκατεργασία γίνεται στους 175 °C, ενώ επιδρά θετικά στην ποσότητα των μονοσακχάρων ανεξάρτητα από τις συνθήκες που εφαρμόζονται. Στις μικρότερες θερμοκρασίες, οι προκατεργασίες των 120 λεπτών παρουσιάζουν μεγαλύτερη ποσότητα ολιγοσακχάρων σε σχέση με τις αντίστοιχες των 60 λεπτών.

### 4.1.2 Πεύκο

Σε σύγκριση με τα δείγματα οξιάς, οι προκατεργασίες δειγμάτων πεύκου παράγουν μεγάλες ποσότητες μονοσακχάρων, από 32.2 mg/g έως και 84.9 mg/g. Η μέγιστη ποσότητα ολιγοσακχάρων παρατηρείται για προκατεργασία 120 λεπτών με EtOH, σε πίεση 16 bar O<sub>2</sub> και σε θερμοκρασία 175 °C και είναι ίση με 60.9 mg/g. Στις ίδιες συνθήκες, η ποσότητα των μονοσακχάρων είναι 56 mg/g. Όσον αφορά τους ολιγοσακχαρίτες, η EtOH αποτελεί τον ιδανικότερο οργανικό διαλύτη, ενώ η χρήση O<sub>2</sub> αποτελεί καλύτερη επιλογή σε σχέση με τη χρήση H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> σε κάθε περίπτωση. Η αύξηση του χρόνου προκατεργασίας οδηγεί σε μείωση της ποσότητας ολιγοσακχάρων στο υγρό κλάσμα, εκτός από την προκατεργασία που γίνεται σε πίεση 16 bar O<sub>2</sub> με EtOH στους 175 °C, στην οποία σημειώνεται η αντίστροφη συσχέτιση.

### 4.1.3 Παραγωγή σακχάρων σε άλλες μελέτες

Η προκατεργασία οργανολυτικής οξειδωσης με τη χρήση O<sub>2</sub>, έχει εφαρμοστεί σε υπολείμματα ζαχαροκάλαμου όπου χρησιμοποιήθηκε υδατικό διάλυμα αιθανόλης 40% σε θερμοκρασία 160 °C υπό πίεση 15 bar για 80 λεπτά (Li et al., 2018). Η συγκεκριμένη μελέτη δεν αναφέρεται στην ποσότητα των ολιγοσακχαριτών που απελευθερώθηκε, αλλά μόνο στην ποσότητα των μονοσακχάρων στο υγρό κλάσμα η οποία ήταν περίπου ίση με 79.5 mg/g. Αρκετά υψηλή ήταν και η ποσότητα του οξικού και του φορμικού οξέος (30.7 mg/g και 56 mg/g αντίστοιχα). Ξυλοολιγοσακχαρίτες έχουν παραχθεί με αυτοϋδρόλυση από σπόρους γλυκού σόργου που προκατεργάστηκε με θερμό νερό σε διάφορες θερμοκρασίες, για διαφορετικό χρόνο αντίδρασης και σε διαφορετικά pH. Η μέγιστη παραγωγή ξυλοολιγοσακχαριτών παρατηρήθηκε στα 90 λεπτά προκατεργασίας, σε pH 3.2 και στους 210 °C και ήταν ίση με 205 mg/g. Στις ίδιες συνθήκες, η ποσότητα ξυλόζης που απελευθερώθηκε ήταν επίσης ίση με 205 mg/g (Mirfakhar et al., 2020). Είναι εμφανές ότι από τα σακχαρούχα φυτά παράγονται περισσότερα σάκχαρα συγκριτικά με τα ξύλα. Ωστόσο, η αξιοποίησή εδωδιμων κλασμάτων της φυτικής βιομάζας για την παραγωγή πρεβιοτικών συστατικών θα επηρεάσει αρνητικά την ποσότητα των τροφίμων και θα αυξήσει την τιμή τους. Γι' αυτό και η αξιοποίηση της λιγνοκυτταρινούχου βιομάζας για αυτόν τον σκοπό είναι μια ελκυστική προσέγγιση.

Η οργανολυτική προκατεργασία με αιθανόλη και με χρήση  $H_2SO_4$  ως καταλύτη έχει εφαρμοστεί με επιτυχία σε ξύλο λεύκας και πεύκου. Για αναλογία νερού και αιθανόλης 50/50%, θερμοκρασία 180 °C, συγκέντρωση  $H_2SO_4$  1.25% και για χρόνο προκατεργασίας 60 λεπτά η ποσότητα των ξυλοολιγοσακχαριτών στο υγρό κλάσμα πλησίασε τα 55 mg/g και η ποσότητα της ξυλόζης τα 40 mg/g (Pan et al., 2006). Οι πιο κοντινές συνθήκες προκατεργασίας ξύλου οξιάς που μελετήθηκαν στα πλαίσια της παρούσας εργασίας (αναλογία αιθανόλης και νερού 50/50%, 175 °C, 60 λεπτά, 16 bar  $O_2$ ) οδήγησαν στην παραγωγή 51.3 mg/g ξυλοολιγοσακχάρων και 7.8 mg/g ξυλόζης. Σε παρόμοιες συνθήκες με τη λεύκα (αναλογία αιθανόλης και νερού 65/35%, 170 °C, 60 λεπτά, 1.1%  $H_2SO_4$ ), η προκατεργασία πεύκου είχε ως αποτέλεσμα την παραγωγή 38 mg/g μαννοολιγοσακχαριτών και 16 mg/g μαννόζης στο υγρό κλάσμα (Pan et al., 2007). Από την οργανολυτική οξείδωση ξύλου πεύκου με αιθανόλη και νερό σε αναλογία 50/50%, θερμοκρασία 175 °C, πίεση 16 bar  $O_2$  και χρόνο αντίδρασης 60 λεπτά, η ποσότητα των μαννοολιγοσακχαριτών του υγρού κλάσματος που υπολογίστηκε στην παρούσα μελέτη είναι ίση με 32.7 mg/g, ενώ δεν βρέθηκε σχεδόν καθόλου μαννόζη. Παρατηρείται ότι οι ποσότητες των ξυλοολιγοσακχαριτών που προκύπτουν από τις διαφορετικές προκατεργασίες των ξύλων οξιάς και λεύκας δε διαφέρουν σε μεγάλο βαθμό, κάτι που είναι αναμενόμενο, καθώς ανήκουν στην ίδια κατηγορία ξύλων, στα πλατύφυλλα. Το ίδιο ισχύει και για τις ποσότητες των μαννοολιγοσακχαριτών των δειγμάτων πεύκου. Από την άλλη, εξαιτίας της χρήσης του όξινου καταλύτη, υπάρχει σημαντική διαφορά στις ποσότητες της ξυλόζης και της μαννόζης.

Ξύλο λεύκας έχει, επίσης, προκατεργαστεί με θερμό νερό (αναλογία νερού προς βιομάζα 5:1) στους 170 °C για 60 λεπτά. Η ποσότητα των απελευθερωμένων ολιγοσακχαριτών ήταν ίση με 89.5 mg/g και μονοσακχαριτών 21.5 mg/g. Στις ίδιες συνθήκες προκατεργάστηκε και ξύλο πεύκου με την ποσότητα των ολιγοσακχαριτών να είναι 75 mg/g και την ποσότητα μονοσακχαριτών 21.5 mg/g (Guan et al., 2018). Στην περίπτωση του πεύκου, οι ολιγοσακχαρίτες της ξυλόζης αποτελούν περίπου το 80% των συνολικών ολιγοσακχάρων, ενώ στην περίπτωση του πεύκου οι μαννοολιγοσακχαρίτες είναι αυτοί που υπερτερούν φτάνοντας το 55%. Η ίδια συμπεριφορά παρατηρείται και στα δύο είδη ξύλων που μελετήθηκαν στην παρούσα εργασία, επιβεβαιώνοντας την υψηλή περιεκτικότητα των πλατύφυλλων ξύλων σε ξυλόζη και των κωνοφόρων σε μαννόζη.

## 4.2 Αποτελεσματικότητα ενζυμικής υδρόλυσης

Η ενζυμική υδρόλυση που πραγματοποιήθηκε στο υγρό κλάσμα προκατεργασίας με EtOH στους 175 °C για 60 λεπτά υπό πίεση 16 bar  $O_2$  με τη χρήση ενδοξυλανάσης GH30, ήταν επιτυχής στη μείωση του βαθμού πολυμερισμού των ολιγοσακχαριτών, αλλά οδήγησε στην αύξηση μόνο της ποσότητας της ξυλοβιόζης, ενώ οι ποσότητες των ολιγοσακχάρων με βαθμό πολυμερισμού από 2 έως 6 μονάδες ξυλόζης

μειώθηκαν. Παρατηρείται, επίσης, ότι οι συγκεντρώσεις των ολιγοσακχάρων μετά από 4 ώρες αντίδρασης παραμένουν σχεδόν αμετάβλητες σε σύγκριση με τις αντίστοιχες συγκεντρώσεις μετά από 2 ώρες. Συμπεραίνεται, λοιπόν, ότι μετά τις 2 ώρες αντίδρασης, μειώνεται σημαντικά η δράση του ενζύμου.

### 4.3 Μελλοντικοί στόχοι

Στην παρούσα διπλωματική εργασία μελετήθηκε η επίδραση που έχουν διαφορετικές συνθήκες οργανολυτικής προκατεργασίας ξύλων οξιάς και πεύκου στην ποσότητα των ολιγοσακχαριτών του υγρού κλάσματος. Αρχικά, προτείνεται η χρήση μεγαλύτερης ποικιλίας οργανικών διαλυτών, διαφορετικών αναλογιών διαλύτη και νερού, καθώς και η εφαρμογή διαφορετικών θερμοκρασιών στις χαμηλότερες πιέσεις των 8 και 12 bar O<sub>2</sub>, προκειμένου να ληφθεί μια πιο ολοκληρωμένη εικόνα σχετικά με την επίδραση των συνθηκών προκατεργασίας στην παραγωγή ολιγοσακχάρων. Ακόμα, συστήνεται η μελέτη περισσότερων υποστρωμάτων, από πλατύφυλλα και κωνοφόρα ξύλα μέχρι και αγροτικά υπολείμματα και κατάλοιπα καλλιεργειών.

Με τη χρήση ιοντικής χρωματογραφίας ΗΡΑEC-PAD, επιβεβαιώθηκε η παρουσία ολιγοσακχαριτών στα υγρά κλάσματα προκατεργασίας, χωρίς, όμως, να είναι δυνατή οποιαδήποτε περαιτέρω ανάλυση. Προτείνεται η χρήση κατάλληλης αναλυτικής μεθόδου για την αποσαφήνιση του βαθμού πολυμερισμού και της δομής των ολιγοσακχαριτών, κατά κύριο λόγο των υποκατεστημένων, ειδικά στην περίπτωση των κωνοφόρων ξύλων, καθώς οι ολιγοσακχαρίτες των πλατύφυλλων ξύλων έχουν μελετηθεί σε σημαντικά μεγαλύτερο βαθμό.

Στα πλαίσια της παρούσας εργασίας, πραγματοποιήθηκε, επίσης, ενζυμική υδρόλυση σε ένα από τα υγρά κλάσματα, ώστε να μειωθεί ο βαθμός πολυμερισμού των ξυλοολιγοσακχάρων που περιέχουν. Προτείνεται η χρήση των υδρολυμένων υγρών κλασμάτων για την ανάπτυξη στελεχών λακτοβάκιλλων και μπιφιδοβακτηρίων, που αποτελούν τα βασικότερα προβιοτικά βακτήρια του γαστρεντερικού σωλήνα και έχουν την ικανότητα μεταβολισμού ξυλοολιγοσακχάρων χαμηλού βαθμού πολυμερισμού. Σε επόμενη φάση, κρίνεται απαραίτητη η διεξαγωγή πρεβιοτικών δοκιμών σε συστήματα που προσομοιάζουν το ανθρώπινο γαστρεντερικό σύστημα, προκειμένου να μελετηθούν οι αλληλεπιδράσεις μεταξύ των ξυλοολιγοσακχάρων, των προβιοτικών βακτηρίων και των προϊόντων μεταβολισμού τους, του περιβάλλοντος και των συνθηκών που επικρατούν, αλλά και των παθογόνων μικροοργανισμών που υπάρχουν σε αυτό.



## 5 Βιβλιογραφία

---

- Aachary, A. A., & Prapulla, S. G. (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), 3981–3988. <https://doi.org/10.1021/jf073430i>
- Aachary, A. A., & Prapulla, S. G. (2011). Xylooligosaccharides (XOS) as an Emerging Prebiotic: Microbial Synthesis, Utilization, Structural Characterization, Bioactive Properties, and Applications. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*, 10(1), 2–16. <https://doi.org/10.1111/j.1541-4337.2010.00135.x>
- Akhtar, A., Krepl, V., & Ivanova, T. (2018). A Combined Overview of Combustion, Pyrolysis, and Gasification of Biomass. In *Energy and Fuels* (Vol. 32, Issue 7, pp. 7294–7318). American Chemical Society. <https://doi.org/10.1021/acs.energyfuels.8b01678>
- Al-Battashi, H. S., Annamalai, N., Sivakumar, N., Al-Bahry, S., Tripathi, B. N., Nguyen, Q. D., & Gupta, V. K. (2019). Lignocellulosic biomass (LCB): a potential alternative biorefinery feedstock for polyhydroxyalkanoates production. *Reviews in Environmental Science and Biotechnology*, 18(1), 183–205. <https://doi.org/10.1007/s11157-018-09488-4>
- Al-Ghazzewi, F. H., & Tester, R. F. (2012). Efficacy of cellulase and mannanase hydrolysates of konjac glucomannan to promote the growth of lactic acid bacteria. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 92(11), 2394–2396. <https://doi.org/10.1002/jsfa.5678>
- Albrecht, S., Van Muiswinkel, G. C. J., Xu, J., Schols, H. A., Voragen, A. G. J., & Gruppen, H. (2011). Enzymatic production and characterization of konjac glucomannan oligosaccharides. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 59(23), 12658–12666. <https://doi.org/10.1021/jf203091h>
- Amin, F. R., Khalid, H., Zhang, H., Rahman, S. u, Zhang, R., Liu, G., & Chen, C. (2017). Pretreatment methods of lignocellulosic biomass for anaerobic digestion. *AMB Express*, 7(1), 72. <https://doi.org/10.1186/s13568-017-0375-4>
- Araque, E., Parra, C., Freer, J., Mendonça, R., & Baeza, J. (2009). Organosolv pretreatment of *Pinus radiata* D. Don for enzymatic hydrolysis and simultaneous saccharification and fermentation to obtain bioethanol from wood. *New Biotechnology*, 25, S274–S275. <https://doi.org/10.1016/j.nbt.2009.06.619>
- Arumugam, M., Raes, J., Pelletier, E., Le Paslier, D., Yamada, T., Mende, D. R., Fernandes, G. R., Tap, J., Bruls, T., Batto, J. M., Bertalan, M., Borruel, N., Casellas, F., Fernandez, L., Gautier, L., Hansen, T., Hattori, M., Hayashi, T., Kleerebezem, M., ... Bork, P. (2011). Enterotypes of the human gut microbiome. *Nature*, 473(7346), 174–180. <https://doi.org/10.1038/nature09944>
- Bhatia, L., Johri, S., & Ahmad, R. (2012). An economic and ecological perspective of

- ethanol production from renewable agro waste: a review. *AMB Express*, 2(1), 65. <https://doi.org/10.1186/2191-0855-2-65>
- Bobleter, O. (1994). Hydrothermal degradation of polymers derived from plants. In *Progress in Polymer Science* (Vol. 19, Issue 5, pp. 797–841). Pergamon. [https://doi.org/10.1016/0079-6700\(94\)90033-7](https://doi.org/10.1016/0079-6700(94)90033-7)
- Brosse, N., Sannigrahi, P., & Ragauskas, A. (2009). Pretreatment of miscanthus x giganteus using the ethanol organosolv process for ethanol production. *Industrial and Engineering Chemistry Research*, 48(18), 8328–8334. <https://doi.org/10.1021/ie9006672>
- Buck, L. M., & Gilliland, S. E. (1994). Comparisons of Freshly Isolated Strains of *Lactobacillus acidophilus* of Human Intestinal Origin for Ability to Assimilate Cholesterol During Growth. *Journal of Dairy Science*, 77(10), 2925–2933. [https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302\(94\)77233-7](https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302(94)77233-7)
- Budzianowski, W. M. (2017). High-value low-volume bioproducts coupled to bioenergies with potential to enhance business development of sustainable biorefineries. In *Renewable and Sustainable Energy Reviews* (Vol. 70, pp. 793–804). Elsevier Ltd. <https://doi.org/10.1016/j.rser.2016.11.260>
- Candela, M., Guidotti, M., Fabbri, A., Brigidi, P., Franceschi, C., & Fiorentini, C. (2011). Human intestinal microbiota: Cross-talk with the host and its potential role in colorectal cancer. In *Critical Reviews in Microbiology* (Vol. 37, Issue 1, pp. 1–14). Taylor & Francis. <https://doi.org/10.3109/1040841X.2010.501760>
- Carlson, J. L., Erickson, J. M., Lloyd, B. B., & Slavin, J. L. (2018). Health Effects and Sources of Prebiotic Dietary Fiber. *Current Developments in Nutrition*, 2(3). <https://doi.org/10.1093/cdn/nzy005>
- Carvalho, A. F. A., Neto, P. de O., da Silva, D. F., & Pastore, G. M. (2013). Xylo-oligosaccharides from lignocellulosic materials: Chemical structure, health benefits and production by chemical and enzymatic hydrolysis. *Food Research International*, 51(1), 75–85. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2012.11.021>
- Cheng, J. J., & Timilsina, G. R. (2011). Status and barriers of advanced biofuel technologies: A review. *Renewable Energy*, 36(12), 3541–3549. <https://doi.org/10.1016/j.renene.2011.04.031>
- Claesson, M. J., Van Sinderen, D., & O'toole, P. W. (n.d.). *The genus Lactobacillus ^ a genomic basis for understanding its diversity*. <https://doi.org/10.1111/j.1574-6968.2006.00596.x>
- Coeuret, V., Dubernet, S., Bernardeau, M., Gueguen, M., & Vernoux, J. P. (2003). Isolation, characterisation and identification of lactobacilli focusing mainly on cheeses and other dairy products. In *Lait* (Vol. 83, Issue 4, pp. 269–306). <https://doi.org/10.1051/lait:2003019i>
- De Vrese, M., & Schrezenmeir, J. (2008). Probiotics, prebiotics, and synbiotics. In

*Advances in Biochemical Engineering/Biotechnology* (Vol. 111, pp. 1–66). Adv Biochem Eng Biotechnol. [https://doi.org/10.1007/10\\_2008\\_097](https://doi.org/10.1007/10_2008_097)

- Del Rio, L. F., Chandra, R. P., & Saddler, J. N. (2010). The effect of varying organosolv pretreatment chemicals on the physicochemical properties and cellulolytic hydrolysis of mountain pine beetle-killed lodgepole pine. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, *161*(1–8), 1–21. <https://doi.org/10.1007/s12010-009-8786-6>
- Den Besten, G., Van Eunen, K., Groen, A. K., Venema, K., Reijngoud, D. J., & Bakker, B. M. (2013). The role of short-chain fatty acids in the interplay between diet, gut microbiota, and host energy metabolism. In *Journal of Lipid Research* (Vol. 54, Issue 9, pp. 2325–2340). American Society for Biochemistry and Molecular Biology. <https://doi.org/10.1194/jlr.R036012>
- Duff, S. J. B., & Murray, W. D. (1996). Bioconversion of forest products industry waste cellulose to fuel ethanol: A review. In *Bioresource Technology* (Vol. 55, Issue 1, pp. 1–33). Elsevier Science Ltd. [https://doi.org/10.1016/0960-8524\(95\)00122-0](https://doi.org/10.1016/0960-8524(95)00122-0)
- Energy.gov. (2019). *Biomass Resources | Department of Energy*. <https://www.energy.gov/eere/bioenergy/biomass-resources>
- Erkkilä, S., & Petäjä, E. (2000). Screening of commercial meat starter cultures at low pH and in the presence of bile salts for potential probiotic use. *Meat Science*, *55*(3), 297–300. [https://doi.org/10.1016/S0309-1740\(99\)00156-4](https://doi.org/10.1016/S0309-1740(99)00156-4)
- Falck, P., Precha-Atsawan, S., Grey, C., Immerzeel, P., Staišlbrand, H., Adlercreutz, P., & Karlsson, E. N. (2013). Xylooligosaccharides from hardwood and cereal xylans produced by a thermostable xylanase as carbon sources for *Lactobacillus brevis* and *Bifidobacterium adolescentis* (Journal of Agricultural and Food Chemistry (2013) 61:30 (7333-7340) DOI: 10.1021. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, *61*(51), 12744. <https://doi.org/10.1021/jf404978p>
- Fernández-Dacosta, C., Posada, J. A., Kleerebezem, R., Cuellar, M. C., & Ramirez, A. (2015). Microbial community-based polyhydroxyalkanoates (PHAs) production from wastewater: Techno-economic analysis and ex-ante environmental assessment. *Bioresource Technology*, *185*, 368–377. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2015.03.025>
- Freixo, M. R., & De Pinho, M. N. (2002). Enzymatic hydrolysis of beechwood xylan in a membrane reactor. *Desalination*, *149*(1–3), 237–242. [https://doi.org/10.1016/S0011-9164\(02\)00769-5](https://doi.org/10.1016/S0011-9164(02)00769-5)
- Fu, H., Yang, S. T., Wang, M., Wang, J., & Tang, I. C. (2017). Butyric acid production from lignocellulosic biomass hydrolysates by engineered *Clostridium tyrobutyricum* overexpressing xylose catabolism genes for glucose and xylose co-utilization. *Bioresource Technology*, *234*, 389–396. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2017.03.073>

- Gandolfi, S., Ottolina, G., Consonni, R., Riva, S., & Patel, I. (2014). Fractionation of hemp hurds by organosolv pretreatment and its effect on production of lignin and sugars. *ChemSusChem*, 7(7), 1991–1999. <https://doi.org/10.1002/cssc.201301396>
- Garrote, G., & Parajó, J. C. (2002). Non-isothermal autohydrolysis of Eucalyptus wood. *Wood Science and Technology*, 36(2), 111–123. <https://doi.org/10.1007/s00226-001-0132-2>
- Garrote, Gil, Domínguez, H., & Parajó, J. C. (2002). Autohydrolysis of corncob: Study of non-isothermal operation for xylooligosaccharide production. *Journal of Food Engineering*, 52(3), 211–218. [https://doi.org/10.1016/S0260-8774\(01\)00108-X](https://doi.org/10.1016/S0260-8774(01)00108-X)
- Gibson, G. R., Probert, H. M., Loo, J. Van, Rastall, R. A., & Roberfroid, M. B. (2004). Dietary modulation of the human colonic microbiota: updating the concept of prebiotics. *Nutrition Research Reviews*, 17(2), 259–275. <https://doi.org/10.1079/NRR200479>
- Gibson, G. R., & Roberfroid, M. B. (1995). Dietary Modulation of the Human Colonic Microbiota: Introducing the Concept of Prebiotics. *The Journal of Nutrition*, 125(6), 1401–1412. <https://doi.org/10.1093/jn/125.6.1401>
- Gowdhaman, D., & Ponnusami, V. (2015). Production and optimization of xylooligosaccharides from corncob by *Bacillus aerophilus* KGJ2 xylanase and its antioxidant potential. *International Journal of Biological Macromolecules*, 79, 595–600. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2015.05.046>
- Guan, W., Xu, G., Duan, J., & Shi, S. (2018). Acetone-Butanol-Ethanol Production from Fermentation of Hot-Water-Extracted Hemicellulose Hydrolysate of Pulping Woods. *Industrial and Engineering Chemistry Research*, 57(2), 775–783. <https://doi.org/10.1021/acs.iecr.7b03953>
- Hendriks, A. T. W. M., & Zeeman, G. (2009). Pretreatments to enhance the digestibility of lignocellulosic biomass. In *Bioresource Technology* (Vol. 100, Issue 1, pp. 10–18). Elsevier Ltd. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2008.05.027>
- Holtzaple, M.T. (2003a). Encyclopedia of Food Sciences and Nutrition. *Encyclopedia of Food Sciences and Nutrition*, 998–1007. <https://doi.org/10.1016/B0-12-227055-X/00185-1>
- Holtzaple, M.T. (2003b). HEMICELLULOSES. In *Encyclopedia of Food Sciences and Nutrition* (pp. 3060–3071). Elsevier. <https://doi.org/10.1016/B0-12-227055-X/00589-7>
- Holtzaple, Mark T., Jun, J. H., Ashok, G., Patibandla, S. L., & Dale, B. E. (1991). The ammonia freeze explosion (AFEX) process - A practical lignocellulose pretreatment. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, 28–29(1), 59–74. <https://doi.org/10.1007/BF02922589>
- Hong, C., Corbett, D., Venditti, R., Jameel, H., & Park, S. (2019). Xylooligosaccharides

- as prebiotics from biomass autohydrolyzate. *Lwt*, *111*, 703–710.  
<https://doi.org/10.1016/j.lwt.2019.05.098>
- Huijgen, W. J. J., Reith, J. H., & Den Uil, H. (2010). Pretreatment and fractionation of wheat straw by an acetone-based organosolv process. *Industrial and Engineering Chemistry Research*, *49*(20), 10132–10140.  
<https://doi.org/10.1021/ie101247w>
- Irmak, S. (2017). Biomass as Raw Material for Production of High-Value Products. *Biomass Volume Estimation and Valorization for Energy*.  
<https://doi.org/10.5772/65507>
- Isikgor, F. H., & Becer, C. R. (2015). Lignocellulosic biomass: a sustainable platform for the production of bio-based chemicals and polymers. *Polymer Chemistry*, *6*(25), 4497–4559. <https://doi.org/10.1039/c5py00263j>
- Jönsson, L. J., & Martín, C. (2016). Pretreatment of lignocellulose: Formation of inhibitory by-products and strategies for minimizing their effects. In *Bioresource Technology* (Vol. 199, pp. 103–112). Elsevier Ltd.  
<https://doi.org/10.1016/j.biortech.2015.10.009>
- Kalogiannis, K. G., Matsakas, L., & Aspden, J. (2018). *Acid Assisted Organosolv Delignification of Beechwood and Pulp Conversion towards High*. 1–18.  
<https://doi.org/10.3390/molecules23071647>
- Kanna, A. R., & Ponmani, S. (2009). Production of Bioethanol from Lignocellulosic Waste. *International Journal of Petroleum Science and Technology ISSN*, *3*(1), 973–6328. [www.ijacskros.com](http://www.ijacskros.com)
- Kaparaju, P., & Felby, C. (2010). Characterization of lignin during oxidative and hydrothermal pre-treatment processes of wheat straw and corn stover. *Bioresource Technology*, *101*(9), 3175–3181.  
<https://doi.org/10.1016/j.biortech.2009.12.008>
- Katapodis, P., & Christakopoulos, P. (2005). Xylanases as a tool for the production of novel phytopharmaceuticals. *NutraCos*, *4*(2), 17–21.  
<https://www.cabdirect.org/cabdirect/abstract/20053143923>
- Katapodis, P., Kavarnou, A., Kintzios, S., Pistola, E., Kekos, D., Macris, B. J., & Christakopoulos, P. (2002). Production of acidic xylo-oligosaccharides by a family 10 endoxylanase from *Thermoascus aurantiacus* and use as plant growth regulators. *Biotechnology Letters*, *24*(17), 1413–1416.  
<https://doi.org/10.1023/A:1019898414801>
- Kataria, R., Lenzi, L., & Babu, R. (n.d.). *Effect of surfactants pre-treatment on lignocellulosic biomass*. Retrieved July 28, 2020, from [https://www.researchgate.net/figure/Effect-of-pretreatment-on-lignocellulosic-biomass\\_fig5\\_326732180](https://www.researchgate.net/figure/Effect-of-pretreatment-on-lignocellulosic-biomass_fig5_326732180)
- Katsimpouras, C., Dedes, G., Bistis, P., Kekos, D., Kalogiannis, K. G., & Topakas, E.

- (2018). Acetone/water oxidation of corn stover for the production of bioethanol and prebiotic oligosaccharides. *Bioresource Technology*, 270(July), 208–215. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2018.09.018>
- Katsimpouras, C., Dedes, G., Thomaidis, N. S., & Topakas, E. (2019). A novel fungal GH30 xylanase with xylobiohydrolase auxiliary activity. *Biotechnology for Biofuels*, 12(1), 120. <https://doi.org/10.1186/s13068-019-1455-2>
- Kim, D. E., & Pan, X. (2010). Preliminary study on converting hybrid poplar to high-value chemicals and lignin using organosolv ethanol process. *Industrial and Engineering Chemistry Research*, 49(23), 12156–12163. <https://doi.org/10.1021/ie101671r>
- Kim, J. S., Lee, Y. Y., & Kim, T. H. (2016). A review on alkaline pretreatment technology for bioconversion of lignocellulosic biomass. In *Bioresource Technology* (Vol. 199, pp. 42–48). Elsevier Ltd. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2015.08.085>
- Klemm, D., Heublein, B., Fink, H. P., & Bohn, A. (2005). Cellulose: Fascinating biopolymer and sustainable raw material. In *Angewandte Chemie - International Edition* (Vol. 44, Issue 22, pp. 3358–3393). Angew Chem Int Ed Engl. <https://doi.org/10.1002/anie.200460587>
- Kontula, P., Jaskari, J., Nollet, L., De Smet, I., Von Wright, A., Poutanen, K., & Mattila-Sandholm, T. (1998). The colonization of a simulator of the human intestinal microbial ecosystem by a probiotic strain fed on a fermented oat bran product: Effects on the gastrointestinal microbiota. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 50(2), 246–252. <https://doi.org/10.1007/s002530051284>
- Kucharska, K., Rybarczyk, P., Hołowacz, I., Łukajtis, R., Glinka, M., & Kamiński, M. (2018). Pretreatment of lignocellulosic materials as substrates for fermentation processes. *Molecules*, 23(11), 1–32. <https://doi.org/10.3390/molecules23112937>
- Kumar, P., Barrett, D. M., Delwiche, M. J., & Stroeve, P. (2009). Methods for pretreatment of lignocellulosic biomass for efficient hydrolysis and biofuel production. In *Industrial and Engineering Chemistry Research* (Vol. 48, Issue 8, pp. 3713–3729). <https://doi.org/10.1021/ie801542g>
- Kumar, R., Kaur, M., Garsa, A. K., Shrivastava, B., Reddy, V. P., & Tyagi, A. (2015). Natural and cultured buttermilk. *Fermented Milk and Dairy Products*, May, 203–226. <https://doi.org/10.1201/b18987>
- Li, X., Luo, Y., Daroch, M., Hou, J., & Gui, W. (2018). Oxygen-assisted ethanol organosolv pretreatment of sugarcane bagasse for efficient removal of hemicellulose and lignin. *Cellulose*, 25(10), 5511–5522. <https://doi.org/10.1007/s10570-018-1960-7>
- Ligero, P., Villaverde, J. J., de Vega, A., & Bao, M. (2008). Delignification of Eucalyptus globulus saplings in two organosolv systems (formic and acetic acid). *Industrial*

- Crops and Products*, 27(1), 110–117.  
<https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2007.08.008>
- Liu, R., Liang, L., Li, F., Wu, M., Chen, K., Ma, J., Jiang, M., Wei, P., & Ouyang, P. (2013). Efficient succinic acid production from lignocellulosic biomass by simultaneous utilization of glucose and xylose in engineered *Escherichia coli*. *Bioresource Technology*, 149, 84–91.  
<https://doi.org/10.1016/j.biortech.2013.09.052>
- Liu, X., Cao, S., & Zhang, X. (2015). Modulation of Gut Microbiota-Brain Axis by Probiotics, Prebiotics, and Diet. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 63(36), 7885–7895. <https://doi.org/10.1021/acs.jafc.5b02404>
- Louis, P., Flint, H. J., & Michel, C. (2016). How to manipulate the microbiota: Prebiotics. In *Advances in Experimental Medicine and Biology* (Vol. 902, pp. 119–142). Springer New York LLC. [https://doi.org/10.1007/978-3-319-31248-4\\_9](https://doi.org/10.1007/978-3-319-31248-4_9)
- Mamo, G. (2020). Alkaline Active Hemicellulases. In *Advances in Biochemical Engineering/Biotechnology* (Vol. 172, pp. 245–291). Springer.  
[https://doi.org/10.1007/10\\_2019\\_101](https://doi.org/10.1007/10_2019_101)
- Mirfakhar, M., Asadollahi, M. A., Amiri, H., & Karimi, K. (2020). Co-fermentation of hemicellulosic hydrolysates and starch from sweet sorghum by *Clostridium acetobutylicum*: A synergistic effect for butanol production. *Industrial Crops and Products*, 151(April), 112459. <https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2020.112459>
- Mohagheghi, A., Ruth, M., & Schell, D. J. (2006). Conditioning hemicellulose hydrolysates for fermentation: Effects of overliming pH on sugar and ethanol yields. *Process Biochemistry*, 41(8), 1806–1811.  
<https://doi.org/10.1016/j.procbio.2006.03.028>
- Mok, W. S. L., & Antal, M. J. (1992). Uncatalyzed Solvolysis of Whole Biomass Hemicellulose by Hot Compressed Liquid Water. *Industrial and Engineering Chemistry Research*, 31(4), 1157–1161. <https://doi.org/10.1021/ie00004a026>
- Montané, D., Nabarlantz, D., Martorell, A., Torné-Fernández, V., & Fierro, V. (2006). Removal of lignin and associated impurities from xylo-oligosaccharides by activated carbon adsorption. *Industrial and Engineering Chemistry Research*, 45(7), 2294–2302. <https://doi.org/10.1021/ie051051d>
- Moro, G., Arslanoglu, S., Stahl, B., Jelinek, J., Wahn, U., & Boehm, G. (2006). A mixture of prebiotic oligosaccharides reduces the incidence of atopic dermatitis during the first six months of age. *Archives of Disease in Childhood*, 91(10), 814–819. <https://doi.org/10.1136/adc.2006.098251>
- Mussatto, S. I., & Roberto, I. C. (2004). Alternatives for detoxification of diluted-acid lignocellulosic hydrolyzates for use in fermentative processes: A review. In *Bioresource Technology* (Vol. 93, Issue 1, pp. 1–10). Elsevier Ltd.  
<https://doi.org/10.1016/j.biortech.2003.10.005>

- Nagel, B., Dellweg, H., & Gierasch, L. M. (2007). Glossary for chemists of terms used in biotechnology (IUPAC Recommendations 1992). *Pure and Applied Chemistry*, 64(1), 143–168. <https://doi.org/10.1351/pac199264010143>
- Nauman Aftab, M., Iqbal, I., Riaz, F., Karadag, A., & Tabatabaei, M. (2019). Different Pretreatment Methods of Lignocellulosic Biomass for Use in Biofuel Production. In *Biomass for Bioenergy - Recent Trends and Future Challenges*. IntechOpen. <https://doi.org/10.5772/intechopen.84995>
- Nguyen, T. Y., Cai, C. M., Kumar, R., & Wyman, C. E. (2015). Co-solvent Pretreatment Reduces Costly Enzyme Requirements for High Sugar and Ethanol Yields from Lignocellulosic Biomass. *ChemSusChem*, 8(10), 1716–1725. <https://doi.org/10.1002/cssc.201403045>
- Oliveira, D. M., Mota, T. R., Salatta, F. V., Marchiosi, R., Gomez, L. D., McQueen-Mason, S. J., Ferrarese-Filho, O., & dos Santos, W. D. (2019). Designing xylan for improved sustainable biofuel production. *Plant Biotechnology Journal*, 17(12), 2225–2227. <https://doi.org/10.1111/pbi.13150>
- Olsson, C., & Westm, G. (2013). Direct Dissolution of Cellulose: Background, Means and Applications. In *Cellulose - Fundamental Aspects*. InTech. <https://doi.org/10.5772/52144>
- Palm, M., & Zacchi, G. (2003). Extraction of hemicellulosic oligosaccharides from spruce using microwave oven or steam treatment. *Biomacromolecules*, 4(3), 617–623. <https://doi.org/10.1021/bm020112d>
- Pan, X. J.; Gilkes, N.; Kadla, J.; Pye, K.; Saka, S.; Gregg, D. . E., & K.; Xie, D.; Lam, D.; Saddler, J. (2006). Bioconversion of Hybrid Poplar to Ethanol and Co-Products Using an Organosolv Fractionation Process: Optimization of Process Yields. *Journal of Anatomy*, 94(5), 851–861. <https://doi.org/10.1002/bit>
- Pan, X., Xie, D., Yu, R. W., Lam, D., & Saddler, J. N. (2007). Pretreatment of lodgepole pine killed by mountain pine beetle using the ethanol organosolv process: Fractionation and process optimization. *Industrial and Engineering Chemistry Research*, 46(8), 2609–2617. <https://doi.org/10.1021/ie061576l>
- Pellerin, P., Gosselin, M., Lepoutre, J. P., Samain, E., & Debeire, P. (1991). Enzymic production of oligosaccharides from corncob xylan. *Enzyme and Microbial Technology*, 13(8), 617–621. [https://doi.org/10.1016/0141-0229\(91\)90074-K](https://doi.org/10.1016/0141-0229(91)90074-K)
- Persson, T., Matusiak, M., Zacchi, G., & Jönsson, A. S. (2006). Extraction of hemicelluloses from process water from the production of masonite. *Desalination*, 199(1–3), 411–412. <https://doi.org/10.1016/j.desal.2006.03.093>
- Pokusaeva, K., Fitzgerald, G. F., & Van Sinderen, D. (2011). Carbohydrate metabolism in Bifidobacteria. In *Genes and Nutrition* (Vol. 6, Issue 3, pp. 285–306). BioMed Central. <https://doi.org/10.1007/s12263-010-0206-6>
- R. Fuller. (1993). *Probiotic food current use and future devel- opments. International*



*of Food Ingredients.*

- Rabemanolontsoa, H., & Saka, S. (2016). Various pretreatments of lignocellulosics. In *Bioresource Technology* (Vol. 199, pp. 83–91). Elsevier Ltd. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2015.08.029>
- Reginatto, V., & Antônio, R. V. (2015). Fermentative hydrogen production from agroindustrial lignocellulosic substrates. In *Brazilian Journal of Microbiology* (Vol. 46, Issue 2, pp. 323–335). Sociedade Brasileira de Microbiologia. <https://doi.org/10.1590/S1517-838246220140111>
- Rubin, E. M. (2008). Genomics of cellulosic biofuels. In *Nature* (Vol. 454, Issue 7206, pp. 841–845). Nature Publishing Group. <https://doi.org/10.1038/nature07190>
- Saha, B. C. (2005). Enzymes as biocatalysts for conversion of lignocellulosic biomass to fermentable sugars. *Handbook of Industrial Biocatalysis*, 1–12.
- Saini, J. K., Saini, R., & Tewari, L. (2015). Lignocellulosic agriculture wastes as biomass feedstocks for second-generation bioethanol production: concepts and recent developments. In *3 Biotech* (Vol. 5, Issue 4, pp. 337–353). Springer Verlag. <https://doi.org/10.1007/s13205-014-0246-5>
- Samanta, A. K., Jayapal, N., Jayaram, C., Roy, S., Kolte, A. P., Senani, S., & Sridhar, M. (2015). Xylooligosaccharides as prebiotics from agricultural by-products: Production and applications. *Bioactive Carbohydrates and Dietary Fibre*, 5(1), 62–71. <https://doi.org/10.1016/j.bcdf.2014.12.003>
- Sannigrahi, P., & Ragauskas, A. J. (2013). *Fundamentals of Biomass Pretreatment by Fractionation*.
- Sarkanen, K. V. (1980). *Acid-Catalyzed Delignification of Lignocellulosics in Organic Solvents* (Vol. 2, pp. 127–144). Elsevier. <https://doi.org/10.1016/b978-0-12-535902-3.50010-5>
- Sarkanen, K. V., Chang, H.-M., & Ericsson, B. (1967). Species variation in lignins. I. Infrared spectra of guaiacyl and syringyl models. *Tappi*, 50(11), 572–590.
- Seidl, P. R., & Goulart, A. K. (2016). Pretreatment processes for lignocellulosic biomass conversion to biofuels and bioproducts. *Current Opinion in Green and Sustainable Chemistry*, 2, 48–53. <https://doi.org/10.1016/j.cogsc.2016.09.003>
- Serrano, L., Cecilia, J. A., García-Sancho, C., & García, A. (2019). Lignin Depolymerization to BTXs. In *Topics in Current Chemistry* (Vol. 377, Issue 5, pp. 1–28). Springer International Publishing. <https://doi.org/10.1007/s41061-019-0251-6>
- Sgorbati, B., Biavati, B., & Palenzona, D. (1995). The genus *Bifidobacterium*. In *The Genera of Lactic Acid Bacteria* (pp. 279–306). Springer US. [https://doi.org/10.1007/978-1-4615-5817-0\\_8](https://doi.org/10.1007/978-1-4615-5817-0_8)
- Shafizadeh, F., & Bradbury, A. G. W. (1979). Thermal degradation of cellulose in air

- and nitrogen at low temperatures. *Journal of Applied Polymer Science*, 23(5), 1431–1442. <https://doi.org/10.1002/app.1979.070230513>
- Socol, C. R., Vandenberghe, L. P. de S., Spier, M. R., Medeiros, A. B. P., Yamaguishi, C. T., De Dea Lindner, J., Pandey, A., & Thomaz-Socol, V. (2010). The potential of probiotics: A review. *Food Technology and Biotechnology*, 48(4), 413–434.
- Soni, S. K., Sharma, A., & Soni, R. (2018). Cellulases: Role in lignocellulosic biomass utilization. *Methods in Molecular Biology*, 1796, 3–23. [https://doi.org/10.1007/978-1-4939-7877-9\\_1](https://doi.org/10.1007/978-1-4939-7877-9_1)
- Sun, Y., & Cheng, J. (2002). Hydrolysis of lignocellulosic materials for ethanol production: a review. *Bioresource Technology*, 83(1), 1–11. [https://doi.org/10.1016/S0960-8524\(01\)00212-7](https://doi.org/10.1016/S0960-8524(01)00212-7)
- Taherzadeh, M. J., & Karimi, K. (2008). Pretreatment of lignocellulosic wastes to improve ethanol and biogas production: A review. In *International Journal of Molecular Sciences* (Vol. 9, Issue 9, pp. 1621–1651). Molecular Diversity Preservation International. <https://doi.org/10.3390/ijms9091621>
- Taherzadeh, M., & Karimi, K. (2008). Pretreatment of Lignocellulosic Wastes to Improve Ethanol and Biogas Production: A Review. *International Journal of Molecular Sciences*, 9(9), 1621–1651. <https://doi.org/10.3390/ijms9091621>
- Tannock, G. W. (2004). A special fondness for lactobacilli. In *Applied and Environmental Microbiology* (Vol. 70, Issue 6, pp. 3189–3194). American Society for Microbiology (ASM). <https://doi.org/10.1128/AEM.70.6.3189-3194.2004>
- Tannock, G. W. (2010). Analysis of Bifidobacterial Populations in Bowel Ecology Studies. In *Bifidobacteria: Genomics and Molecular Aspects* (pp. 1–15). <https://www.caister.com/hsp/abstracts/bifidobacteria/01.html>
- Teleman, A., Lundqvist, J., Tjerneld, F., Stålbrand, H., & Dahlman, O. (2000). Characterization of acetylated 4-O-methylglucuronoxylan isolated from aspen employing <sup>1</sup>H and <sup>13</sup>C NMR spectroscopy. *Carbohydrate Research*, 329(4), 807–815. [https://doi.org/10.1016/S0008-6215\(00\)00249-4](https://doi.org/10.1016/S0008-6215(00)00249-4)
- Teramoto, Y., Lee, S. H., & Endo, T. (2008). Pretreatment of woody and herbaceous biomass for enzymatic saccharification using sulfuric acid-free ethanol cooking. *Bioresource Technology*, 99(18), 8856–8863. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2008.04.049>
- Tester, R. F., & Al-Ghazzewi, F. H. (2013). Mannans and health, with a special focus on glucomannans. *Food Research International*, 50(1), 384–391. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2012.10.037>
- Thammarutwasik, P., Hongpattarakere, T., & Chantachum, S. (2009). Prebiotics - A Review Prebiotics – A Review. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 4(October), 401–408.
- Tomás-Pejó, E., Alvira, P., Ballesteros, M., & Negro, M. J. (2011). Pretreatment

- Technologies for Lignocellulose-to-Bioethanol Conversion. In *Biofuels* (pp. 149–176). Elsevier. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-385099-7.00007-3>
- Ur-Rehman, S., Mushtaq, Z., Zahoor, T., Jamil, A., & Murtaza, M. A. (2015). Xylitol: A Review on Bioproduction, Application, Health Benefits, and Related Safety Issues. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, *55*(11), 1514–1528. <https://doi.org/10.1080/10408398.2012.702288>
- Vardakou, M., Katapodis, P., Topakas, E., Kekos, D., Macris, B. J., & Christakopoulos, P. (2004). Synergy between enzymes involved in the degradation of insoluble wheat flour arabinoxylan. *Innovative Food Science and Emerging Technologies*, *5*(1), 107–112. [https://doi.org/10.1016/S1466-8564\(03\)00044-4](https://doi.org/10.1016/S1466-8564(03)00044-4)
- Vázquez, M. J., Garrote, G., Alonso, J. L., Domínguez, H., & Parajó, J. C. (2005). Refining of autohydrolysis liquors for manufacturing xylooligosaccharides: Evaluation of operational strategies. *Bioresource Technology*, *96*(8), 889–896. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2004.08.013>
- Villarreal, M. L. M., Prata, A. M. R., Felipe, M. G. A., & Almeida E Silva, J. B. (2006). Detoxification procedures of eucalyptus hemicellulose hydrolysate for xylitol production by *Candida guilliermondii*. *Enzyme and Microbial Technology*, *40*(1), 17–24. <https://doi.org/10.1016/j.enzmictec.2005.10.032>
- Villaverde, J. J., Li, J., Ligeró, P., Ek, M., & de Vega, A. (2012). Mild peroxyformic acid fractionation of *Miscanthus giganteus* bark. Behaviour and structural characterization of lignin. *Industrial Crops and Products*, *35*(1), 261–268. <https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2011.07.013>
- Wang, D. (2003). Structure and Properties of Hemicellulose. *University of Taiwan*.
- Wang, D. (2008). Basic Lignin Chemistry. *University of Taiwan*. <http://web.nchu.edu.tw/pweb/users/taiwanfir/lesson/10476.pdf>
- Yan, T. R., & Liao, J. C. (1998a). Synthesis of cello-oligosaccharides from cellobiose with  $\beta$ -glucosidase II from *Aspergillus niger*. *Biotechnology Letters*, *20*(6), 591–594. <https://doi.org/10.1023/A:1005310014070>
- Yan, T. R., & Liao, J. C. (1998b). Synthesis of cello-oligosaccharides from cellobiose with  $\beta$ -glucosidase II from *Aspergillus niger*. *Biotechnology Letters*, *20*(6), 591–594. <https://doi.org/10.1023/A:1005310014070>
- Yuan, Q. P., Zhang, H., Qian, Z. M., & Yang, X. J. (2004). Pilot-plant production of xylo-oligosaccharides from corncob by steaming, enzymatic hydrolysis and nanofiltration. *Journal of Chemical Technology and Biotechnology*, *79*(10), 1073–1079. <https://doi.org/10.1002/jctb.1071>
- Zabed, H., Sahu, J. N., Boyce, A. N., & Faruq, G. (2016). Fuel ethanol production from lignocellulosic biomass: An overview on feedstocks and technological approaches. *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, *66*, 751–774. <https://doi.org/10.1016/j.rser.2016.08.038>

- Zhang, Y. H. P., Ding, S. Y., Mielenz, J. R., Cui, J. B., Elander, R. T., Laser, M., Himmel, M. E., McMillan, J. R., & Lynd, L. R. (2007). Fractionating recalcitrant lignocellulose at modest reaction conditions. *Biotechnology and Bioengineering*, 97(2), 214–223. <https://doi.org/10.1002/bit.21386>
- Zhang, Z., Harrison, M. D., Rackemann, D. W., Doherty, W. O. S., Hara, I. M. O., & Harrison, M. D. (2016). *enhanced enzymatic saccharification*. 360–381. <https://doi.org/10.1039/c5gc02034d>
- Zhao, X., Cheng, K., & Liu, D. (2009). Organosolv pretreatment of lignocellulosic biomass for enzymatic hydrolysis. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 82(5), 815–827. <https://doi.org/10.1007/s00253-009-1883-1>