ΕΘΝΙΚΟ ΜΕΤΣΟΒΙΟ ΠΟΛΥΤΕΧΝΕΙΟ

ΣΧΟΛΗ ΧΗΜΙΚΩΝ ΜΗΧΑΝΙΚΩΝ

ΕΝΖΥΜΙΚΗ ΥΔΡΟΛΥΣΗ ΛΙΓΝΟΚΥΤΤΑΡΙΝΟΥΧΑΣ ΒΙΟΜΑΖΑΣ ΚΑΙ ΠΑΡΑΓΩΓΗ ΓΑΛΑΚΤΙΚΟΥ ΟΞΕΟΣ ΑΠΟ ΒΑΚΤΗΡΙΑ

Διπλωματική Εργασία
Περράκη Διώνη - Ιωάννα

Επιβλέπων : Τόπακας Ευάγγελος

Αθήνα 2019

Περιεχόμενα

Κατάλογος διαγραμμάτων

Κατάλογος πινάκων

Κατάλογος σχημάτων

Κατάλογος εικόνων

Περίληψη

Το γαλακτικό οξύ αποτελεί ένα σημαντικό βιοπροϊόν με πολλαπλές εφαρμογές. Τα τελευταία χρόνια εξετάζεται η παραγωγή του μέσω βιολογικών διεργασιών με την ζύμωση βιομάζας από μικροοργανισμούς. Η διεργασία εξετάζεται με διαφορετικούς τρόπους και συνθήκες με σκοπό να μειωθούν οι παράγοντες παρεμποδισμού να μεγιστοποιηθεί η παραγωγικότητα γαλακτικού οξέος, να μειωθεί το κόστος παραγωγής και να προκύψει ένα αποδοτικό αποτέλεσμα στα πλαίσια της κυκλικής οικονομίας.

Σκοπός του παρόντος πειράματος ήταν η ενζυμική υδρόλυση της προκατεργασμένης λιγνοκυτταρινούχας βιομάζας από ξύλο οξιάς και η παραγωγή γαλακτικού οξέος από την γαλακτική ζύμωση βακτηρίων. Διεξήχθηκαν πειράματα ενζυμικής υδρόλυσης με διαφορετικές συγκεντρώσεις ξηρής βιομάζας και ενζυμικού φορτιού και ζυμώσεις από δύο είδη βακτηρίων με καθαρές πηγές άνθρακα, με ταυτόχρονη σακχαροποίηση και ζύμωση (*simultaneous saccharification and fermentation*, SSF) και διακριτή υδρόλυση και ζύμωση (*separate hydrolysis and fermentation*, SHF). Τα αποτελέσματα υδρόλυσης διαφοροποιήθηκαν ανάλογα με τις συνθήκες πειράματος, ήταν όμως για κάθε συνθήκη αρκετά αποδοτικά. Από τα πειράματα με τους μικροοργανισμούς περισσότερο αποτελεσματικές ήταν οι ζυμώσει από τον *Lactobacillus delbrueckii*, ενώ οι ζυμώσεις από τον *Bacillus coagulans* απαιτούν περισσότερη έρευνα για την βελτίωση των αποδόσεων.

Abstract

Lactic acid is an important bio-product with multiple applications. In recent years, its production has been examined by the fermentation of biomass by microorganisms. The process is being examined in different ways and conditions in order to reduce the inhibitors' effect, to increase lactic acid productivity, reduce costs and achieve a cost-effective result in a circular economy.

The purpose of the present experiment was the enzymatic hydrolysis of pre-treated lignocellulosic biomass from beech wood and the production of lactic acid with fermentation by bacteria. Enzymatic hydrolysis experiments were performed with different concentrations of dry biomass and enzyme loading and fermentation by two types of bacteria with pure carbon sources, with simultaneous saccharification and fermentation, (SSF) and separate hydrolysis and fermentation, (SHF). The hydrolysis results was different according to the experimental conditions, but were efficient for each condition. Fermentation by *Lactobacillus delbrueckii* was more effective, whereas fermentation by *Bacillus coagulans* required more research for better yields.

Εισαγωγή

Τις τελευταίες δεκαετίες, οι χημικές ουσίες διύλισης έχουν προκαλέσει παγκόσμια ανησυχία λόγω των περιβαλλοντικών επιπτώσεων και των περιορισμένων ενεργειακών αποθεμάτων. Πολλά χημικά προϊόντα παράγονται μέσω βιολογικών διεργασιών αντί για πετροχημικές διεργασίες, πολλά από τα οποία αποτελούν προϊόντα προστιθέμενης αξίας, όπως το γαλακτικό οξύ. Το γαλακτικό οξύ είναι ένα σημαντικό βιοπροϊόν λόγω της υψηλής απόδοσής του σε γλυκόζης και των ευρέως διαδεδομένων εφαρμογών του. Συγκεκριμένα, η πρόσφατη ζήτηση σε βιοαποικοδομήσιμα και βιοσυμβατά πολυμερή αύξησε έντονα το παγκόσμιο ενδιαφέρον για βιοπολυμερές πολυγαλακτικό οξύ (poly-lactic acid, PLA) και κατ'επέκταση για την παραγωγή γαλακτικού οξέος. Μέχρι σήμερα, η επιτυχημένη εμπορική παραγωγή γαλακτικού οξέος συνεπάγεται τη χρήση καθαρών σακχάρων ή εδώδιμων καλλιεργειών που όμως λόγω της έλλειψης τέτοιων πρώτων υλών, το υψηλό κόστος παραγωγής του εμποδίζει την εφαρμογή του PLA σε μεγαλύτερη κλίμακα. Εναλλακτική λύση αποτελεί η χρήση της βιομάζας, όπως τα λιγνοκυτταρινούχα κατάλοιπα, ως πηγή άνθρακα για μικροοργανισμούς ικανούς να ζυμώσουν γαλακτικό οξύ σε μεγάλη απόδοση. [1]

Θεωρητικό μέρος

Λιγνοκυτταρινούχα Βιομάζα

Προέλευση – Σύσταση

Λιγνοκυτταρινούχα υλικά αποτελούν τα δασικά απόβλητα, τα γεωργικά υπολείμματα και τα αστικά στερεά απόβλητα αποτελώντας το 50% της παγκόσμιας βιομάζας. Η λιγνοκυτταρινούχα βιομάζα αποτελείται κυρίως από κυτταρίνη, ημικυτταρίνη και λιγνίνη. Η κυτταρίνη είναι ένας πολυσακχαρίτης που συνιστά μια γραμμική αλυσίδα μερικών εκατοντάδων έως δέκα χιλιάδων μονάδων β (1,4)-D γλυκόζης. Η ημικυτταρίνη αποτελείται από μικρές αλυσίδες ετερογενών πολυμερών που σχηματίζονται από τις πεντόζες, D-ξυλόζη και L-αραβινόζη, και τις εξόζες, D-μαννόζη, D-γλυκόζη, D-γαλακτόζη σε συνδυασμό με D-γλυκουρονικό και D-γαλακτουρονικό οξύ και μικρές συγκεντρώσεις δεοξυεξοζών όπως είναι η L–ραμνόζη και L–φουκόζη [2, 3]. Η διακλαδισμένη δομή της ημικυτταρίνης την καθιστά πιο εύκολα υδρολύσιμη από την κυτταρίνη. Η λιγνίνη είναι ένα άμορφο τρισδιάστατο, σφαιρικό, αδιάλυτο, υψηλού μοριακού βάρους (>10000) πολυμερές, με βασική δομική μονάδα το φαινυλοπροπάνιο, χωρίς αλυσίδες κανονικά επαναλαμβανόμενων μονάδων, ή κάποιους δεσμούς που να υδρολύονται εύκολα, είτε χημικά, είτε ενζυμικά, υδρολύεται κυρίως με αλκαλικά διαλύματα σε υψηλές θερμοκρασίες [4]. Το μαλακό ξύλο γενικά περιέχει περισσότερη λιγνίνη από το σκληρό ξύλο και η ημικυτταρίνη μαλακού ξύλου έχει υψηλότερη αναλογία μονάδων μαννόζης και γλυκόζης από την ημικυτταρίνη σκληρού ξύλου, η οποία συνήθως περιέχει υψηλότερη αναλογία μονάδων ξυλόζης. Επίσης, η ημικυτταρίνη είναι περισσότερο ακετυλιωμένη σε σκληρά ξύλα παρά σε μαλακά [5]. Στην παρούσα εργασία χρησιμοποιήθηκε ως πρώτη ύλη για την παραγωγή λιγνοκυτταρινούχων υδρολιμάτων βιομάζα προερχόμενη από οξιά, που αποτελεί σκληρό ξύλο. Η λιγνοκυτταρινούχα βιομάζα που προέρχεται από οξιά αποτελείται από 48.5% κυτταρίνη 30.8% ημικυτταρίνη και 27.3% λιγνίνη [6].

Προκατεργασία

Σκοπός της προκατεργασίας

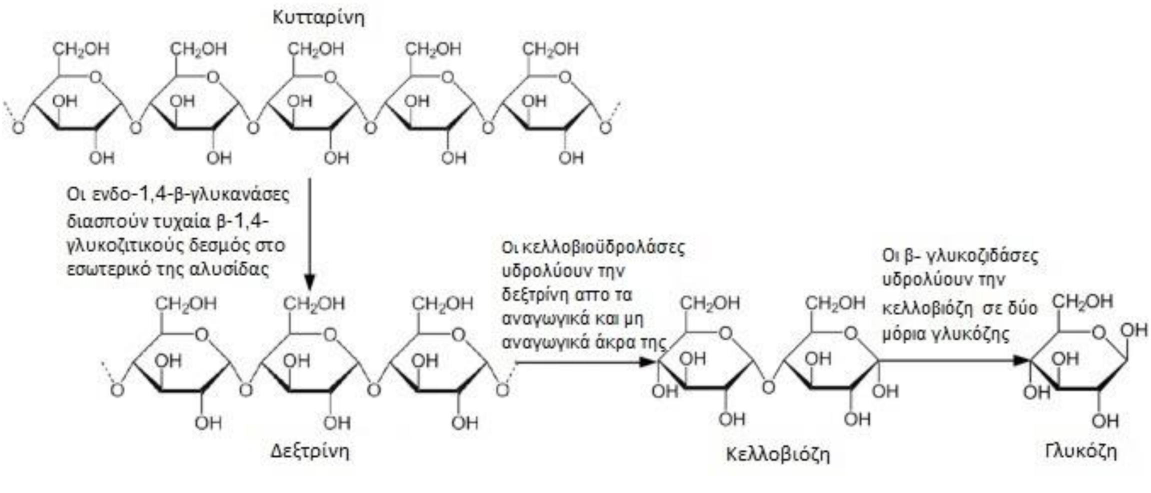
Η προκατεργασία είναι το σημαντικότερο στάδιο της αξιοποίησης της βιομάζας αλλά και το πιο δαπανηρό, αγγίζοντας μέχρι και το 40% του συνολικού κόστους μιας διεργασίας [7]. Με την προκατεργασία προκαλούνται ρωγμές και θραύση του υλικού, υδρολύεται η ημικυτταρίνη και η λιγνίνη υπόκειται σε δομικές αλλαγές που την αποδεσμεύουν από την κυτταρίνη με αποτέλεσμα τη μείωση της κρυσταλλικότητας και του βαθμού πολυμερισμού της κυτταρίνης και την αύξηση της ενεργής επιφάνειας του υλικού. Μία αποτελεσματική προκατεργασία οφείλει να οδηγεί σε απελευθέρωση, ή να αυξάνει την απόδοση παραγωγής, σακχάρων κατά την ενζυμική υδρόλυση, να διατηρεί τα κλάσματα των πεντοζών, να περιορίζει τον σχηματισμό προϊόντων αποικοδόμησης, τα οποία αναστέλλουν την ανάπτυξη των μικροοργανισμών ζύμωσης, να ελαχιστοποιεί τις ενεργειακές ανάγκες και να περιορίζει το κόστος [8, 1089].

Μέθοδοι προκατεργασίας

Οι μέθοδοι προκατεργασίας της βιομάζας κατηγοριοποιούνται σε φυσικές, χημικές, φυσικοχημικές και βιολογικές διεργασίες. Η επιλογή και ο συνδυασμός των μεθόδων ποικίλει ανάλογα με το είδος της βιομάζας, της δαπάνες και τις απαιτήσεις. Οι φυσικές αποτελούν την μηχανική επεξεργασία της βιομάζας όπως την άλεση με σκοπό την τροποποίηση της δομής του λιγνοκυτταρινούχου υλικού και τη μείωση της κρυσταλλικότητάς του καθιστώντας το περισσότερο επιδεκτικό στις κυτταρινάσες [10]. Η μέθοδος αυτή είναι βέβαια αρκετά δαπανηρή λόγω της μεγάλης ενέργειας που απαιτείται και ταυτόχρονα δεν απομακρύνεται η λιγνίνη του υλικού [11, 12]. Οι χημικές μέθοδοι αποτελούν προκατεργασίας της βιομάζας με χημικό διαλύτη όπως αλκάνια ή οξέα. Στην κατηγορία αυτή ανήκει και η οργανολυτική προκατεργασία (τυπου organosolv), δηλαδή επεξεργασία με οργανικούς διαλύτες όπως μεθανόλη, αιθανόλη, ακετόνη, τετραϋδροφουράνιο (THF), γλυκόλη και τετραϋδροφουρφουρυλική αλκοόλη, με στόχο την παραγωγή ενός μερικώς απολιγνινοποιημένου υλικού [11]. Στη μέθοδο *organosolv*, τα υλικά αναμιγνύονται με οργανικούς διαλύτες και νερό και θερμαίνονται, σε θερμοκρασία 150-200 °C ανάλογα με τον τύπο των υλικών, για τη διάλυση της λιγνίνης και της ημικυτταρίνης αφήνοντας στο στερεό υπόλειμμα την κυτταρίνη, προσβάσιμη σε ένζυμα κατά τη διάρκεια του σταδίου σακχαροποίησης. Επιπλέον, από περιβαλλοντική άποψη, η εξόρυξη λιγνίνης ως παραπροϊόν μειώνει το πρόβλημα της επεξεργασίας των αποβλήτων. Σε ορισμένες περιπτώσεις, είναι δυνατόν να προστεθεί ένας οργανικός ή ανόργανος καταλύτης που όμως μπορεί να προκαλέσει αποικοδόμηση των μονοσακχαριτών προς φουρφουράλη και 5-υδροξυμεθυλοφουρφουράλη (HMF) που αποτελούν ενώσεις παρεμποδιστές τόσο για την ενζυμική υδρόλυση όσο και διεργασίες ζυμώσεων. Τα κύρια μειονεκτήματα της διεργασίας *organosolv* περιλαμβάνουν την ανάγκη ανακύκλωσης των διαλυτών, προκειμένου να μειωθεί το συνολικό κόστος και η παρεμπόδιση των διαλυτών στα στάδια υδρόλυσης και στάδια ζύμωσης, και η ευφλεκτότητα των διαλυτών [13]. Η αιθανόλη προτιμάται ως διαλύτης λόγω του χαμηλού κόστους της, της εύκολης ανάκτησής της και διότι αποτελεί διαλύτη βιολογικής προέλευσης συμβάλλοντας στη βιωσιμότητα της διεργασίας [14]. Επίσης, παράγει χαμηλό ποσοστό από προϊόντα αποικοδόμησης χαμηλής ημικυτταρίνης και προάγει υψηλή ανάκτηση στερεών και προστασία του κλάσματος της κυτταρίνης [13]. Η χρήση THF-νερού ως διαλύτης μπορεί να ενισχύσει σημαντικά την αποικοδόμηση βιομάζας με επιτυχημένη απολιγνοποίηση. Ο διαλύτης είναι ένας διαλύτης "θήτα", δηλαδή συμπεριφέρεται θερμοδυναμικά ιδανικά, επειδή το THF, σε αντίθεση με το νερό, αλληλεπιδρά ευνοϊκά με τη λιγνίνη. Περαιτέρω, το διάλυμα THF: νερό διαχωρίζεται τοπικά όταν αλληλεπιδρά με την κυτταρίνη καθώς το THF επιλύει κατά προτίμηση τις υδρόφοβες επιφάνειες της κυτταρίνης και το νερό τις υδρόφιλες επιφάνειες.. Σε αντίθεση με την κυτταρίνη και την λιγνίνη, η διαλυτοποίηση της ημικυτταρίνης εξαρτάται έντονα από τη θερμοκρασία. Η ημικυτταρίνη διαλύεται τόσο από το THF όσο και από το νερό σε θερμοκρασίες προκατεργασίας, οι οποίες ελαχιστοποιούν την ταχύτητα υδρόλυσης ημικυτταρίνης σε σύγκριση με ένα περιβάλλον μόνο από νερό. Το νερό και το THF αναμιγνύονται σε υψηλές και χαμηλές θερμοκρασίες, αλλά διαχωρίζονται σε φάσεις σε ενδιάμεσες θερμοκρασίες (~ 60-145 ° C) [15]. Απαραίτητο στάδιο αποτελεί η απομάκρυνση των διαλυτών με μεθόδους διαχωρισμού όπως εξάτμιση και συμπύκνωση, ώστε να ανακυκλώνονται οι διαλύτες και να μειωθεί το λειτουργικό κόστος αλλά και να προστατεύονται οι μικροοργανισμοί της ζύμωσης [11]. Συγκεκριμένα η αιθανόλη προτιμάται λόγω του χαμηλού κόστους της, της εύκολης ανάκτησής της και διότι αποτελεί διαλύτη βιολογικής προέλευσης συμβάλλοντας στη βιωσιμότητα της διεργασίας [14]. Η μέθοδος της οξειδωτικής προκατεργασίας πραγματοποιείται συνήθως με τη χρήση οξειδωτικών παραγόντων όπως το υπεροξείδιο του υδρογόνου, το όζον, το οξυγόνο ή ο αέρας. Κατά τη διάρκεια της οξειδωτικής προκατεργασίας λαμβάνει χώρα ένας αριθμός χημικών αντιδράσεων όπως ηλεκτρονιόφιλη υποκατάσταση, μετατόπιση πλευρικών αλυσίδων και οξειδωτική διάρρηξη των αιθερικών δεσμών του αρωματικού δακτυλίου. Αποτέλεσμα της μεθόδου είναι η απολιγνινοποίηση της λιγνινοκυτταρινούχου βιομάζας καθώς και η απομάκρυνση της ημικυτταρίνης [16]. Μεταξύ των κύριων πλεονεκτημάτων αυτής της μεθόδου είναι οι μέτριες συνθήκες αντίδρασης (όπως η θερμοκρασία δωματίου και η ατμοσφαιρική πίεση), η μικρή παραγωγή τοξικών υπολειμμάτων και ενώσεων-παρεμποδιστών και η χαμηλότερη περιβαλλοντική ρύπανση. Σημαντικό μειονέκτημα είναι το υψηλό κόστος του απαιτούμενου οξυγόνου [17] . Οι φυσικοχημικές μέθοδοι προκύπτουν από ένα συνδυασμό των φυσικών και χημικών μεθόδων προκατεργασίας. Οι βιολογικές μέθοδοι προκατεργασίας έχουν κυρίως συσχετισθεί με τη δράση μυκήτων οι οποίοι είναι ικανοί να παράγουν ένζυμα που μπορούν να αποδομούν τη λιγνίνη, την ημικυτταρίνη και τις πολυφαινόλες. Θεωρούνται ως μια αποτελεσματική, οικονομική και φιλική προς το περιβάλλον εναλλακτική διεργασία [18].

Ενζυμική υδρόλυση της λιγνοκυτταρινούχας βιομάζα

Σκοπός της ενζυμικης υδρόλυσης είναι η απελευθέρωση γλυκόζης. Η κυτταρίνη είναι ο κύριος πολυσακχαρίτης που απομένει μετά από τις περισσότερες προκατεργασίες. Τρία είδη ενζύμων δρουν συνεργιστικά για την υδρόλυση της κυτταρίνης: οι ενδο-β-1,4-γλουκανάσες (*endoglucanases*-EG, EC 3.1.2.4) προσβάλλουν εσωτερικά τις άμορφες περιοχές της αλυσίδας της κυτταρίνης παράγοντας κατ’ αυτόν τον τρόπο περισσότερα ελεύθερα άκρα αλυσίδων τα οποία ονομάζονται δεξτρίνες (μίγματα ολιγοσακχαριτών αποτελούμενων από επαναλαμβανόμενες μονάδες D-γλυκόζης) για να δράσουν οι κελλοβιοϋδρολάσες ή εξωγλουκανάσες (*cellobiohydrolases*- CBH, EC 3.2.1.91), απελευθερώνοντας κελλοβιόζη, η οποία τελικά υδρολύεται μαζί με άλλους μικρού μήκους κελλοολιγοσακχαρίτες (έως κελλοεξαόζη) σε δύο μόρια γλυκόζης από τις β- γλυκοζιδάσες (β-*glucosidases*-BGL, EC 3.2.1.21) [19]. Η παραπάνω διαδικασία απεικονίζεται στο σχήμα 1.



Σχήμα 1: Η διαδικασία ενζυμικής υδρόλυσης [19]

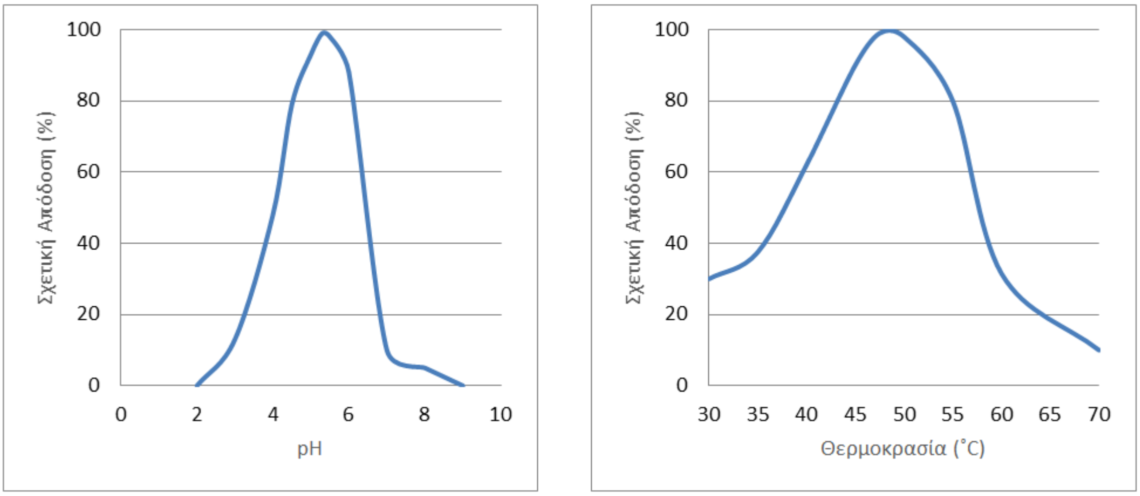
Όπως έχει αναφερθεί στη βιβλιογραφία, η ενζυμική υδρόλυση μπορεί να οδηγήσει σε υψηλά ποσοστά μετατροπής της κυτταρίνης σε γλυκόζη. Για παράδειγμα, σε πολτό από θειώδη υπολείμματα έγινε μελέτη για να υπολογισθεί η μετατροπή κυτταρίνης στις 72 ώρες ενζυμικής υδρόλυσης, για διαφορετικές συγκεντρώσεις κυτταρίνης με 15 FPIU/g κυτταρινάση και 15 pNPGU/g β-γλυκοζιδάση, και τα αποτελέσματα φαίνονται στον παρακάτω πίνακα [1].

Πίνακας 1: Ενδεικτικά αποτελέσματα από τη βιβλιογραφία για 72 ώρες ενζυμικής υδρόλυσης με διαφορετικές συγκεντρώσεις κυτταρίνης [1].

Συγκέντρωση κυτταρίνης (g/L)	Γλυκόζη (g/L)	Μετατροπή της κυτταρίνης (%)
60	45,18 ± 0,43	73,14 ± 0,68
80	58,93 ± 1,08	73,76 ± 1,68
100	66,41 ± 0,60	67,28 ± 1,09

Κυτταρινάσες και Ημικυτταρινάσες

Οι κυτταρινάσες είναι ένζυμα που υδρολύουν δεσμούς -1,4 σε αλυσίδες κυτταρίνης. Τα καταλυτικά μόρια των κυτταρινάσων έχουν ταξινομηθεί σε πολλές οικογένειες με βάση της αλληλουχίες αμινοξέων και κρυσταλλικών δομών. Οι κυτταρινάσες περιέχουν μη καταλυτικές δεσμευτικές ενώσεις υδρογονάνθρακα (CBM) και / ή άλλες λειτουργικά γνωστές ή άγνωστες μονάδες, οι οποίες μπορεί να βρίσκονται στο N- ή O- τελικό άκρο της καταλυτικής μονάδας. Όπως αναφέρθηκε και παραπάνω, η πλήρης υδρόλυση της κυτταρίνης διεκπεραιώνεται από ένα συνδυασμό τριών κύριων τύπων κυτταρινάσων, τις ενδογλουκανάσες, τις κελλοβιοϋδρολάσες και τις β-γλυκοσιδάσες [20]. Οι ημικυτταρινάσες περιλαμβάνουν μια ομάδα ενζύμων που εμπλέκονται στην διάσπαση και στην υδρόλυση των πολυσακχαριτών : γαλακτάνη, ξυλάνη, μαννάνη, και αραβινάνη. Τα κυριότερα ημικυτταρολυτικά ενζυμικά συστατικά αποτελούν η ενδοξυλανάση (EC 3.2.1.8, 1,4-β-d xylan xylanohydrolase), που υδρολύει συνδέσεις d-ξυλανο-πυρανοζυλίου της ξυλάνης για να σχηματίσει ξυλο-ολιγοσακχαρίτες και η D-ξυλοσιδάση (EC 3.2.1.3, xylobiase) που καταλύει την υδρόλυση της ξυλοβιόζης ή ξυλο-ολιγοσακχαρίτες από το μη αναγωγικό άκρο, παράγοντας D-ξυλόζη στο υδρόλυμα [17]. Το ενζυμικό σκεύασμα Cellic® CTec2 της εταιρείας Novozymes, αποτελεί ένα σύμπλεγμα με κύρια δράση κυτταρινάσης και , β-γλυκοζιδάσης, ενώ σε μικρό ποσοστό περιέχονται ένζυμα με δράση ημικυτταρινάσης. Επίσης περιέχει μια επιπλέον ενζυμική ενεργότητα, εκείνη της λυτικής μονοοξυγενάσης των πολυσακχαριτών (lytic polysaccharide monooxygenase, LPMO), η οποία δρα συνεργιστικά με τις κυτταρινάσες προς την αποικοδόμηση της βιομάζας. Το Cellic® CTec2 είναι αποτελεσματικό για βιομάζες που προέρχονται από καλαμπόκι, σακχαροκάλαμο, άμυλο αραβοσίτου, ίνες καλαμποκιού και ξυλοπολτό. Η κατάλληλη ποσότητα στην οποία πρέπει να χρησιμοποιηθεί εξαρτάται από την πρώτη ύλη, την προκατεργασία και τις συνθήκες διεργασίας. Στο σχήμα 2 απεικονίζονται οι βέλτιστες συνθήκες εφαρμογής του ενζυμικού σκευάσματος [21].



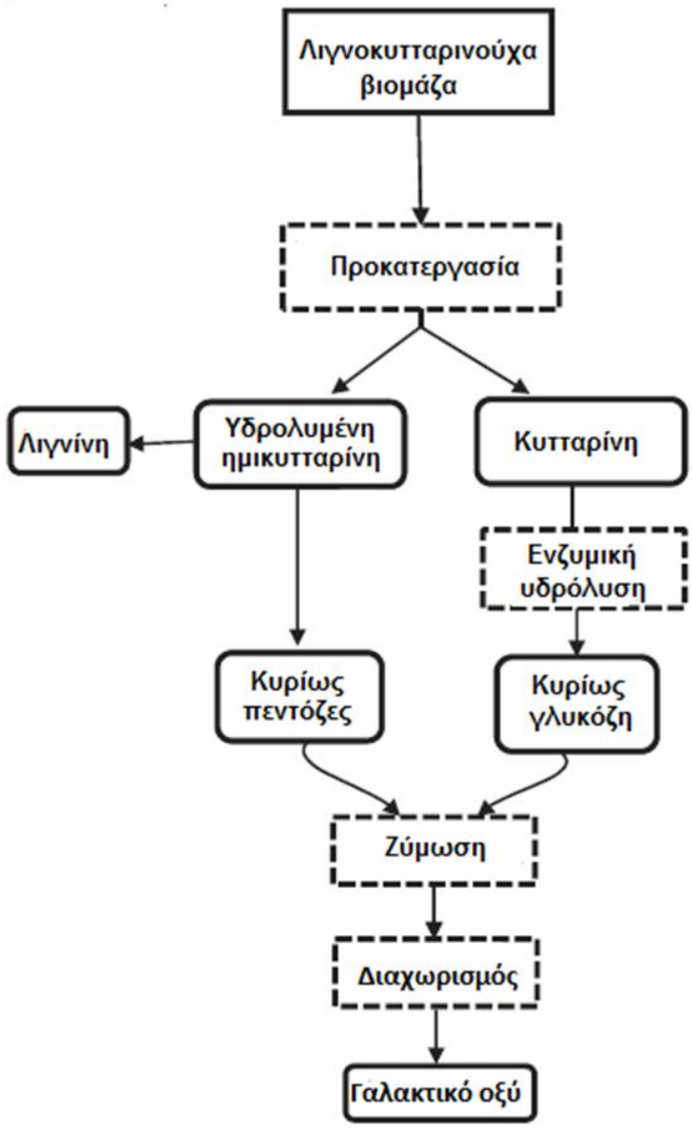
Σχήμα 2: Στο παραπάνω σχήμα απεικονίζονται οι βέλτιστες συνθήκες εφαρμογής του ενζυμικού σκευάσματος Cellic® CTec2 [21]

Τα σκευάσματα ενζύμων διαφέρουν σημαντικά στην ικανότητά τους να μετατρέπουν την κυτταρίνη σε γλυκόζη. Ένα ακόμα διαδεδομένο και ευρέως χρησιμοποιούμενο ενζυμικό σκεύασμα, προηγούμενης γενιάς σε σχέση με το Cellic® CTec2, είναι το Celluclast® της εταιρείας Sigma-Aldrich, το οποίο αποτελεί ένα μίγμα κυτταρινασών και παράγεται από ένα επιλεγμένο στέλεχος του μύκητα *Trichoderma reesei* [22]. Το Cellic® CTec2 και το Celluclast έχουν ξεχωριστές ιδιότητες, που αφορούν όχι μόνο τη δραστηριότητα αλλά και την σταθερότητα και την προσρόφηση στην κυτταρίνη και την λιγνίνη. Το Cellic® CTec2 είναι ένα πιο αποτελεσματικός σκεύασμα,. Το Cellic είναι ένας πιο αποτελεσματικός καταλύτης, αλλά είναι επίσης πιο ευαίσθητος στην απενεργοποίηση από ότι το Celluclast. Η κατανομή της κελλοβιοϋδρολάσης Cel7A και της γλυκοσιδάσης μεταξύ της στερεής και της υγρής φάσης ήταν πολύ διαφορετική ανάλογα με τη σύνθεση. Εκτός από τη θερμοσταθερότητα, ένα εντυπωσιακό χαρακτηριστικό που διαφοροποιεί το Celluclast® και το Cellic® CTec2 όσον αφορά την ανακύκλωση είναι ότι το Celluclast® μπορεί να ανακτηθεί από την υγρή φάση όταν ολοκληρωθεί η μετατροπή της κυτταρίνης, ενώ το Cellic® CTec2 παραμένει προσροφημένο στην λιγνίνη. Επομένως, αν και το Cellic είναι πολύ αποτελεσματικότερο ενζυμικό σκεύασμα, η ανακύκλωσή του είναι αρκετά δύσκολη, αφού φέρει χαμηλότερη θερμοσταθερότητα και υψηλότερη συγγένεια προς την λιγνίνη. Ενώ το Celluclast® μπορεί να ανακυκλωθεί σε μεγάλες ποσότητες μόνο από την υγρή φάση, στην περίπτωση του Cellic® CTec2 είναι υποχρεωτική η εκχύλιση των ενζύμων από τα στερεά κατάλοιπα. Το αποτέλεσμα του πειράματος από το οποίο προέκυψαν τα παραπάνω αποτελέσματα παρουσιάζεται παρακάτω. Σε πείραμα που αναφέρεται στη βιβλιογραφία, μετά από 96 ώρες υδρόλυσης της βιομάζας και 48 ώρες ζύμωσης, όπου χρησιμοποιήθηκε ξηρή βιομάζα 12% (β/ο) με ποσοστό κυτταρίνης 52,82%, ξυλάνη 2,47%, και λιγνίνη 39.03%, με σκοπό να συγκριθεί το Cellic® CTec2 με το Celluclast, με βάση την συγκέντρωση γλυκόζης, κελλοβιόζης και αιθανόλης, προέκυψε ότι με ενζυμικό φορτίο ίσο με 10 FPU / g, το Cellic® CTec2 ήταν σε θέση να υδρολύσει > 98% των γλυκανών, ενώ με τη χρήση Celluclast® , ενισχυμένο με β-γλυκοσιδάση, η μετατροπή έφτασε μέχρι 81% [23].

Γαλακτικό Οξύ

Προέλευση και παραγωγή γαλακτικού οξέος

Το γαλακτικό οξύ (2-υδροξυπροπιονικό οξύ), CH3-CHOH COOH, είναι το ευρύτερα διαδεδομένο υδροξυκαρβοξυλικό οξύ. Απομονώθηκε για πρώτη φορά από ξινόγαλα από τον CW Scheele το 1780 και εμπορικά παράχθηκε το 1881 από το CE Avery στο Λίτλτον, ΗΠΑ. Οι Pasteur, Lister και Delbrueck αναγνώρισαν το γαλακτικό οξύ ως μικροβιακό μεταβολίτη. Το γαλακτικό οξύ είναι ένα φυσικό οργανικό οξύ που παράγεται με χημική σύνθεση ή μικροβιακή ζύμωση [24]. Η εμπορική διαδικασία χημικής σύνθεσης γαλακτικού οξέος βασίζεται στο ακρυλαμίδιο και παράγει μόνο το ρακεμικό μίγμα του D- και L-γαλακτικού οξέος [25]. Η χημική σύνθεση δεν οδήγησε σε τεχνικά και οικονομικά βιώσιμες διαδικασίες [24]. Αντίθετα, η μικροβιακή ζύμωση γαλακτικού οξέος έχει ορισμένα πλεονέκτημα όσον αφορά την αξιοποίηση της ανανεώσιμης υδατανθρακικής βιομάζας· τη χαμηλή θερμοκρασία παραγωγής, τη χαμηλή κατανάλωση ενέργειας και την παραγωγή εμφανώς υψηλής καθαρότητας γαλακτικού οξέος, επιλέγοντας ένα κατάλληλο στέλεχος. Επί του παρόντος, σχεδόν όλο το γαλακτικό οξύ που παράγεται παγκοσμίως παράγεται μέσω ζύμωσης. Συγκεκριμένα, έχουν γίνει πολυάριθμες μελέτες παραγωγής γαλακτικού οξέος από γαλακτικά βακτήρια (lactic acid bacteria, LAB) και βάκιλους σε σύγκριση με άλλους μικροοργανισμούς [26]. Στο σχήμα 3 φαίνεται ένα διάγραμμα ροής της πορείας παραγωγής γαλακτικού οξέος από λιγνοκυτταρινούχα βιομάζα. Για την παραγωγή γαλακτικού οξέος από τη λιγονοκυτταρινούχα βιομάζα, η βιομάζα υπόκειται σε προκατεργασία με μεθόδους που αναφέρθηκαν παραπάνω. Έπειτα, η λιγνίνη αποβάλλεται και η προκατεργασμένη κυτταρίνη και ημικυτταρίνη υποβάλονται σε ενζυμική υδρόλυση προς απελευθέρωση γλυκόζης και πεντοζών, αντίστοιχα. Στην συνέχεια τα υδρολυμένα σάκχαρα χρησιμοποιούνται ως πηγές άνθρακα για μικροοργανισμούς ικανούς να ζυμώσουν γαλακτικό οξύ με γαλακτική ζύμωση που περιγράφεται παρακάτω. Τέλος το γαλακτικό οξύ απομονώνεται με σκοπό να χρησιμοποιηθεί σε μια πληθώρα εφαρμογών.



Σχήμα 3: Διάγραμμα ροής της πορείας παραγωγής γαλακτικού οξέος από λιγνοκυτταρινούχα βιομάζα [26]

Εφαρμογές γαλακτικού οξέος

Το γαλακτικό οξύ λόγω ορισμένων διαφορετικών ιδιοτήτων είναι ένα σημαντικό βιομηχανικό προϊόν που έχει πολυάριθμες εφαρμογές στον κλάδο των τροφίμων, της φαρμακευτικής, των καλλυντικών, της κλωστοϋφαντουργίας, των δερμάτων και της χημικής βιομηχανίας. Στη βιομηχανία καλλυντικών, το γαλακτικό οξύ χρησιμοποιείται στην παρασκευή προϊόντων υγιεινής και αισθητικής λόγω των ενυδατικών, αντιμικροβιακών και αναζωογονητικών επιδράσεων στο δέρμα, καθώς και σε προϊόντα στοματικής υγιεινής. Παράγωγα γαλακτικού οξέος όπως γαλακτικοί εστέρες χρησιμοποιούνται ευρέως λόγω των υγροσκοπικών και γαλακτωματοποιητικών ιδιοτήτων τους. Στη φαρμακευτική βιομηχανία χρησιμοποιείται ως συμπλήρωμα στη σύνθεση δερματολογικών φαρμάκων και κατά της οστεοπόρωσης. Περίπου το 70% του παραγόμενου γαλακτικού οξέος χρησιμοποιείται στη βιομηχανία τροφίμων λόγω του ρόλου του στην παραγωγή γιαουρτιού και τυριού [24, 27]. Υπάρχει αυξημένη ζήτηση γαλακτικού οξέος ως πρώτη ύλη για την παραγωγή βιοπολυμερούς PLA, η οποία είναι μια πολλά υποσχόμενη βιοαποικοδομήσιμη και φιλική προς το περιβάλλον εναλλακτική λύση στα πλαστικά προερχόμενα από πετροχημικά. Το PLA έχει πολλές χρήσεις σε χειρουργικά ράμματα, ορθοπεδικά εμφυτεύματα, συστήματα χορήγησης φαρμάκων και καταναλωτικά προϊόντα μίας χρήσης και η χρήση του θα μείωνε σημαντικά τα προβλήματα διαχείρισης αποβλήτων. Οι φυσικές ιδιότητες του PLA εξαρτώνται από την σύνθεση των ισομερών του γαλακτικού οξέος. Τα καθαρά ισομερή, L- και D-γαλακτικό οξύ, είναι πιο πολύτιμα από την ρακεμική μορφή DL επειδή κάθε ισομερές έχει τη δική του ειδική βιομηχανική εφαρμογή. Το L-γαλακτικό οξύ χρησιμοποιείται για τη σύνθεση πολυ-L-γαλακτικού οξέος (poly L-lactic acid, PLLA), ενός ημι-κρυσταλλικού βιοαποικοδομήσιμου και θερμοσταθερού πολυμερούς που έχει δυνητικά μεγάλο μερίδιο αγοράς σε προϊόντα συσκευασίας. Το PLLA έχει υψηλή αντοχή σε εφελκυσμό και μικρή επιμήκυνση με υψηλό μέτρο ελαστικότητας που το καθιστά κατάλληλο για ιατρικά προϊόντα που χρησιμοποιούνται στην ορθοπεδική (π.χ. ράβδοι, σύνδεσμοι κ.λ.π.), καρδιαγγειακές εφαρμογές (π.χ. stents, μοσχεύματα κ.λ.π.), οδοντιατρικές εφαρμογές, εντερικές εφαρμογές και ράμματα. Το D-γαλακτικό οξύ χρησιμοποιείται για την παραγωγή πολυ-D-γαλακτικού οξέος (poly D-lactic acid, PDLA). Αυτά τα καθαρά πολυμερή είναι σχετικά ευαίσθητα στη θερμότητα, ενώ τα στερεο-σύμπλοκα PLLA και PDLA έχουν σημείο τήξης περίπου 50°C υψηλότερο από τα αντίστοιχα καθαρά πολυμερή τους και είναι περισσότερο βιοαποικοδομήσιμα. Η αναλογία των L- και D-γαλακτικών οξέων επηρεάζει τις ιδιότητες και την ικανότητα αποικοδόμησης του PLA [26].

Μικροοργανισμοί που παράγουν γαλακτικό οξύ

Το γαλακτικό οξύ μπορεί να παραχθεί από διάφορους μικροοργανισμούς που ταξινομούνται σε βακτήρια, μύκητες, ζυμομύκητες, κυανοβακτήρια και άλγη. Οι διαφορές τους αφορούν το φάσμα υποστρωμάτων, απόδοση και παραγωγικότητα, τις θρεπτικές απαιτήσεων την καθαρότητα γαλακτικού οξέος που παράγουν. Η χρήση μικτών στελεχών στη ζύμωση μπορεί να προσφέρει χρήσιμους συνδυασμούς μεταβολικών οδών και συνεπώς να αυξήσει την παραγωγή γαλακτικού οξέος. Οι προσεγγίσεις γενετικής μηχανικής έχουν αξιοποιηθεί με μεγάλο τρόπο για τη βελτίωση της απόδοσης γαλακτικού οξέος και της οπτικής καθαρότητας από διάφορους μικροβιακούς παραγωγούς [28]. Παρακάτω αναλύονται μερικά από τα είδη βακτηρίων που παράγουν γαλακτικό οξύ και σχετίζονται με την παρούσα διπλωματική.

Γαλακτικά βακτήρια (Lactic acid bacteria, LAB)

Τα γαλακτικά βακτήρια ορίζονται σύμφωνα με την ικανότητά τους να παράγουν γαλακτικό οξύ ως το κύριο (και μερικές φορές το μοναδικό) προϊόν ζύμωσης σακχάρων [21]. Με βάση τη φύση της ζύμωσης, τα γαλακτικά βακτήρια ταξινομούνται σε ομοζυμωτικά (*homofermentative*) και ετεροζυμωτικά (*heterofermentative*). Τα ομοζυμωτικά γαλακτικά βακτήρια παράγουν ουσιαστικά ένα μόνο προϊόν, δηλ. γαλακτικό οξύ, ενώ τα ετεροζυμωτικά γαλακτικά βακτήρια παράγουν άλλα προϊόντα όπως αιθανόλη, διακετύλιο, φορμικό, ακετοΐνη ή οξικό οξύ και διοξείδιο του άνθρακα, μαζί με γαλακτικό οξύ [24]. Τα ομοζυμωτικά LAB έχουν ιδιαίτερο ενδιαφέρον για την παραγωγή γαλακτικού οξέος σε εμπορική κλίμακα παράγοντας γαλακτικό οξύ από πεντόζες και εξόζες σε απόδοση 1,0 g / g ή 1,67 mol / mol και 1,0 g / g ή 2,0 mol / mol, αντίστοιχα . Από την άλλη πλευρά, τα ετεροζυμωτικά LAB παράγουν υποπροϊόντα εκτός από το γαλακτικό οξύ και ως εκ τούτου η μέγιστη απόδοση γαλακτικού οξέος σε γλυκόζη φθάνει μόλις 0,5 g / g ή 1,0 mol / mol [29]. Τα περισσότερα γαλακτικά βακτήρια έχουν βέλτιστη θερμοκρασία ανάπτυξης μεταξύ 20˚C και 45˚C και έχουν υψηλή αντοχή σε όξινες συνθήκες ($pH < 5$), γεγονός που τους προσδίδει ανταγωνιστικό πλεονέκτημα έναντι άλλων βακτηρίων [27]. Τα γαλακτικά βακτήρια είναι γενικά βακτηρία θετικά κατά Gram. Είναι μη κινητικά και έχουν ράβδους και κοκκία που δεν σχηματίζουν σπόρια. Δεν συνθέτουν πορφυρίνες και κυτοχρώματα γιατί δεν μπορούν να παράγουν τριφωσφορική αδενοσίνη (ATP). Τα γαλακτικά βακτήρια αναπτύσσονται υπό αναερόβιες συνθήκες επειδή δεν χρησιμοποιούν οξυγόνο για την παραγωγή ενέργειας, αλλά είναι επίσης ικανά να αναπτυχθούν και παρουσία οξυγόνου. Παραμένουν προστατευμένα από υποπροϊόντα οξυγόνου (π.χ H_2O_2) λόγω των υπεροξειδάσων που έχουν [25]. Οι περισσότεροι LAB, συμπεριλαμβανομένων των *Lactobacilli*, θεωρούνται ασφαλείς για τη βιομηχανική παραγωγή γαλακτικού οξέος επειδή έχουν μακρά ιστορία παραγωγής βιομηχανικής κλίμακας χωρίς αρνητικές επιπτώσεις για την υγεία, τόσο στους καταναλωτές όσο και στους παραγωγούς [28]. Από την άλλη, η ισχυρή προσαρμογή των γαλακτικών βακτηρίων σε πλούσιο σε θρεπτικά συστατικά περιβάλλον, όπως το γάλα, το κρέας ή τα φρούτα, οδήγησε σε σημαντική μείωση των μεταβολικών τους δυνατοτήτων. Έτσι λοιπόν εξαρτώνται από εξωγενείς πηγές αμινοξέων, προδρόμων νουκλεϊνικών οξέων και βιταμινών, χαρακτηρίζοντάς τους ως απαιτητικούς μικροοργανισμούς. Αυτό είναι ένα σαφές μειονέκτημα για την βιομηχανική χημική παραγωγή, επειδή τα απαιτούμενα θρεπτικά συστατικά είναι δαπανηρά και ο καθαρισμός των προϊόντων από το πλούσιο μέσο ανάπτυξης είναι γενικά δυσκολότερος ακριβότερος [29]. Επιπλέον, η χαμηλή θερμοκρασία για την παραγωγή γαλακτικού οξέος που απαιτείται από τα περισσότερα στελέχη LAB όχι μόνο αυξάνει τους κινδύνους μόλυνσης, αλλά επίσης παρεμποδίζει τη χρήση τους στην ταυτόχρονη σακχαροποίηση και ζύμωση της λιγνοκυτταρινούχας βιομάζας με υδρολυτικά ένζυμα σε υψηλότερες βέλτιστες θερμοκρασίες για την σακχαροποίησης για την κυτταρική ανάπτυξη των στελεχών LAB. Τα θερμοανθεκτικά στελέχη LAB μπορεί να είναι ελπιδοφόροι παραγωγοί γαλακτικού οξέος λόγω της ανοχής τους σε υψηλά επίπεδα θερμοκρασίας και pH που θα ελαχιστοποιούσαν τα προβλήματα μόλυνσης κατά την επεξεργασία [27]. Ένα στέλεχος Pediococcus acidilactici DQ2 έφθασε σε 101,4 g/L γαλακτικό οξύ με 77,20% απόδοση γαλακτικού οξέος χρησιμοποιώντας 30% (β/β) βιομάζα αραβοσίτου [30].

Lactobacillus delbrueckii

Ο *Lactobacillus delbrueckii subsp. bulgaricus* απομονώθηκε για πρώτη φορά από μια καλλιέργεια που χρησιμοποιήθηκε για την παραγωγή ζυμωμένου γαλακτοκομικού προϊόντος που ονομάζεται "kiselo mleko" το 1905 από τον βούλγαρο γιατρό Stamen Grigorov ο οποίος το ονόμασε *Bacillus bulgaricus*.. Από μελέτες που έχουν διεξαχθεί έχει αποδειχθεί ότι η κατανάλωση λακτόζη από τον *L. delbrueckii subsp. bulgaricus* αυξάνει σημαντικά τον ρυθμό ανάπτυξης του σε σχέση με την γλυκόζη [31]. Επίσης, η υψηλή συγκέντρωση προλίνης (α-αμινοξύ) φαίνεται να είναι απαραίτητη καθώς βελτιώνει σημαντικά την ανάπτυξη του μικροοργανισμού, αντικατοπτρίζοντας έναν ρόλο ωσμωτικής προστασίας ή μια διατροφική απαίτηση λόγω της ανεπαρκούς πρόσληψης. Είναι γνωστό ότι κατά τη διάρκεια της ανάπτυξης του μικροοργανισμού παράγονται τοξικά παράγωγα οξυγόνου και τα ένζυμα που απαιτούνται για την εξάλειψή τους φαίνεται να μην είναι συμβατά με τον *L. bulgaricus*. Συνεπώς είναι απαραίτητος ένας αναγωγικός παράγοντας ώστε να παρέχει προστασία έναντι τοξικών προϊόντων, ιδιαίτερα αν οι συνθήκες ανάπτυξης δεν είναι αυστηρά αναερόβιες [31]. Σήμερα μια πού σημαντική εφαρμογή του είδους αυτού είναι η ζύμωση γαλακτικού οξέος και παρακάτω αναφέρονται ορισμένες μελέτες που έχουν διεξαχθεί με σκοπό την βελτιστοποίηση ανάπτυξης και παραγωγικότητας.

- Σε μελέτη που έγινε με το στέλεχος *Lactobacillus delbrueckii* NCIM 2025, εξετάστηκαν 20 συνδυασμοί σε διαφορετικές αναλογίες αμινοξέων, πολυσορβικού 80 (Tween 80), και προκατεργασμένης βιομάζας ως προς την παραγωγή γαλακτικού οξέος. Η βιομάζα ήταν μελάσσα ζακχαροκάλαμου και το υδρόλυμα αποτελούταν από 27.1 % ολικά αναγωγικά σάκχαρά. Στον πίνακα 2 παρουσιάζονται οι τρεις από τους συνδυασμούς με υψηλή παραγωγή γαλακτικού οξέος μετά από 12 ώρες ζύμωσης [32].

Πίνακας 2: Διαφορετικοί συνθήκες για την παραγωγή γαλακτικού οξέος από τον *Lactobacillus delbrueckii* NCIM 2025 σε υπόστρωμα προκατεργασμένης μελάσσης ζαχαροκάλαμου [32].

Συνθήκη	Αμινοξέα (g/L)	Tween 80 (g/L)	Βιομάζα (g/L)	Γαλακτικό οξύ (g/L)
1	40	3	20	45,70
10	20	4	30	47,80
13	40	3	36,81	55,86

- 36,3 g/L γαλακτικού οξέος αποκτήθηκε στην ζύμωση παρτίδας πολτού από τον *L. delbrueckii* και επιτεύχθηκε απόδοση 0,83 g/g βιομάζας [33].
- Σε πείραμα με ζυμώσεις από το στέλεχος *L. delbrueckii ssp. bulgaricus* (ATCC 11842) σε αραιωμένο τυρί από ορό γάλακτος με αρχική συγκέντρωση λακτόζης 36 g/L, προέκυψε ότι, σε στατικές και αναδευόμενες φιάλες, η παραγωγή γαλακτικού οξέος ήταν 6,4 g/L και 3,9 g/L και η απόδοση ως προς λακτόζη 24% και 16%, αντίστοιχα [34].

Βάκιλοι

Η παραγωγή γαλακτικού οξέος έχει επίσης αναφερθεί από ορισμένα είδη *Bacillus*, συμπεριλαμβανομένων *Bacillus coagulans, Bacillus stearothermophilus, Bacillus licheniformis, Bacillus subtilis* και *Bacillus sp*. Σε σύγκριση με τα άλλα γαλακτικά βακτήρια, οι *Bacillus spp*. έχουν πολλές πιθανές βελτιώσεις στη ζύμωση γαλακτικού οξέος, που μπορούν να βοηθήσουν στη μείωση του κόστους ως εξής: (i) *Bacillus ssp*. μπορούν να αναπτυχθούν και να παράγουν γαλακτικό οξύ με τη χρήση μέσου άλατος μετάλλων με λίγες πηγές αζώτου, αντί για ακριβά μέσα. (ii) στελέχη ανθεκτικά σε υψηλά pH όπως *Bacillus sp.* WL-S20, που απομονώθηκε από Meng et al. (2012), παρήγαγε L-γαλακτικό οξύ σε συγκέντρωση 225 g / L και απόδοση 0,993 g / g σε ζύμωση με τροφοδοσία σε παρτίδες σε pH 9,0, γεγονός που θα μείωνε τον κίνδυνο μόλυνσης κατά τη διάρκεια της ζύμωσης. και (iii) *Bacillus ssp*. μπορούν να παράγουν γαλακτικό οξύ σε θερμική ζύμωση (≥50 ° C). Αυτά τα χαρακτηριστικά δίνουν στο είδος *Bacillus spp.* πολλά πλεονεκτήματα έναντι άλλων βακτηρίων. Πρώτον, οι δαπάνες που σχετίζονται με το νερό ψυκτικού μέσου μετά από μέτρια αποστείρωση θα μειωθούν. Επιπλέον, η χρήση του *Bacillus spp.* καθιστά δυνατή την ανοικτή ζύμωση χρησιμοποιώντας μη αποστειρωμένα μέσα σε υψηλότερες θερμοκρασίες απο 40°C. Η ανοικτή ζύμωση έχει αναφερθεί χρησιμοποιώντας στελέχη θερμικής αντοχής *Bacillus*, συμπεριλαμβανομένων των *Bacillus coagulans Bacillus licheniformis* και *Bacillus* στελέχη 36D1 και 2-6. Επιπλέον, τα στελέχη *Bacillus* είναι ικανά να αναπτυχθούν και να ζυμώσουν εξόζες και πεντόζες από λιγνοκυτταρινούχα βιομάζα σε γαλακτικό οξύ [28].

Bacillus coagulans

O *Bacillus coagulans* απομονώθηκε για πρώτη φορά από αλλοιωμένο γάλα και το 1933 αναγνωρίστηκε ως *Lactobacillus sporogenes* από τους Horowitz-Wlassowa και Nowotelnow. Στη συνέχεια, ταξινομήθηκε ως *B. coagulans*. O *B. coagulans* είναι ένα θετικό κατά gram, προαιρετικά αναερόβιο, μη παθογόνο, κινητό, ραβδόμορφο βακτήριο με την ικανότητα παραγωγής σπορίων, που υδρολύει βιοπολυμερή όπως η ζελατίνη, το άμυλο και η καζεΐνη. Επιπλέον, έχει απονιτρωτική ικανότητα, δηλαδή την αναπνευστική αναγωγή των νιτρικών και των νιτρωδών σε N_2O.. Είναι ανθεκτικό στη θερμότητα, η βέλτιστη θερμοκρασία ανάπτυξης για το *B. coagulans* είναι 35°C έως 50°C και το βέλτιστο pH ανάπτυξης είναι 5,5 έως 6,5. Παρόλο που ο *B. coagulans* παράγει οξύ, δεν παράγει αέριο από τη ζύμωση μαλτόζης, ραφινόζης, μαννιτόλης και σακχαρόζης. Επιπλέον, έχουν διεξαχθεί πολλές μελέτες σχετικά με τη μικροβιακή παραγωγή χαμηλού κόστους βιομηχανικά πολύτιμων προϊόντων όπως το γαλακτικό οξύ και τα διάφορα ένζυμα του *B. coagulans* που έχουν χρησιμοποιηθεί στην παραγωγή τροφίμων [35,36]. Σε πολλές ερευνητικές μελέτες, η παραγωγή γαλακτικού οξέος από *B. coagulans* διεξήχθη χρησιμοποιώντας πολτό ζαχαροκάλαμου, νερό σόργου, εκχύλισμα καφέ, άχυρο σίτου, καλαμπόκι, λιγνοκυτταρινικό υδρόλυμα και αλεύρι καλαμποκιού ως υποστρώματα [35]. Παρακάτω παρουσιάζονται κάποια στοιχεία και αποτελέσματα από μελέτες που έχουν πραγματοποιηθεί.

- Το *B. coagulans* 36D1 αναφέρθηκε ότι χρησιμοποιεί τη πεντόζη μέσω της οδού πεντόζης-φωσφορικού άλατος, η οποία μεγιστοποιεί την απόδοση γαλακτικού οξέος έως και 1.0 g / g καταναλώμενου σάκχαρου [28].
- 162,5 g/L βιομάζα αραβοσίτου υδρολύθηκε με κυτταρινάση (20 FPU / g ξηράς μάζας) και προέκυψαν 83,0 g/L ολικά αναγωγικά σάκχαρά. Ένα θερμόφιλο στέλεχος *Bacillus sp.* XZL4 παρήγαγε 81,0 g/L γαλακτικό οξύ από 162,5 g/L βιομάζα αραβοσίτου (83,0 g/L

ολικά αναγωγικά σάκχαρά), προκατεργασμένη με 6,0% HCl,, και η απόδοση ήταν 0,98 g/g συνολικών αναγωγικών σακχάρων [37].

- Σε μελέτη που έγινε με την χρήση του στελέχους *Bacillus coagulans* LA204 αναλύθηκε η επίδραση της θερμοκρασίας στην παραγωγή γαλακτικού οξέος με πηγή άνθρακα 50g/L ξυλόζη ή γλυκόζη και η υψηλότερη απόδοση υπολογίστηκε στους 50˚C (0,89 g/g σακχάρου για γλυκόζη και 0,88 g/g σακχάρου για ξυλόζη) ενώ σε κάθε θερμοκρασία η απόδοση οξικού οξέος ήταν μεγαλύτερη στην περίπτωση της ξυλόζης. Σε ένα άλλο πείραμα με το ίδιο στέλεχος και πηγή άνθρακα 53,4 g/L ξυλόζη ή 50 g/L γλυκόζη προέκυψε ότι η μέση παραγωγικότητα γαλακτικού οξέος είναι 0,96 g/L/h και 0,95 g/L/h και η απόδοση 0,86 g/g σακχάρου και 0,90 g/g σακχάρου αντίστοιχα. Η κατανάλωση των σακχάρων ήταν ταχύτερη μεταξύ 18 και 42 ώρες και η κατανάλωση ήταν 2,02 g/L/h και 1,58 g/L/h αντίστοιχα. Επιπλέον, η παραγωγή οξικού ήταν μεγαλύτερη στην περίπτωση της ξυλόζης (0,05 g/g σακχάρου) και μικρότερη για την γλυκόζη (0,03 g/g σακχάρου). Ένα ακόμα πείραμα που πραγματοποιήθηκε με το ίδιο στέλεχος είναι η ταυτόχρονη σακχαροποίηση και ζύμωση διαφόρων τύπων προεπεξεργασμένης και μη λιγνοκυτταρινούχας βιομάζας με την χρήση 10 g/L εκχύλισμα ζύμομυκήτων, 50 FPU/g βιομάζας του ενζυμικού σκευάσματος Cellic® CTec2 και 10% (ο/ο) εμβόλιο του μικροοργανισμού. Η διεργασία πραγματοποιήθηκε στους 50˚C για 72 ώρες, σε μη αποστειρωμένο περιβάλλον και τα αποτελέσματα της απόδοσης γαλακτικού οξέος και οξικού οξέος φαίνονται στον παρακάτω πίνακα [38].

Πίνακας 3: Απόδοση γαλακτικού οξέος και οξικού οξέος μετά από 72 ώρες ταυτόχρονης σακχαροποίησης και ζύμωσης με διαφορετικά είδη προκατεργασμένης (+) και μη (-) λιγνοκυτταρινούχας βιομάζας [38].

Είδος βιομάζας	Απόδοση γαλακτικού οξέος (g/g βιομάζας)	Απόδοση οξικού οξέος (g/g βιομάζας)
Αραβόσιτος -	0,28	0,21
Αραβόσιτος +	0,52	0,17
Μίσχανθος -	0,21	0,15
Μίσχανθος +	0,75	0,08
Άχυρο σίτου -	0,25	0,17
Άχυρο σίτου +	0,46	0,17
Σπάδικας Αραβόσιτου -	0,23	0,19
Σπάδικας Αραβόσιτου +	0,44	0,15
Ρυζιού -	0,22	0,15
Ρυζιού +	0,49	0,13

- Σε μελέτη με το στέλεχος *Bacillus coagulans* CC17 σε υπόστρωμα πολτού από θειώδη υπολοίματα, διαπιστώθηκε ότι το στέλεχος μπορεί να έχει μια οδό αποικοδόμησης της κελλοβιόζης η οποία εξαλείφει την ανάγκη για εξωγενή β-γλυκοσιδάση. Για να μελετηθεί η κατανάλωση σακχάρων και η παραγωγή γαλακτικού οξέος κατά την πορεία του SSF απουσία εξωγενούς β-γλυκοσιδάσης, διεξήχθη SSF χρησιμοποιώντας 60 g/L κυτταρίνη BSP και 10 FPIU κυτταρινάση / g κυτταρίνης. Χωρίς την προσθήκη β-γλυκοσιδάσης, η συγκέντρωση κελλοβιόζης έφθασε σε μέγιστο επίπεδο, περίπου 8 g/L κατά τη διάρκεια των πρώτων 6 ωρών ζύμωσης, και στο υγρό ανιχνεύθηκαν περίπου 3,63 g/L γλυκόζης και 1,70 g/L ξυλόζης. Οι μέγιστοι ρυθμοί κατανάλωσης κελλοβιόζης, γλυκόζης και ξυλόζης ήταν 0,39 g/L/h, 0,55 g/L/h και 0,24 g/L/h μεταξύ 6 h και 12 h της διαδικασίας SSF, αντίστοιχα. Επιπλέον, η περιεκτικότητα σε γλυκόζη διατηρήθηκε σε χαμηλό επίπεδο (<4 g / L) και η ξυλόζη ζυμώθηκε ταχέως σε γαλακτικό οξύ. Με βάση τα αποτελέσματα ζύμωσης γλυκόζης, ξυλόζης και κελλοβιόζης με μεικτά σάκχαρα, υποθέτουμε ότι ο αναμενόμενος ενδοκυτταρικός μεταβολισμός της κελλοβιόζης από το στέλεχος CC17 μπορεί να έχει μειώσει τη συγκέντρωση της εξωκυτταρικής γλυκόζης για να αποφευχθεί η καταβολική καταστολή, επιτρέποντας έτσι τη ζύμωση ξυλόζης [1].

- Σε μελέτη που πραγματοποιήθηκε διαπιστώθηκε ότι το στέλεχος *Bacillus coagulans* MA-13 παράγει κυτταρολυτικά ένζυμα υδρολύοντας τα υποστρώματα καρβοξυμεθυλοκυτταρίνης ή CMC (παράγωγο κυτταρίνης) και διηθητικού χαρτιού (πηγή κυτταρίνης) [36].

Θρεπτικά συστατικά για την ανάπτυξη των βακτηρίων

Για την καλή παραγωγή γαλακτικού οξέος, τα γαλακτικά βακτήρια πρέπει να καλλιεργούνται υπό συνθήκες που εξασφαλίζουν την ανάπτυξη και τη βιωσιμότητα των κυττάρων τους, όπου τα απαραίτητα θρεπτικά συστατικά (άνθρακας, άζωτο, μέταλλα και βιταμίνες) πρέπει να είναι άμεσα διαθέσιμα. Ο άνθρακας μπορεί να υπάρχει στο μέσο καλλιέργειας με τη μορφή σακχάρων, αμινοξέων και οργανικών οξέων. Το άζωτο είναι διαθέσιμο με τη μορφή αμινοξέων, πεπτιδίων και ανόργανων ενώσεων που μπορούν να προστεθούν στο μέσο καλλιέργειας ως πεπτόνη, εκχύλισμα ζύμης, ουρία ή θειικό αμμώνιο. Τα ορυκτά στοιχεία που παρέχονται στο μέσο με τη μορφή αλάτων (MgSO4, MnSO4 και FeSO4) και οι βιταμίνες που υπάρχουν στο εκχύλισμα ζυμομυκήτων είναι βασικά στοιχεία που δρουν ως συμπαράγοντες σε πολλές ενζυμικές αντιδράσεις. Το κόστος των θρεπτικών συστατικών είναι ένα από τα κύρια μειονεκτήματα για την ανταγωνιστική βιοτεχνολογική παραγωγή γαλακτικού οξέος καθώς σε μια οικονομική μελέτη που διεξήχθη για την παραγωγή γαλακτικού οξέος με ζυμωτικά μέσα, διαπιστώθηκε ότι αντιπροσώπευε το 38% του μέσου κόστους [27]. Από αυτή την άποψη, η λιγνοκυτταρινούχα βιομάζα είναι μια πολλά υποσχόμενη πρώτη ύλη για την παραγωγή λιπαρών οξέων, λαμβάνοντας υπόψη τη διαθεσιμότητα, τη βιωσιμότητα και το χαμηλό κόστος σε σύγκριση με τα ραφιναρισμένα σάκχαρα.

Οξύτητα της ζύμωσης

Δεδομένου ότι τα γαλακτικά βακτήρια αναπτύσσονται κατά προτίμηση σε pH μεταξύ 5 και 7, η πτώση του pH που συνδέεται με την παραγωγή γαλακτικού οξέος αναστέλλει τη ζύμωση. Για να ελαχιστοποιηθεί αυτό το φαινόμενο, το pH μπορεί να διατηρηθεί κοντά στην τιμή 6 με προσθήκη ανθρακικού ασβεστίου πριν τη ζύμωση ή κατά την διάρκεια της, έτσι ώστε να αποφεύγεται η πτώση του pH που οφείλεται στην παραγωγή γαλακτικού οξέος. [27].

Μικροβιακή ζύμωση για την παραγωγή γαλακτικού οξέος

Μετά από την προκατεργασία και έπειτα υδρόλυση την λιγνοκυτταρινούχας βιομάζας τα σάκχαρα μπορούν να αξιοποιηθούν για την μικροβιακή ζύμωση με στόχο την παραγωγή γαλακτικού οξέος. Να τονισθεί ότι η λιγνίνη δεν μπορεί να χρησιμοποιηθεί για τη ζύμωση γαλακτικού οξέος, όμως η αποτελεσματική χρήση των σακχάρων που παράγονται από την κυτταρίνη και την ημικυτταρίνη μπορεί να μειώσει το κόστος παραγωγής βιοϋλικών κατά 25%. Οι τεχνολογίες ζύμωσης πρέπει να είναι ανταγωνιστικές σε σχέση με το κόστος της χημικής σύνθεσης για την επικύρωση της χρήσης βιοτεχνολογικών διεργασιών σε βιομηχανική κλίμακα. Οι κύριοι οικονομικοί παράγοντες στη διαδικασία ζύμωσης είναι η υψηλή απόδοση του προϊόντος, η παραγωγικότητα και η συγκέντρωση των σχηματιζόμενων προϊόντων, γεγονός που επηρεάζει έντονα το κόστος ανάκτησης του προϊόντος [26]. Η ζύμωση είναι μια ενεργειακά αποδοτική διαδικασία στην οποία τα οργανικά μόρια παίζουν ρόλο τόσο ως δότες ηλεκτρονίων όσο και ως δέκτες ηλεκτρονίων. Το μόριο που μεταβολίζεται δεν διαθέτει όλη τη δυναμική ενέργεια που εξάγεται από αυτό. Στη διαδικασία ζύμωσης, το υπόστρωμα μεταφέρεται σε ζυμωτήρα, μικρά φιαλίδια ή ανακινούμενες φιάλες, ανάλογα με την κλίμακα του πειράματος και εισάγεται εμβολίου είναι συνήθως 5 με 10% του υγρού όγκου [25]. Στον παρακάτω πίνακα φαίνονται τα είδη διεργασιών ζύμωσης και μερικά από τα πλεονεκτήματα και μειονεκτήματά τους.

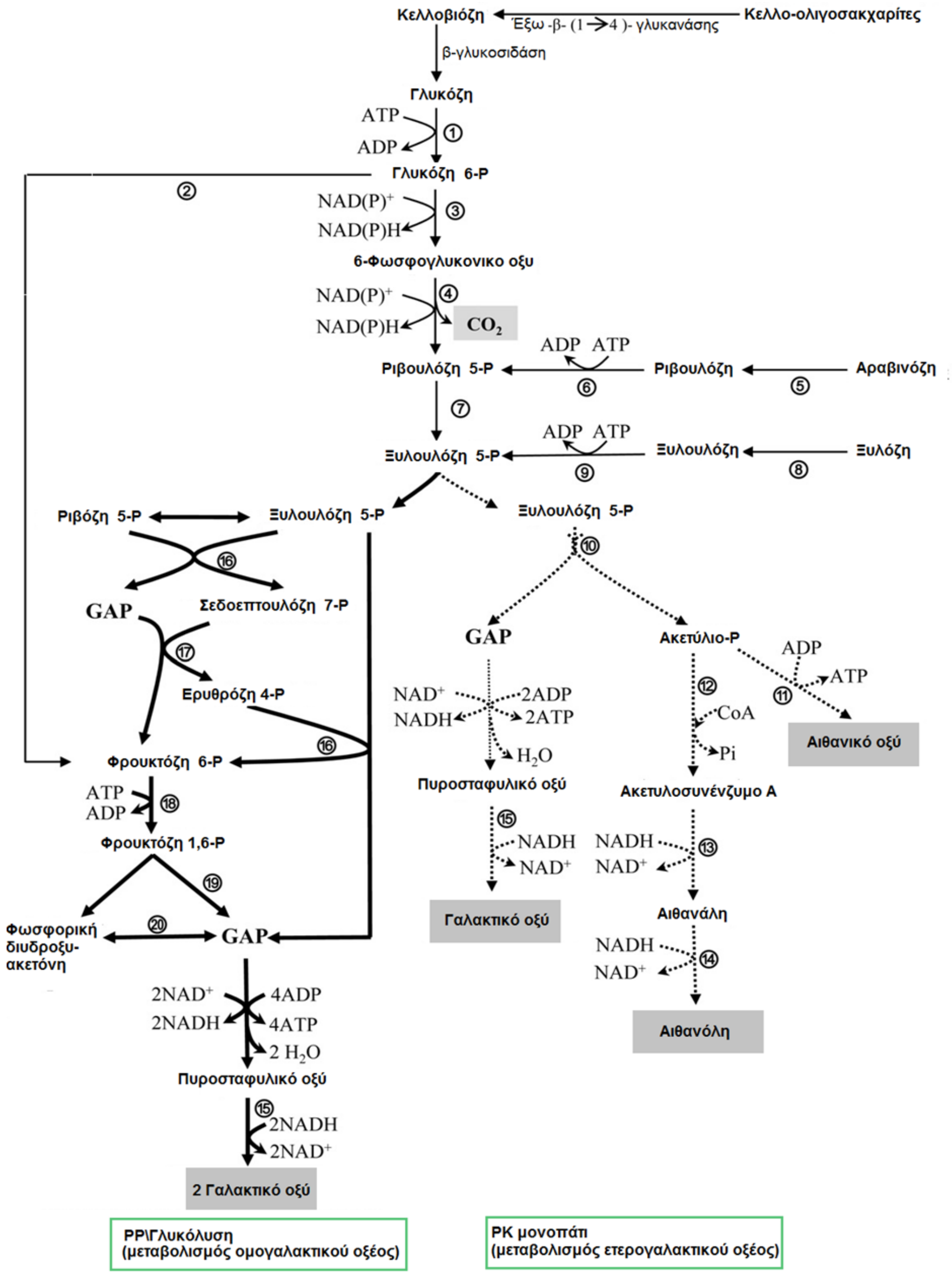
Πίνακας 4: Πλεονεκτήματα και Μειονεκτήματα διεργασιών ζύμωσης [28].

Είδος ζύμωσης	Πλεονεκτήματα	Μειονεκτήματα
Ασυνεχής καλλιέργεια (batch) ή διαλείποντος έργου (Υποστρώματα άνθρακα και συστατικά προστίθενται από την αρχή)	• Απλή λειτουργία • Υψηλή συγκέντρωση προϊόντος • Μειωμένος κίνδυνος μόλυνσης	• Χαμηλή παραγωγικότητα • Αναστολή υποστρώματος ή / και τελικού προϊόντος
Ημιασυνεχής καλλιέργεια (Fed-batch) ή ημιδιαλείποντος έργου (ανατροφοδότηση παρτίδας)	• Αντιμετώπιση προβλήματος αναστολής υποστρώματος • Υψηλή συγκέντρωση προϊόντος	• Αναστολή τελικού προϊόντος • Δύσκολο να διεξαχθεί βέλτιστος σχεδιασμός
Καλλιέργεια επαναλαμβανόμενου ημιδιαλείποντος έργου (repeated fed-batch)	• Διαδικασίες εξοικονόμησης χρόνου • Εξοικονόμηση εργασίας • Παράλειψη του χρόνου παρασκευής των σπόρων • Υψηλά ποσοστά ανάπτυξης • Σύντομη κύρια κουλτούρα	• Απαίτηση ειδικών συσκευών (π.χ. μονάδα κοίλης ίνας) ή ειδικές γραμμές σύνδεσης που χρησιμοποιούνται για συγκέντρωση κυττάρων
Συνεχής ζύμωση (continuous)	• Υψηλή παραγωγικότητα • Έλεγχος των ρυθμών ανάπτυξης • Διαδικασία τερματισμού με λιγότερη συχνότητα	• Ατελής χρήση της πηγής άνθρακα

Από την παραπάνω μεθόδους στο παρόν πείραμα εφαρμόσθηκε η ζύμωση παρτίδας.

Προκειμένου να επιτευχθεί η μέγιστη απόδοση και παραγωγικότητα γαλακτικού οξέος, ένας μεγάλος αριθμός μελετών, στον τομέα της μικροβιακής τεχνολογίας, διερευνά τη ζύμωση σακχάρων από λιγνοκυτταρινούχα βιομάζα, από τα γαλακτικά βακτήρια (LAB) [26].

Στο σχήμα 4 απεικονίζονται οι μεταβολικές οδοί εξόζης και πεντόζης απο LAB. Όταν χρησιμοποιείται ως σάκχαρο η γλυκόζη, καταναλώνεται από τα στελέχη με σκοπό την παραγωγή γαλακτικού οξέος, ενώ παράλληλα παράγονται προϊόντα όπως διοξείδιο του άνθρακα, αιθανόλη και οξικό οξύ [26]. Στον μεταβολισμό των ομοζυμωτικών LAB, η γλυκόζη μετατρέπεται σε πυροσταφυλικό οξύ και αυτό στην συνέχεια ανάγεται σε γαλακτικό οξύ από την αναγωγική ισχύ που παρήχθη με τη μορφή NADH. [27] Η οδός αυτή ονομάζεται Embden-Meyerhof ή οδός γλυκόλυσης και η θεωρητική απόδοση γαλακτικού οξέος προς γλυκόζη είναι 1,0 g / g ή 2,0 mol / mol. Από την άλλη πλευρά, τα ετεροζυμωτικά LAB κατέχουν την οδό της μονοφωσφορικής πεντόζης, όπου η 6-φωσφορική γλυκόζη (6 άνθρακες) αρχικά μετατρέπεται σε 5-φωσφορική ριβουλόζη (5 άνθρακες) και διοξείδιο του άνθρακα (1 άνθρακας) καταλυόμενη από διάφορα ένζυμα. Η προκύπτουσα 5-φωσφορική ριβουλόζη διασπάται σε 1 γραμμομόριο 3-φωσφορικής γλυκεριναλδεΰδη (Glyceraldehyde 3-phosphate, GAP) και ακέτυλο φωσφορικό ανιόν (ακέτυλο-P). Η GAP μεταβολίζεται περαιτέρω σε γαλακτικό οξύ (3 άνθρακες), ενώ το ακέτυλο-P ανάγεται σε αιθανόλη (2 άτομα άνθρακα) μέσω ακέτυλο-CoA και ενδιάμεσων ακεταλδεϋδών ή / και μετατρέπεται σε οξικό μέσω οξικής κινάσης. Συνεπώς, η θεωρητική απόδοση γαλακτικού οξέος προς γλυκόζη φθάνει μόλις 0,5 g / g ή 1,0 mol / mol με ετεροζυμωτικά LAB [26].



Σχήμα 4 : Οδοί για την παραγωγή γαλακτικού οξέος από σάκχαρα που προέρχονται από λιγνοκυτταρινούχα βιομάζα (γλυκόζη, ξυλόζη και αραβινόζη) από γαλακτικά βακτήρια. Ένζυμα: (1) εξοκινάση. (2) ισομεράση της 6-φωσφορική γλυκόζη. (3) αφυδρογονάσης της 6-φωσφορικής γλυκόζης · (4) 6-φωσφογλυκονική αφυδρογονάση, (5) ισομεράση αραβινόζης, (6) ribulokinase, (7) 3-epimerase 5-φωσφορική ριβουλόζη · (8) ισομεράση ξυλόζης, (9) ξυλουλοκινάση. (10) φωσφο-κετολάση, (11) οξική κινάση. (12) phosphotransacetylase · (13) αφυδρογονάση αλδεϋδης, (14) αλκοολική αφυδρογονάση, (15) γαλακτική αφυδρογονάση. (16) τρανσκετολάση; (17) transaldolase · (18) 6-φωσφοφρουκτοκινάση. (19) αλδολάση διφωσφορικής φρουκτόζης και (20) ισομεράση τριοφωσφορικών. Οι συμπαγείς γραμμές υποδεικνύουν το ομοζυμωτικό μονοπάτι. Οι χονδροειδείς γραμμές και οι διακεκομμένες γραμμές δείχνουν το PP / γλυκολυτικό μονοπάτι και την οδό PK, αντίστοιχα. [26]

Διακριτή υδρόλυση και ζύμωση

Η στρατηγική διακριτής υδρόλυσης και ζύμωσης (*separate hydrolysis and fermentation,* SHF), είναι μια διαδικασία με ξεχωριστά στάδια ενζυμικής υδρόλυσης και ζύμωσης. Το κύριο πλεονέκτημα της SHF είναι η ικανότητα να εκτελείται κάθε βήμα υπό βέλτιστες συνθήκες για κάθε διαδικασία, με τα ένζυμα να δρουν σε υψηλότερες θερμοκρασίες που ευνοούν την υδρόλυση της βιομάζας και τους μικροοργανισμούς σε χαμηλότερες που ευνοούν τη ζύμωση προς γαλακτικό οξύ. Το κυριότερο μειονέκτημα αυτής της μεθόδου είναι η παρεμπόδιση ανατροφοδότησης υδρολυμένων σακχάρων, π.χ. γλυκόζης, ξυλόζης, κελλοβιόζης και άλλων ολιγοσακχαριτών, στη δραστηριότητα του ενζύμου κατά τη διάρκεια της διαδικασίας υδρόλυσης, η οποία απαιτεί χαμηλότερα φορτία της λιγνοκυτταρινούχας βιομάζας και υψηλότερα φορτία των ενζύμων για την επίτευξη λογικών αποδόσεων. Επιπλέον, η μέθοδος συνδέεται με υψηλότερα πάγια κόστη λόγω της ανάγκης σε εξοπλισμό για τις διακριτές διεργασίες. Δεν θα πρέπει να παραληφθεί και το γεγονός ότι λόγω της υψηλής αρχικής συγκέντρωσης σακχάρων στην αρχή της ζύμωσης μπορεί να εμφανιστούν φαινόμενα παρεμπόδισής της [26].

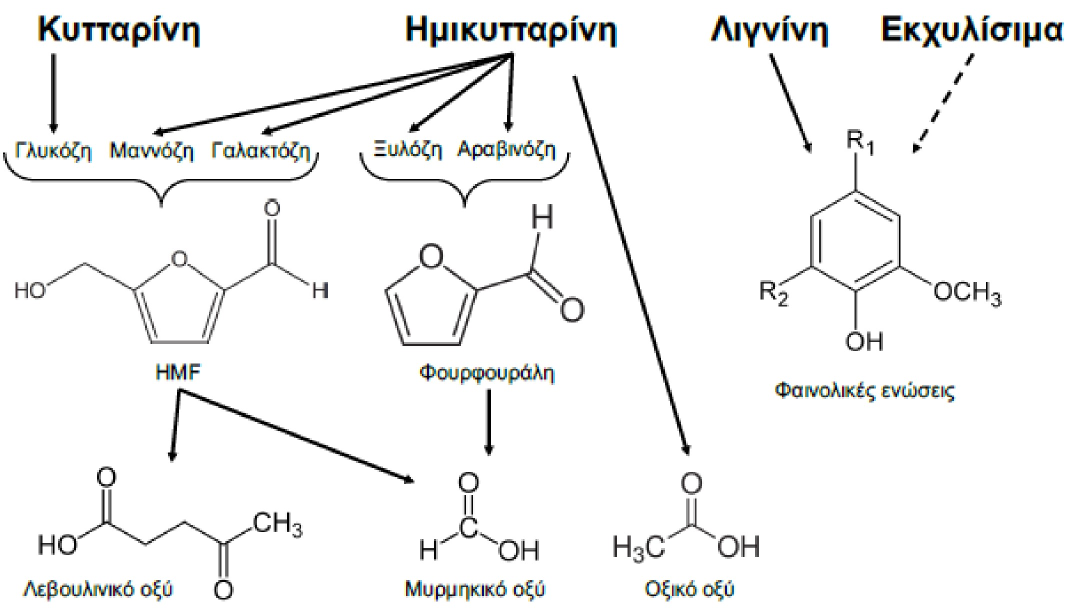
Ταυτόχρονη σακχαροποίηση και ζύμωση

Για να ξεπεραστούν αυτά τα προβλήματα, αναπτύχθηκε η ταυτόχρονη σακχαροποίηση και ζύμωση (*simultaneous saccharification and fermentation*, SSF) για την παραγωγή γαλακτικού οξέος από LAB. Σε σύγκριση με τη SHF, η SSF προσφέρει πολλά πλεονεκτήματα, όπως: (1) μειωμένο όγκο λόγω της χρήσης μόνο ενός αντιδραστήρα, (2) χρόνο ταχείας επεξεργασίας, (3) μειωμένη παρεμπόδιση ανατροφοδότησης. (4) αυξημένη παραγωγικότητα, (5) αυξημένο ρυθμό υδρόλυσης, (6) χαμηλότερη ενζυμικό φορτίο και (7) υψηλότερες αποδόσεις γαλακτικού οξέος. Όπως περιγράφηκε παραπάνω, ένα από τα πλεονεκτήματα της SSF είναι ότι η άμεση κατανάλωση σακχάρων από μικροοργανισμούς διατηρεί τη συγκέντρωση σακχάρων σε χαμηλό επίπεδο στον βιοαντιδραστήρα, μειώνοντας έτσι σημαντικά την παρεμπόδιση της ανατροφοδότησης. Επιπλέον, σε αυτές τις διεργασίες χρησιμοποιούνται μικροοργανισμοί οι οποίοι αδυνατούν να ζυμώσουν τη ξυλόζη, το κύριο προϊόν υδρόλυσης της ημικυτταρίνης. Για την εξυπηρέτηση αυτού του σκοπού έχουν δημιουργηθεί γενετικώς τροποποιημένα στελέχη μικροοργανισμών τα οποία μπορούν να εκμεταλλευτούν μαζί με τις εξόζες και τις πεντόζες. Η διεργασία SSF όταν περιλαμβάνει τη χρήση ενός τέτοιου μικροοργανισμού καλείται ταυτόχρονη σακχαροποίηση και συν-ζύμωση (*simultaneous saccharification and co-fermentation*, SSCF). Τα μειονεκτήματα της SSF είναι ότι η υδρόλυση και τη ζύμωση πραγματοποιούνται στις ίδιες συνθήκες θερμοκρασίας και pH, ενώ η μια αποτελεσματική υδρόλυση απαιτεί υψηλές θερμοκρασίες που λόγω της ύπαρξης μικροοργανισμών είναι ανέφικτο. Ένα επίσης μειονέκτημα της SSF η παρεμπόδιση της λειτουργίας των ενζύμων λόγω της συσσώρευσης γαλακτικού οξέος. Για την αποτελεσματικότερη απόδοση του SSF, προτιμάται η επιλογή τα θερμοανθεκτικών LAB για να αυξήσει τη θερμοκρασία κοντά στη βέλτιστη θερμοκρασία υδρόλυσης. [26] Λόγω αυτού έχει επιτευχθεί υψηλή παραγωγή γαλακτικού οξέος με τεχνολογία SSF με τον *Bacillus coagulans* [26]. Έπειτα από μελέτη που πραγματοποιήθηκε, παρατηρήθηκε ότι πράγματι η συσσώρευση γαλακτικού οξέος κατά την SSF παρεμποδίζει την υδρόλυση όμως πολύ λιγότερο από ότι η συσσώρευση γλυκόζης στην SHF. Για να διερευνηθεί η επίδραση της συγκέντρωσης ενζύμου στο ρυθμό παραγωγής γαλακτικού οξέος διεξήχθηκαν προσομοιώσεις που έδειξαν ότι η παραγωγή γαλακτικού οξέος με SSF μειώνει την απαίτηση για ένζυμα, μειώνοντας έτσι το κόστος. Κατά την SSF προστίθενται στα υποστρώματα ένζυμα μαζί με το εμβόλιο [24].

Πραγματοποιήθηκε μελέτη με σκοπό την σύγκριση παραγωγής γαλακτικού οξέος από την μέθοδο ταυτόχρονης σακχαροποίησης (SSF) και ζύμωσης και την μέθοδο διακριτής σακχαροποίησης και ζύμωσης (SHF) με το στέλεχος *Bacillus coagulans* CC17 σε υπόστρωμα βαγάσσης, με 15 FPU/g κυτταρινάση και 15 pNPGU/g β-γλυκοζιδάση, στους 50˚C και 150 στροφές, χωρίς να προηγηθεί αποστείρωση πριν την εισαγωγή 10% εμβολίου. Τα αποτελέσματα εκτιμήθηκαν μετά από 72 ώρες διεργασίας και η συγκέντρωση γαλακτικού οξέος υπολογίστηκε 32.22 g/L για την SHF και 50.54 g/L για την SSF σε συγκέντρωση κυτταρίνης 60 g/L και ημικυτταρίνης 11.64 g/L [1].

Επίδραση διαφόρων παραγόντων στην γαλακτική ζύμωση και παρεμποδιστές

Οι κυριότεροι παράγοντες οι οποίοι επηρεάζουν την γαλακτική ζύμωση είναι η θερμοκρασία, το pH, η διάρκεια της ζύμωσης, ο ρυθμός ανάδευσης, η αρχική συγκέντρωση σακχάρων και η ποσότητα του εμβολίου. Όπως προαναφέρθηκε, όταν αποικοδομείται η ημικυτταρίνη, απελευθερώνονται ξυλόζη, μαννόζη, οξικό οξύ, γαλακτόζη και γλυκόζη. Σε υψηλή θερμοκρασία και πίεση η ξυλόζη αποικοδομείται περαιτέρω σε φουρφουράλη, όπως αναφέραμε και παραπάνω. Ομοίως, σχηματίζεται HMF από την αποικοδόμηση της εξόζης. Το φορμικό οξύ (μυρμικικό οξύ) σχηματίζεται όταν διασπώνται η φουρφουράλη και η HMF. Το οξο-πεντανικό οξύ (λεβουλινικό οξύ) σχηματίζεται με την αποικοδόμηση της HMF. Οι φαινολικές ενώσεις δημιουργούνται από την μερική διάσπαση της λιγνίνης και έχει επίσης αναφερθεί ότι σχηματίζονται και κατά την αποικοδόμηση [5]. Η παραπάνω περιγραφή φαίνεται στο σχήμα 5.



Σχήμα 5 : Προέλευση των παρεμποδιστών για τις διεργασίες ενζυμικής υδρόλυσης και ζύμωσης της λιγκοκυτταρινούχας βιομάζας [5].

Μηχανισμός δράσης των παρεμποδιστών

Δύο μηχανισμοί έχουν προταθεί για να εξηγήσουν την ανασταλτική δράση των ασθενών οξέων (παρεμποδιστές που αναφέρθηκαν παραπάνω) : απόζευξη και συσσώρευση ενδοκυτταρικού ανιόντος. Σύμφωνα με τη θεωρία απόζευξης, η πτώση του ενδοκυτταρικού pH, που προκύπτει από την εισροή ασθενών οξέων στο κύτταρο διαμέσου διάχυσης πάνω από την κυτταρική μεμβράνη και στη συνέχεια αποσυντίθενται λόγω του ουδέτερου pH της κυτοσόλης, έχει ως αποτέλεσμα τον κυτταρικό θάνατο. Εναλλακτικά, με σκοπό την εξουδετέρωση αντλούνται πρωτονίων μέσω της ATPάσης πλασματικής μεμβράνης, σε βάρος της υδρόλυσης ATP. Για να διατηρηθεί το ενδοκυτταρικό pH, πρέπει να δημιουργηθεί πρόσθετο ATP και αυτό, υπό αναερόβιες συνθήκες, επιτυγχάνεται με αυξημένη παραγωγή αιθανόλης εις βάρος του σχηματισμού βιομάζας. Σε υψηλές συγκεντρώσεις οξέων εξαντλείται η ικανότητα άντλησης πρωτονίων του κυττάρου, με αποτέλεσμα την εξάντληση της περιεκτικότητας σε ATP, την απώλεια της κινητήριας δύναμης των πρωτονίων και την οξίνιση του κυτταροπλάσματος. Εντούτοις, οι ανιονικές μορφές οξικού, προπανικού και φορμικού οξέος είναι λιποφοβικές και δεν διασχίζουν την πλασματική μεμβράνη κατά την ανάπτυξή σε γλυκόζης. Έχει προταθεί επίσης, ότι η τοξικότητα των ασθενών οξέων οφείλεται στη συσσώρευση ενδοκυτταρικού ανιόντος. Σύμφωνα με τη θεωρία αυτή, η ανιονική μορφή του οξέος εισάγεται στο κύτταρο και το αδιάστατο οξύ χρησιμοποιείται στο κύτταρο μέχρι να επιτευχθεί ισορροπία. Δεδομένου ότι η συγκέντρωση ισορροπίας του αδιάστατο οξύ είναι συνάρτηση του pH, η έκταση της συσσώρευσης ενδοκυτταρικού ανιόντος θα είναι συνάρτηση του pH πάνω στην πλασματική μεμβράνη. Η φουρφουράλη έχει αποδειχθεί ότι μειώνει τον ειδικό ρυθμό ανάπτυξης, την απόδοση της κυτταρικής μάζας σε ATP, την ογκομετρική και την ειδική παραγωγικότητα της αιθανόλης. Υπό αναερόβιες συνθήκες, η γλυκερίνη παράγεται κανονικά για την αναγέννηση της περίσσειας αναγωγικού νικοτιναμιδο-αδενινο-δινουκλεοτίδιου, NADH που σχηματίζεται στη βιοσύνθεση. Η παραγωγή γλυκερίνης έχει αποδειχθεί ότι μειώνεται σημαντικά κατά τη διάρκεια αναγωγής της φουρφουράλη, γεγονός που υποδηλώνει την αναγέννηση του οξειδωτικού νικοτιναμιδο-αδενινο-δινουκλεοτίδιου, NAD+. Αποτέλεσμα των παραπάνω αποτελεί η αυξημένη συγκέντρωση ακεταλδεΰδης που εκκρίθηκε λόγω μειωμένης συγκέντρωση NADH στο κύτταρο κατά τη διάρκεια της αναγωγής της φουρφουράλη. Η συσσώρευση ενδοκυτταρικής ακεταλδεΰδης παρουσία φουρφουράλης, θεωρείται ότι είναι ο λόγος για την φάση υστέρησης στην ανάπτυξη. Το HMF μετατρέπεται με χαμηλότερο ρυθμό από ό, τι η φουρφουράλη, προκαλώντας μεγαλύτερη φάση υστέρησης στην ανάπτυξη. Παρόλο που ο ανασταλτικός μηχανισμός δεν έχει διευκρινιστεί, οι φαινολικές ενώσεις φαίνεται να ασκούν σημαντική ανασταλτική δράση στην ζύμωση των λιγνοκυτταρινούχων υδρολυμάτων, ενώ οι φαινολικές ενώσεις χαμηλού μοριακού βάρους είναι τοξικές. Τα ένζυμα, όπως οι λακκάσες και οι υπεροξειδάσες, οξειδώνουν τις φαινόλες σε ρίζες που υφίστανται σύζευξη με μεγαλύτερα μόρια τα οποία είναι λιγότερο τοξικά για τη ζύμωση μικροβίων [5, 39].

Στρατηγικές για την αντιμετώπιση των προβλημάτων παρεμπόδισης

Μπορούν να ληφθούν διάφορα εναλλακτικά μέτρα για την αποφυγή προβλημάτων που προκαλούνται από τις ενώσεις-παρεμποδιστές τόσο στην ενζυμική υδρόλυση, όσο και στις διεργασίες ζυμώσεων. Μία στρατηγική είναι να επιλεγούν λιγότερο ανθεκτικές πρώτες ύλες βιομάζας και να χρησιμοποιηθούν ήπιες συνθήκες προκατεργασίας. Μια ακόμη εναλλακτική είναι να σχεδιαστεί η διαδικασία ζύμωσης ώστε να αποφευχθούν προβλήματα παρεμπόδισης, για παράδειγμα χρησιμοποιώντας SSF για να αποφευχθεί η παρεμπόδιση κυτταρολυτικών ενζύμων από σάκχαρα ή με την εφαρμογή καλλιέργειας ημιδιαλείποντος έργου ή συνεχούς καλλιέργειας παρά με μεθόδους διαλείποντος έργου. Υπάρχει μια ποικιλία διαφορετικών χημικών, βιολογικών και φυσικών μεθόδων που μπορούν να χρησιμοποιηθούν για την αποτοξικοποίηση των υδρολυμάτων. Η χρήση μεγάλης ποσότητας εμβολίου θα ήταν μια λύση εάν ο μικροοργανισμός μπορεί να ανακαλλιεργηθεί και να ξαναχρησιμοποιηθεί με λογικό κόστος. Ωστόσο σε διεργασίες όπως η SSF, οπού ο χρησιμοποιημένος ζωμός περιέχει πολλά στερεά και η απομόνωση του μικροοργανισμού μπορεί να είναι πολύ δύσκολη, η χρήση φρέσκου εμβολίου θεωρείται καλύτερη λύση έναντι της ανακύκλωσης του μικροοργανισμού. Η προσαρμογή του μικροοργανισμού σε ένα ανασταλτικό περιβάλλον, πιθανώς μετά από μεταλλαξιγένεση, αποτελεί εναλλακτική λύση. Όσο αναφορά την χημική αντιμετώπιση απέναντι στους παρεμποδιστές, η κατεργασία με υδροξείδιο του ασβεστίου (overliming) έχει αναδειχθεί ως μία από τις πιο αποτελεσματικές μεθόδους για την εξουδετέρωση των ασθενών οξέων. Παρόλο που οι βιοτεχνολογικές μέθοδοι μελλοντικά έχουν προοπτική, σπάνια συγκρίνονται με τις συμβατικές μεθόδους, όπως η αλκαλική αποτοξίνωση. Μια νέα εξέλιξη της χημικής αποτοξίνωσης είναι η χρήση αναγωγικών παραγόντων, όπως αντιδραστήρια με οξυανιόντα θείου ή θειόλες, στον βιοαντιδραστήρα, μειώνοντας τα προβλήματα παρεμπόδισης της ενζυμικής υδρόλυσης [39]. Επιπλέον, η χρήση αναγωγικών παραγόντων μειώνει επίσης τα προβλήματα με την παρεμπόδισή της ενζυμικής υδρόλυσης. Ο μηχανισμός πίσω από την επεξεργασία με οξυανιόντα θείου ή θειόλες όπως διθειώδες και διθειονίτη αναλύθηκε απο Cavka et al. [40], ο οποίος διαπίστωσε ότι η επίδραση οφειλόταν στη σουλφόνωση των παρεμποδιστών, καθιστώντας τους ανενεργούς και ιδιαίτερα υδρόφιλους. Σουλφόνωση με οξυανιόντα θείου υπόκεινται τα φαινολικά, γεγονός μεγάλης σημασίας καθώς παίζουν μεγάλο ρόλο στην παρεμπόδιση της ενζυμικής σακχαροποίησης της κυτταρίνης [39].

Υλικά & Μέθοδοι

Υλικά

Λιγνοκυτταρινούχος βιομάζα

Στα πειράματα που διεξήχθησαν χρησιμοποιήθηκε ξυλώδης βιομάζα από ξύλο οξιάς με εμπορική ονομασία Lignocel®, προκατεργασμένη με τη μέθοδο ήπιας οργανολυτικής οξείδωσης από το Ινστιτούτο Χημικών Διεργασιών και Ενεργειακών Πόρων (Ι.Δ.Ε.Π.), Εθνικό Κέντρο Έρευνας και Τεχνολογικής Ανάπτυξης (ΕΚΕΤΑ, Θεσσαλονίκη) και τον κ. Κωνσταντίνο Καλογιάννη.

Μικροοργανισμοί

Τα στελέχη των μικροοργανισμών που χρησιμοποιήθηκαν για την γαλακτική ζύμωση είναι :

- *Lactobacillus delbrueckii subsp. Bulgaricus* ATCC® 11842
- *Bacillus coagulans* ATCC® 7050

Ένζυμα

Το ενζυμικό σκεύασμα που χρησιμοποιήθηκε είναι το Cellic® CTec2 (Novozymes, Δανία), με πρωτεϊνική συγκέντρωση 95,6 g/L.

Εργαστηριακές συσκευές

- Θερμαινόμενος επωαστήρας με ανάδευση
- Υδατόλουτρο
- Συσκευή μέτρησης pH, Microprocessor pH Meter WTW
- Σύστημα χρωματογραφίας υψηλής απόδοσης (HPLC) της εταιρείας Shimadzu
- Φυγόκεντρος
- Φωτόμετρο μικροπλακών, Spectra Max 250, Molecular Devices
- Σπεκτροφωτόμετρο, S-20 Spectrophotometer, Boeco Germany

Αναλυτικές τεχνικές

Μέτρηση pH

Οι μετρήσεις πραγματοποιήθηκαν με το όργανο μέτρησης Microprocessor pH Meter WTW. Το pH των υγρών προϊόντων μετρήθηκε τοποθετώντας το ηλεκτρόδιο του πεχάμετρου στη φιάλη με το δείγμα αναδεύοντας έως να σταθεροποιηθεί η ένδειξη στη συσκευή. Κάθε φορά, πριν τη μέτρηση δείγματος, το ηλεκτρόδιο ξεπλένονταν με απιονισμένο νερό.

Υγρή χρωματογραφία υψηλής απόδοσης (HPLC)

Μέθοδος

Για κάθε ουσία που χρειάστηκε να προσδιοριστεί είχε πρώτα προηγηθεί υπολογισμός της καμπύλης αναφοράς σε εύρος ανάλογο με εκείνο της ανίχνευσής της στο ζητούμενο διάλυμα. Οι συγκεντρώσεις σακχάρων και οργανικών οξέων των δειγμάτων προσδιορίστηκαν χρησιμοποιώντας με ένα σύστημα υψηλής απόδοσης υγρής χρωματογραφίας (high performance liquid chromatography, HPLC). Αποτελείται από ένα πλήρες σύστημα διανομης διαλυτών (LC-20AD · Shimadzu, Κιότο, Ιαπωνία), εξοπλισμένο με στήλη Bio-Rad Aminex HPX-87H (300 x 7.8 mm) (Bio-Rad, Hercules, CA, ΗΠΑ), ένα λογισμικό επεξεργασίας δεδομένων (LC διάλυμα Version 1.24 SP1, Shimadzu) και έναν ανιχνευτή δείκτη διάθλασης (Shimadzu RID 10A). Η κινητή φάση αποτελείτο από 3 mM θειικού οξέος (H_2SO_4) σε απαερωμένο υπερκαθαρό νερό με σταθερό ρυθμό ροής 0.6 mL/min, ενώ η θερμοκρασία της στήλης ρυθμίστηκε στους 50 °C.

Διαδικασία μέτρησης

Όλα τα δείγματα πριν την ανάλυσή τους διηθήθηκαν με τη χρήση φίλτρων σύριγγας πορώδους 0.45 μm προκειμένου να απομακρυνθούν τα εναπομείναντα στερεά και τοποθετούνταν σε ειδικά φιαλίδια με βιδωτό καπακι, ειδικά για HPLC. Μετά από κάθε δείγμα η σύριγγα εκπλενόταν με υπερκάθαρο νερό. Τα δείγματα τοποθετούνταν σε ειδικό στατό και εισάγονταν στην διάταξη και μετά το πέρας της διαδικασίας τα αποτελέσματα συλλέγονταν με την μορφή κορυφών.

Προσδιορισμός γλυκόζης με την μέθοδο GOD/PAP

Μέθοδος

Η μέτρηση της συγκέντρωσης γλυκόζης πραγματοποιήθηκε με το εμπορικό σκέυασμα της εταιρείας BIOSIS. Ανιχνεύτηκε με την μέθοδο GOD/PAP (οξειδάση της γλυκόζης/υπεροξειδάση) στη γλυκόζη. Συγκεκριμένα η γλυκόζη αντιδρά με νερό και οξυγόνο παρουσία της οξειδάσης της γλυκόζης και σχηματίζεται γλυκονικό οξύ και υπεροξείδιο του υδρόγονου. Έπειτα, το υπεροξείδιο του υδρογόνου οξειδώνεται από την αμινοφαιζόνη και το φαινολικό παράγωγο παρουσία του ενζύμου υπεροξειδάση σχηματίζοντας προϊόν ροζ-ερυθρού χρώματος. Η απορροφητικότητα του τελικού προϊόντος μετριέται σε φωτόμετρο μικροπλακών σε μήκος κύματος 510 nm και είναι ανάλογη της συγκέντρωσης γλυκόζης στο δείγμα.

Πρότυπη καμπύλη αναφοράς γλυκόζης με το εμπορικό σκεύασμα της BIOSIS

Για κάθε καινούργιο περιέκτη κατασκευαζεται η πρότυπη καμπύλη γλυκόζης του δείγματος προκειμένου να βρεθέι ο συντελεστης της γλυκόζης του σκευάσματος. Παρασκευαζεται πρότυπο διάλυμα γλυκόζης περιεκτικότητας 2% β/ο και από αυτό με αραιώσεις παρασκευάζονται τα παρακάτω διαλύματα γνωστών συγκεντρώσεων 1mL.

- 0,1% β/ο : 50 μL διαλύματος/ 950μL υπερκάθαρο νερό
- 0,2% β/ο : 100 μL διαλύματος/ 900μL υπερκάθαρο νερό
- 0,4% β/ο : 200 μL διαλύματος/ 800μL υπερκάθαρο νερό
- 1,0% β/ο : 500 μL διαλύματος/ 500μL υπερκάθαρο νερό
- 1,4% β/ο : 700 μL διαλύματος/ 300μL υπερκάθαρο νερό

Στην συνέχεια τοποθετούνται σε κάθε θεση της μικροπλάκας 240 mL του σκευάσματος και 10μL από κάθε δείγμα από τα παραπάνω καθώς και “τυφλό” δείγμα που περιείχε υπερκάθαρο νερό αντί για δείγμα. Αυτή η διαδικασία έγινε δύο φορές για κάθε δείγμα, ώστε να ελέγχεται η ακρίβεια και η επαναληψιμότητα των αποτελεσμάτων, και υπολογίστηκε ο μέσος όρος των μετρήσεων. Με τα αποτελέσματα αυτά σχεδιάστηκε η πρότυπη καμπύλη της γλυκόζης και από την εξίσωση της καμπύλης ο συντελεστής της.

Διαδικασία μέτρησης

Εφόσον ήταν αναγκαίες γίνονταν αραιώσεις των δειγμάτων των προς ανάλυση προϊόντων με υπερκάθαρο νερό προκειμένου η μέτρηση να βρίσκεται μέσα στα όρια βαθμονόμησης του οργάνου. Σε κάθε θέση της μικροπλάκας τοποθετούνται 240μl του σκευάσματος και 10μl δείγμα καθώς επίσης και “τυφλό” δείγμα που περιείχε υπερκάθαρο νερό αντί του δείγματος. Αυτή η διαδικασία έγινε δύο φορές για κάθε δείγμα, ώστε να ελέγχεται η ακρίβεια και η επαναληψιμότητα των αποτελεσμάτων, και υπολογίστηκε ο μέσος όρος των μετρήσεων. Το φωτόμετρο που χρησιμοποιήθηκε ήταν το Spectra Max 250 της εταιρίας Molecular Devices. Η πλάκα παρέμενε στη συσκευή να επωαστεί σε θερμοκρασία 37°C για 15 λεπτά. [41]

Η εξίσωση για τον υπολογισμό της συγκέντρωση γλυκόζης (C_{GLU}) σε g/L είναι :

$$C_{GLU} = \left[(Απορρόφηση\ δείγματος) - (Απορρόφηση\ "τυφλου"\ \ δείγματος)\right] \cdot (Συντελεστής\ γλυκόζης)\big] \cdot (αραίωση)$$

Μέτρηση συγκέντρωσης ολικών αναγωγικών σακχάρων (Total Reducing Sugars-TRS)

Μέθοδος

Η μέτρηση των ολικών αναγωγικών σακχάρων πραγματοποιείται με τη μέθοδο Miller 1959 ή αλλιώς Μέθοδος DNS καθώς χρησιμοποιείται ως αντιδραστήριο το 3,5-δινιτροσαλυκιλικό οξύ (DNS). Τα αναγωγικά σάκχαρα έχουν την ιδιότητα να ανάγουν πολλά αντιδραστήρια. Αναγωγικό σάκχαρο ονομάζεται εκείνο το οποίο σε ένα βασικό διάλυμα σχηματίζει μία αλδεΰδη ή μια κετόνη. Η αλδεϋδική ομάδα της γλυκόζης μετατρέπει το 3,5-δινιτροσαλυκιλικό οξύ (DNS) σε 3-άμινο-5-νιτροσαλικιλικό οξύ, που είναι αναγωγική μορφή του DNS. Το νερό χρησιμοποιείται ως αντιδρών και απελευθερώνεται αέριο οξυγόνο κατά την αντίδραση. Ο σχηματισμός του 3-άμινο-5-νιτροσαλικιλικό οξέος προκαλεί αλλαγή στην ποσότητα του φωτός που απορροφάται, σε μήκος κύματος 540nm. Η απορρόφηση μετριέται με σπεκρτοφωτόμετρο και είναι αναλογική με την ποσότητα των αναγωγικών σακχάρων.

Παρασκευή διαλύματος 5-δινιτροσαλυκιλικού οξέος (DNS)

Η παρασκευή του παραπάνω διαλύματος γίνεται με την προσθήκη 500 ml απιονισμένου νερού.σε 200 mL διάλυμα 2N καυστικού νατρίου. Στην συνέχεια προστείθονται 10 g άνυδρου 3,5-δινιτροσαλυκιλικό οξύ (DNS) στο διάλυμα NaOH. Το προκύπτον διάλυμα τίθεται υπό ανάδευση και ελαφρά θέρμανση, μέχρι την πλήρη διάλυση του ,5-δινιτροσαλυκιλικό οξύ (DNS). Ζυγίζονται 300 g άνυδρου τρυγικού καλιονατρίου (αν το αντιδραστήριο είναι ένυδρο υπολογίζεται η ανάλογη ποσότητα). Το τρυγικό καλιονάτριο προστίθεται τμηματικά στο παραπάνω διάλυμα και τίθεται υπό ανάδευση και ελαφρά θέρμανση. Μετά την ολοκλήρωση της προσθήκης του τρυγικού καλιονατρίου και την πλήρη διάλυσή του το τελικό διάλυμα φυλάσσεται σε σκούρου χρώματος μπουκάλι και ο χρόνος ζωής του είναι περίπου 6 μήνες.

Πρότυπη καμπύλη αναφοράς γλυκόζης με το αντιδραστήριο DNS

Για την παρασκευή της καμπύλης αναφοράς γλυκόζης με το διαλυμα DNS παρασκευάστηκαν τα δείγματα γλυκόζης όπως αναφερθηκαν παραπάνω για την πρότυπη καμπύλη της γλυκόζης. Σε δοκιμαστικούς σωλήνες προστίθενται 125μL δείγματος και 125mL από το αντιδραστήριο DNS. Παρασκευάζονταν επίσης "τυφλό" δείγμα όπου χρησιμοποιούνταν υπερκάθαρο νερό και αντιδραστήριο DNS στην ίδια αναλογία. Τα δείγματα έγιναν εις διπλούν. Μετά από ανάδευση τα δείγματα τοποθετούνταν για 5 λεπτά βρασμό σε υδατόλουτρο απιονισμένου νερού. Στη συνέχεια προστίθεται υπερκάθαρο νερό όγκου 1mL στα δείγματα και αναδεύονταν πάλι καλά προς ομογενοποίησή τους. Τέλος τοποθετούνταν σε ειδική κυψελίδα για να μετρηθούν στο σπεκτροφωτόμετρο S-20 Spectrophotometer, Boeco Germany ρυθμισμένο στα 540nm, αφού πρώτα είχε μετρηθεί το "τυφλό" δείγμα και είχε μηδενιστεί η ένδειξη απορρόφησης του οργάνου. Από τα αποτελέσματα παρασκευάζεται η πρότυπη καμπύλη σακχάρων και από την εξίσωση προκύπτει ο συντελεστής.

Διαδικασία μέτρησης

Τα δείγματα υγρών προϊόντων της αντίδρασης αραιώνονταν προκειμένου τα αποτελέσματα της μέτρησης να βρίσκονται εντός των ορίων βαθμονόμησης του οργάνου. Σε δοκιμαστικούς σωλήνες προστίθενται 125μL δείγματος και 125mL από το αντιδραστήριο DNS. Παρασκευάζονταν επίσης "τυφλό" δείγμα όπου χρησιμοποιούνταν υπερκάθαρο νερό και αντιδραστήριο DNS στην ίδια αναλογία. Τα δείγματα έγιναν εις διπλούν. Μετά από ανάδευση τα δείγματα τοποθετούνταν για 5 λεπτά βρασμό σε υδατόλουτρο απιονισμένου νερού. Στη συνέχεια προστίθεται υπερκάθαρο νερό όγκου 1mL στα δείγματα και αναδεύονταν πάλι καλά προς ομογενοποίησή τους. Τέλος τοποθετούνταν σε ειδική κυψελίδα για να μετρηθούν στο σπεκτροφωτόμετρο S-20 Spectrophotometer, Boeco Germany ρυθμισμένο στα 540nm, αφού πρώτα είχε μετρηθεί το "τυφλό" δείγμα και είχε μηδενιστεί η ένδειξη απορρόφησης του οργάνου.

Η εξίσωση για τον υπολογισμό της συγκέντρωση ολικών αναγωγικών σακχάρων (C_{GLU}) σε g/L είναι : $C_{GLU} = [(Απορρόφηση\ δείγματος) \cdot (Συντελεστής\ DNS)] \cdot (αραίωση)$

Μέθοδος φασματοφωτομετρικού προσδιορισμού γαλακτικού οξέος

Μέθοδος

Η μέθοδος φασματοφωτομετρικού προσδιορισμού του γαλακτικού οξέος βασίζεται στην αντίδραση του χλωριούχου σιδήρου (ΙΙΙ) με το γαλακτικό οξύ σε ένα υδατικό διάλυμα πού έχει ως αποτέλεσμα το σχηματισμό κιτρινοπράσινου γαλακτικού σιδήρου (ΙΙΙ) στο διάλυμα. Η απορροφητικότητα του τελικού προϊόντος μετριέται σε φωτόμετρο μικροπλακών σε μήκος κύματος 390 nm και είναι ανάλογη της συγκέντρωσης γαλακτικού οξέος στο δείγμα.

Πρότυπη καμπύλη αναφοράς γαλακτικού οξέος

Για κάθε καινούργιο διάλυμα χλωριούχου σιδήρου παρασκευαζόταν γινόταν καμπύλη γαλακτικού οξέος για να βρεθεί ο συντελεστής γαλακτικού οξέος (Συντελεστής L.A). Η διαδικασία έγινε ακριβώς όπως στην περίπτωση παρασκευής της καμπύλης γλυκόζης αλλά με παρασκευή διαλυμάτων με καθαρό γαλακτικό οξύ. Με τα αποτελέσματα αυτά σχεδιάστηκε η πρότυπη καμπύλη γαλακτικού οξέος και από την εξίσωση της καμπύλης ο συντελεστής L.A.

Διαδικασία μέτρησης

Εφόσον ήταν αναγκαίες γίνονταν αραιώσεις των δειγμάτων των προς ανάλυση προϊόντων με υπερκάθαρο νερό προκειμένου η μέτρηση να βρίσκεται μέσα στα όρια βαθμονόμησης του οργάνου. Σε κάθε θέση της μικροπλάκας τοποθετούνται 200μl ενός διαλύματος χλωριούχου σιδήρου (ΙΙΙ) 0,05% β/ο και 10μl δείγματος γαλακτικού οξέος καθώς επίσης και "τυφλό" δείγμα που περιείχε υπερκάθαρο νερό και διάλυμα χλωριούχου σιδήρου. Αυτή η διαδικασία έγινε δύο φορές για κάθε δείγμα, ώστε να ελέγχεται η ακρίβεια και η επαναληψιμότητα των αποτελεσμάτων, και υπολογίστηκε ο μέσος όρος των μετρήσεων. Το φωτόμετρο που χρησιμοποιήθηκε ήταν το Spectra Max 250 της εταιρίας Molecular Devices.

Η εξίσωση για τον υπολογισμό της συγκέντρωση γαλακτικού οξέος (C_{LA}) σε g/L είναι :

$$C_{LA} = \big[[(Απορρόφηση\ δείγματος) - (Απορρόφηση\ \text{"τυφλου"}\ δείγματος)] \cdot (Συντελεστής\ L.A)\big] \cdot (αραίωση)$$

Μέθοδος υπολογισμού της απορρόφησης σε δείγμα καλλιέργειας

Για τον υπολογισμό της απορρόφησης σε δείγματα καλλιέργειας συλλεγόταν δείγμα 500 μL σε πλαστικά σωληνάρια τύπου Eppendorf των 2mL και πραγματοποιούταν αραίωση επί δέκα (900μL υπερκάθαρο νερο/100μL δείγμα). Σε ένα μέρος του αρχικού δείγματος πραγματοποιείται φυγοκέντρηση, συλλέγεται το υπερκείμενο όπου και σε αυτό γίνεται αραίωση επί δέκα και χρησιμοποιείται ως "τυφλό" δείγμα. Έπειτα σε σπεκτροφωτόμετρο S-20 Spectrophotometer, Boeco Germany ρυθμισμένο στα 600nm μετράται η απορρόφηση, αφού πρώτα είχε μετρηθεί το "τυφλό" δείγμα και είχε μηδενιστεί η ένδειξη απορρόφησης του οργάνου.

Πειραματική Διαδικασία

Ανακαλλιέργειες του *Lactobacillus delbrueckii* ATCC® 11842

Ανά διάστημα ενός μήνα γίνονται ανακαλλιέργειες στα τρυβλία και ανά δέκα μέρες υγρές ανακαλλιέργιειες σε κλειστες φιάλες των 50mL (αναερόβιος μικροοργανισμος).

Το διάλυμα θρεπτικών συστατικων (MRS) του *L. delbrueckii* αποτελείται από τα εξής :

- 1,0% πεπτόνη
- 1,0% εκχύλισμα βοδινού
- 0,5% εκχύλισμα μυκήτων
- 0,5% οξικό νάτριο
- 0,1% πολυσορβικό 80 (γνωστό ως Tween 80)
- 0,2% όξινο φωσφορικό κάλιο (Na_2HPO_4)
- 0,2% κιτρικό τριαμμώνιο
- 0.02% επσομίτης ($MgSO_4 \cdot 7H_2O$)
- 0,005% ένυδρο θειικό μαγγάνιο ($MnSO_4 \cdot H_2O$)

Για τα τρυβλία προσθέτουμε και 1% άγαρ.

Το υπόλοιπο ποσοστο συμπληρώνεται με νερό και φυσικά στο τέλος ρυθμίζεται το pH με κιτρικό οξύ ή καυστικό νάτριο στην τιμή pH 6,5±0,2.

Για της υγρές καλλιέργειες : Παίρνουμε 10% από τις προηγούμενες υγρές καλλιέργειες και το τοποθετούμε σε αποστειρωμένους σωλήνες φυγοκέντρησης και φυγοκεντρούμε για 15 λεπτά. Το υπερκείμενο αποβάλλεται και στο ίζημα, που αποτελεί το εμβόλιο, εισάγονται 50 mL από το φρέσκο θρεπτικό μέσο και ανακινούνται ώστε η αποικία να διασπαρθεί σε όλο το μέσο. Οι φιάλες επωάζονται στους 37˚C για περίπου 48 ώρες, μέχρι ο μικροοργανισμός να αναπτυχθεί επαρκώς και η τιμή της απορρόφηση δείγματος της καλλιέργειας στο σπρεκτροφωτόμετρο να είναι περίπου 0,4. Έπειτα αποθηκεύονται στο ψυγείο σε θερμοκρασία 4˚C.

Για τα τρυβλία : Σε συνθήκες αποστείρωσης, το θρεπτικό μέσο με το άγαρ απλώνεται στα τρυβλία και αφού πέσει η θερμοκρασία του, ποσότητα από τις αποικίες που έχουν αναπτυχθεί στα προηγούμενα τρυβλία, απλώνεται προσεκτικά στο στερεό πλέον άγαρ. Τα τρυβλία επωάζονται στου 37˚C για περίπου 24 ώρες και έπειτα αποθηκεύονται στην ψυγείο σε θερμοκρασία 4˚C.

Ανακαλλιέργειες του *Bacillus coagulans* ATCC® 7050

Ανά διάστημα ενός μήνα γίνονται ανακαλλιέργειες στα τρυβλία και ανά δέκα μέρες υγρές ανακαλλιέργιειες σε κωνικές φιάλες των φιάλες των 250 mL ,με πώματα που επιτρέπουν την πρόσληψη οξυγόνου (αερόβιος μικροοργανισμός).

Το διάλυμα θρεπτικών συστατικων (MRS) του *B. coagulans* αποτελείται από τα εξής :

- 0,5% πεπτόνη
- 0,3% εκχύλισμα βοδινού

Για τα τρυβλία προσθέτουμε και 1,5% άγαρ.

Το υπόλοιπο ποσοστο συμπληρώνεται με νερό και φυσικά στο τέλος ρυθμίζεται το pH με κιτρικό οξύ ή καυστικό νάτριο στην τιμή pH 6,8±0,2.

Για της υγρές καλλιέργειες : Σε συνθήκες αποστείρωσης, σε κωνικές φιάλες των 250 mL εισάγεται ποσότητα 50 mL και συλλέγεται από τα πιο πρόσφατα τριβλία φιάλες με τις προηγούμενες υγρές καλλιέργειες 10% εμβόλιο. Το κενό μέσα στις φιάλες είναι μεγάλο ώστε ο μικροοργανισμός να μπορεί να πάρει περισσότερο οξυγόνο, καθώς σε προηγούμενα πειράματα που οι φιάλες των 250 mL ήταν γεμάτες κατά μεγάλο ποσοστό ο μικροοργανισμός δεν αναπτύχθηκε. Οι φιάλες επωάζονται στους 50˚C για περίπου 24 ώρες σε επωαστήρα με 180 στροφές ανάδευση, μέχρι ο μικροοργανισμός να αναπτυχθεί επαρκώς και η τιμή της απορρόφηση δείγματος της καλλιέργειας στο σπρεκτροφωτόμετρο να είναι περίπου 0,2.

Για τα τρυβλία : Η διαδικασία που ακολουθείται είναι η ίδια με εκείνη για την ανακαλλιέργεια του *L. delbrueckii* με τη διαφορά ότι η επώαση πραγματοποιήθηκε στους 50˚C.

Πειράματα

Στον παρακάτω πίνακα 5 απεικονίζονται οι συνθήκες εφαρμογής των πειραμάτων που θα περιγραφούν στην συνέχεια. Τα πειράματα με βιομάζες (ενζυμικές υδρολύσεις) επωάστηκαν σε 0,1 M ρυθμιστικού διαλύματος κιτρικού-φωσφορικού (pH 5,0). Στην εικόνα 1 φαίνονται τα δείγματα βιομάζας πριν και μετά την εισαγωγή του ρυθμιστικού διαλύματος στις κωνικες φιάλες. Η διεξαγωγή των πειραμάτων πραγματοποιείται σε επωαστήρες με ανάδευση. Πριν από κάθε πείραμα καλλιέργειας προηγούταν αποστείρωση του εργαστηριακού εξοπλισμού που ερχόταν σε επαφή με τους μικροοργανισμούς, όπως και των θρεπτικών μέσων στα οποία είχε γίνει προσθήκη ανθρακικού ασβεστίου ($CaCO_3$) για την διατήρηση του pH κατά την διάρκεια της ζύμωσης. Στα πειράματα με μικροοργανισμούς πραγματοποιήθηκε εμβολιασμός με 10% ο/ο ποσότητα από την πιό πρόσφατη υγρή καλλιέργεια του εκάστοτε στελέχους που επωάζεται. Πριν από κάθε εμβολιασμό μετρούταν η απορρόφηση (OD) ενός δείγματος της καλλιέργειας για να διαπιστωθεί αν είναι επαρκείς η ανάπτυξη του μικροοργανισμού. Επίσης, ανάλογα με τις συνθήκες του πειράματος, σε ορισμένες περιπτώσεις προστέθηκε και ποσότητα του ενζυμικού σκευάσματος Cellic® CTec2. Για τους αερόβιους μικροοργανισμούς (*B. coagulans)* και τις βιομάζες χρησιμοποιήθηκαν κωνικές φιάλες των 50 και 100mL με πώματα που είχαν κενό ώστε να επιτρέπουν την εισαγωγή οξυγόνου αλλά όχι την εξάτμιση του μέσου στο οποίο επωάζονταν. Για τους αναερόβιους (*L. delbrueckii)* τα πειράματα πραγματοποιήθηκαν σε γυάλινες φιάλες αναερόβιας καλλιέργειας (Εικόνα 3).

Παρασκευή ρυθμιστικού διαλύματος κιτρικού-φωσφορικού pH 5

Παρασκευάζονται 250mL διαλύματος 0,2 M όξινου φωσφορικού νάτριου και 250mL διαλύματος 0,1 M κιτρικού οξέος και αναμιγνίονται. Στην συνέχεια προστίθεται 0,02% β/ο αζίδιο του νατρίου. Εξετάζεται αν η τιμή του pH είναι 5 και αν όχι ρυθμίζεται. Το αζίδιο του νατρίου δρα ως βακτηριοστατικό για gram-βακτήρια και προστατεύει το διάλυμα από την δράση μικροοργανισμών.

Οι υπολογισμοί που έγιναν πριν την διεξαγωγή των πειραμάτων είναι οι εξής :

- $Βιομάζα\ (g)\ = (ποσοστό\ ξηρής\ βιομάζας)\%\ β/β\ \cdot (όγκος\ μέσου\ επώασης)(mL)$
- $Ένζυμο\ (mL)\ = \frac{(βιομάζα)\ (g) \cdot (ενζυμικό\ φορτίο)(mg/g\ ξηρής\ μάζας)}{(πρωτεϊνική\ συγκέντρωση)(mg/mL)}$

Πίνακας 5: Συνθήκες διεξαγωγής των πειραμάτων

Πειράματα	Θερμοκρασία Αποστείρωσης (˚C)	Χρόνος αποστείρωσης (min)	θερμοκρασία επωαστήρα (˚C)	Ανάδευση επωαστήρα (rpm)
L. delbrueckii	109	40	45	160
B. coagulans	121	20	50	180
Βιομάζες	-	-	50	160

Πείραμα 1ο

Σε αυτό το πείραμα πραγματοποιήθηκαν υδρολύσεις σε λιγνοκυτταρινούχα βιομάζα με 30 διαφορετικές συνθήκες προκατεργασίας. Η προκατεργασία έγινε στο ΙΔΕΠ/ΕΚΕΤΑ, Θεσσαλονίκης και συνθήκες με τον αριθμό δείγματος παρουσιάζονται σε πίνακα στα παραρτήματα. Με τα αποτελέσματα από το πείραμα της πρώτης συνθήκης επιλέχτηκαν οι 10 βιομάζες με την μεγαλύτερη απόδοση σε παράγωγη σακχάρων και οι υπόλοιπες 4 συνθήκες ενζυμικής υδρόλυσης πραγματοποιήθηκαν στις βιομάζες αυτές.

Συνθήκη 1η : ξηρή βιομάζα 9% β/ο, ενζυμικό φορτίο 9mg/g ξηρής μάζας

Συνθήκη 2η : ξηρή βιομάζα 12% β/ο, ενζυμικό φορτίο 9mg/g ξηρής μάζας

Συνθήκη 3η : ξηρή βιομάζα 15% β/ο, ενζυμικό φορτίο 9mg/g ξηρής μάζας

Συνθήκη 4η : ξηρή βιομάζα 15% β/ο, ενζυμικό φορτίο 15mg/g ξηρής μάζας

Συνθήκη 5η : ξηρή βιομάζα 15% β/ο, ενζυμικό φορτίο 20mg/g ξηρής μάζας

Πείραμα 2ο

Στο πείραμα αυτό πραγματοποιήθηκαν καλλιέργειές με τον *L. delbrueckii* σε όγκο 20mL με υπόστρωμα 9% β/ο ξηρή βιομάζα προερχόμενη από καλαμπόκι, 4,5% β/ο $CaCO_3$ και το θρεπτικό μέσο με τις εξής συνθήκες:

- Διακριτή υδρόλυση και ζύμωση (SHF), με 6 ώρες προυδρόλυση, παρουσία ενζύμου με ενζυμικό φορτίο 20mg/g ξηρής μάζας

- Ταυτόχρονη σακχαροποίηση και ζύμωση (SSF), παρουσία ενζύμου με ενζυμικό φορτίο 20mg/g ξηρής μάζας
- Ταυτόχρονη σακχαροποίηση και ζύμωση (SSF), απουσία ενζύμου

Πείραμα 3ο

Στο πείραμα αυτό πραγματοποιήθηκαν καλλιέργειές με τον *L. delbrueckii* σε δύο συνθήκες, στους 45˚C και 50˚C. Το θρεπτικό μέσο παρασκευάστηκε όπως προαναφέρθηκε με την μόνη διαφοροποίηση ότι προστέθηκε και 6% β/ο γλυκόζη ως πηγή άνθρακα. Σε αυτή την περίπτωση δεν προστίθεται ένζυμο καθώς το πείραμα γίνεται με καθαρή πηγή άνθρακα και όχι με βιομάζα που απαιτεί υδρόλυση.

Πείραμα 4ο

Σε αυτό το πείραμα πραγματοποιήθηκε ταυτόχρονη σακχαροποίηση και ζύμωση (SSF) με τον *L. delbrueckii* στην λιγνοκυτταρινούχα βιομάζα, στις 10 συνθήκες προκατεργασίας που είχαν τα καλύτερα αποτελέσματα όπως προέκυψε από το πείραμα της υδρόλυσης. Η ξηρή βιομάζα είναι 9% β/ο, 4,5% β/ο το CaCO3 και το ενζυμικό φορτίο 9mg/g ξηρής μάζας.

Πείραμα 5ο

Σε αυτό το πείραμα πραγματοποιήθηκε ζύμωση προς γαλακτικό οξύ από τον *L. delbrueckii* με καθαρές πηγές σακχάρων, που προστέθηκαν στο θρεπτικό μέσο, που ήταν οι εξής :

- 3% β/ο μαννόζη
- 6% β/ο μαννόζη
- 3% β/ο γαλακτόζη
- 6% β/ο γαλακτόζη
- 3% β/ο αραβινόζη
- 6% β/ο αραβινόζη

Για κάθε συνθήκη έγινε και προσθήκη της μισής ποσότητας των καθαρών πηγών % β/ο $CaCO_3$ στο θρεπτικό μέσο

Πείραμα 6ο

Σε αυτό το πείραμα πραγματοποιήθηκε ταυτόχρονη σακχαροποίηση και ζύμωση (SSF) με τον *B. coagulans,* στην λιγνοκυτταρινούχα βιομάζα, σε 5 συνθήκες προκατεργασίας. Η ξηρή βιομάζα είναι 9% w/v και 4,5% β/ο το $CaCO_3$ και το πείραμα πραγματοποιήθηκε απουσία ενζύμου.

Πείραμα 7ο

Σε αυτό το πείραμα πραγματοποιήθηκε ζύμωση προς γαλακτικό οξύ από τον *B. coagulans* με καθαρές πηγές σακχάρων, που προστέθηκαν στο θρεπτικό μέσο, που ήταν οι εξής :

- 3% β/ο γλυκόζη
- 6% β/ο γλυκόζη
- 9% β/ο γλυκόζη
- 6% β/ο ξυλόζη

Για κάθε συνθήκη έγινε και προσθήκη της μισής ποσότητας των καθαρών πηγών % β/ο $CaCO_3$ στο θρεπτικό μέσο.

Πείραμα 8ο

Σε αυτό το πείραμα πραγματοποιήθηκε ζύμωση προς γαλακτικό οξύ από τον *B. coagulans* με καθαρές πηγές σακχάρων, που προστέθηκαν στο θρεπτικό μέσο, που ήταν οι εξής :

- 3% β/ο μαννόζη
- 6% β/ο μαννόζη
- 3% β/ο γαλακτόζη
- 6% β/ο γαλακτόζη
- 3% β/ο ξυλόζη
- 1,5% β/ο ξυλόζη παρουσία 6% β/ο γλυκόζη

Για κάθε συνθήκη έγινε και προσθήκη της μισής ποσότητας των καθαρών πηγών % β/ο $CaCO_3$ στο θρεπτικό μέσο

Δειγματοληψία και ανάλυση των αποτελεσμάτων

Στα πειράματα υδρόλυσης της βιομάζας (πείραμα 1) δεν απαιτείται αποστείρωση του εργαστηριακού εξοπλισμού. Συλλέγονταν δύο δείγματα από κάθε φιάλη (4 μετρήσεις για κάθε συνθήκη) στις 8 24 48 και 72 ώρες. Για τα πειράματα καλλιέργειας απαιτείται αποστείρωση του εργαστηριακού εξοπλισμού που ήρθε σε επαφή με το μέσο επώασης του μικροοργανισμού και η συλλογή δειγμάτων πραγματοποιήθηκε σε επαγωγό παρουσία φλόγας για να μειωθούν οι πιθανότητες μόλυνσης. Συλλέγονταν δείγματα ανά 12 ώρες έως ότου κρινόταν ότι ο μικροοργανισμός δεν παράγει πλέον γαλακτικό οξύ και συνεπώς δεν εξελίσσεται το πείραμα. Η δειγματοληψία για κάθε πείραμα πραγματοποιούταν σε πλαστικά σωληνάρια τύπου Eppendorf των 2mL. Η ενζυμική δραστικότητα των δειγμάτων που περιείχαν ένζυμο απενεργοποιούταν μετά από βρασμό για 5 λεπτά. Μετά την δειγματοληψία (και τον βρασμό αν απαιτείται) τα δείγματα φυγοκεντρούνταν και το ίζημα, που ποικίλοι ανάλογα με τις συνθήκες του πειράματος, απορρίπτεται, ενώ το υπερκείμενο συλλέγεται και στην συνέχεια αναλύεται. Στον παρακάτω πίνακα φαίνονται οι μέθοδοι ανάλυσης που χρησιμοποιήθηκαν σε κάθε πείραμα καθώς και οι προσδιοριζόμενες ουσίες.

Πίνακας 6: Οι μέθοδοι ανάλυσης που χρησιμοποιήθηκαν σε κάθε πείραμα καθώς και η προσδιοριζόμενες ουσίες

Αριθμός πειράματος	Μέθοδος ανάλυσης	Προσδιοριζόμενη ουσία (mg/ml)
1	GOD/PAP / TRS	Γλυκόζη / Ολικά αναγωγικά σάκχαρα
2	Φασματοφωτομετρικός προσδιορισμός γαλακτικού οξέος	Γαλακτικό οξύ
3	Φασματοφωτομετρικός προσδιορισμός γαλακτικού οξέος	Γαλακτικό οξύ
4	Φασματοφωτομετρικός προσδιορισμού γαλακτικού οξέος	Γαλακτικό οξύ
5	Φασματοφωτομετρικός προσδιορισμός γαλακτικού οξέος / HPLC	Γαλακτικό οξύ / Μαννόζη / Γαλακτόζη / Αραβινόζη
6	HPLC	Γαλακτικό οξύ
7	HPLC	Γαλακτικό οξύ / Γλυκόζη / Ξυλόζη
8	HPLC	Γαλακτικό οξύ / Μαννόζη / Γαλακτόζη / Ξυλόζη

.

Οι υπολογισμοί που έγιναν μετά την διεξαγωγή των πειραμάτων είναι οι εξής :

- Υπολογισμός μετατροπής της κυτταρίνης (%) : $\frac{C_{glu}*100*100}{C_{biomass}*(\%\ κυτταρίνης)*1{,}111}$

Όπου C_{glu} : συγκέντρωση γλυκόζης που παράχθηκε (g/L) , $C_{biomass}$: συγκέντρωση βιομάζας (g/L) και 1,111 ο συντελεστής μετατροπής της κυτταρίνης σε γλυκόζη

- Υπολογισμός απόδοσης γαλακτικού οξέος (%) :

$$\frac{C_{L.A} * 100 * 100}{(\%κυταρίνης + \%μαννόζης + \%γαλακτόζης) * C_{biomass} * 1{,}111}$$

για ζυμώσεις με βιομάζες στην περίπτωση του *Lactobacillus delbruenkii*, βάση των σακχάρων που φάνηκε να καταναλώνει.

Όπου $C_{L.A}$: συγκέντρωση γαλακτικού οξέος που παράχθηκε (g/L) και %σακχάρων αποτελεί το ποσοστό εμφάνισης στην προκατεργασμένη βιομάζα.

- Υπολογισμός πραγματικής απόδοσης γαλακτικού οξέος (mg/g βιομάζας) : $\frac{C_{L.A}*1000}{C_{biomass}}$

- Υπολογισμός απόδοσης γαλακτικού οξέος επί του θεωρητικά παραγόμενου στην περίπτωση των καθαρών σακχάρων ως πηγή άνθρακα (%) :

$$\frac{Απόδοση\ πραγματικη\ (\frac{mg}{g}βιομάζας)}{Απόδοση\ Θεωρητική\ \left(\frac{mg}{g}βιομάζας\right)}$$

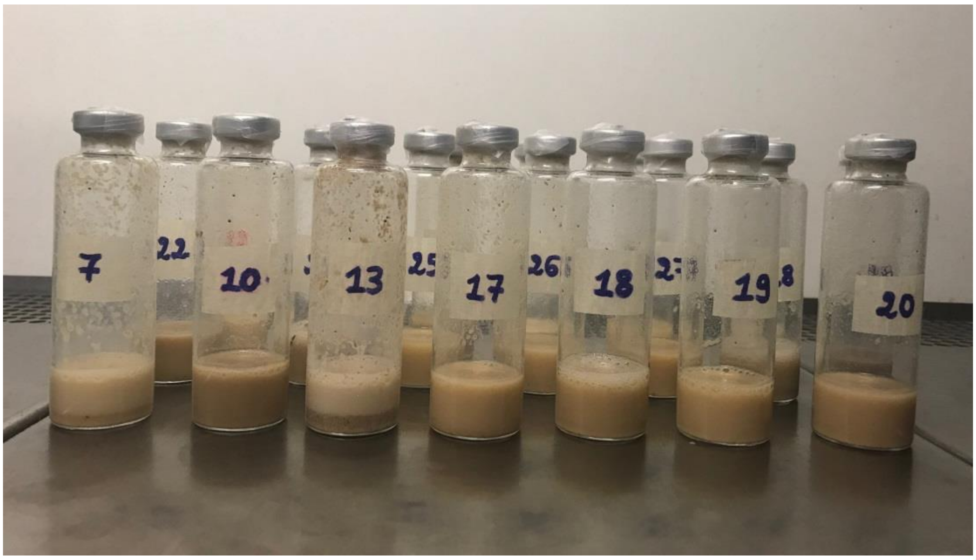
Όπου η πραγματική απόδοση υπολογίστηκε παραπάνω και η θεωρητική ορίζεται ανάλογα με τις προϋποθέσεις του πειράματος.

- Ο υπολογισμός των σφαλμάτων έγινε σύμφωνα με την θεωρία μετάδοσης σφάλματος

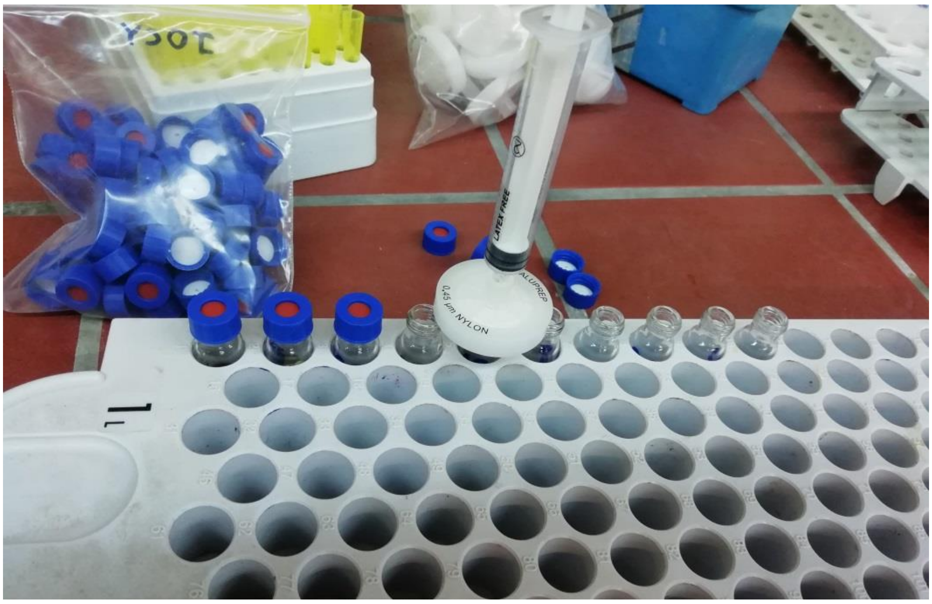
Εικόνες πειράματος

Εικόνα 1: Κωνικές φιάλες πριν την διεξαγωγή του πειράματος ενζυμικής υδρόλυσης. Η μπροστά σειρά αποτελεί τα δείγματα βιομάζας χωρίς το μέσο επώασης.

Εικόνα 2 : Κωνικές φιάλες μετά την διεξαγωγή του πειράματος ενζυμικής υδρόλυσης.



Εικόνα 3: Γυάλινες φιάλες αναερόβιας καλλιέργειας μετά την διεξαγωγή του πειράματος SSF με τον *L. delbrueckii.*



Εικόνα 4: Διαδικασία προετοιμασίας των δειγμάτων για την εισαγωγή στην υγρή χρωματογραφία.

Αποτελέσματα & Συζήτηση

Ενζυμικές υδρολύσεις βιομαζών

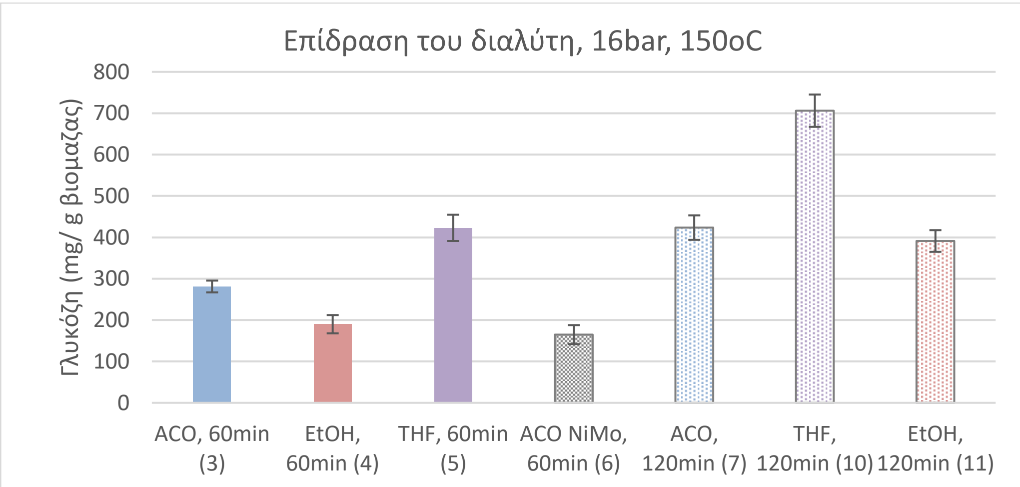
72 ώρες ενζυμική υδρόλυση με 9% ξηρή βιομάζα, ενζυμικό φορτίο 9 mg / g υποστρώματος – Αξιολόγηση των διαφορετικών παραμέτρων της προκατεργασίας

Στο παρακάτω διάγραμμα απεικονίζεται η επίδραση του διαλύτη στην προκατεργασία των βιομαζών σύμφωνα με την παραγωγή γλυκόζης ανά γραμμάριο βιομάζας, μετά από 72 ώρες υδρόλυσης (σε παρένθεση αναφέρεται ο αριθμός του δείγματος βιομάζας). Η προκατεργασία διαφοροποιείται ως προς τις συνθήκες πίεσης και θερμοκρασίας, τον χρόνο προκατεργασίας και ως προς τον διαλύτη.

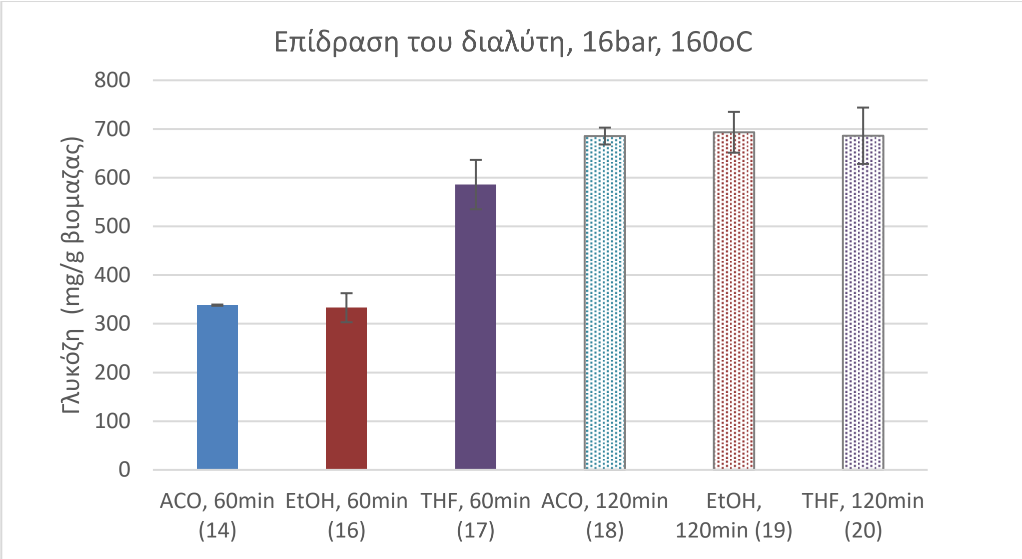
Επίδραση του διαλύτη στην ενζυμική υδρόλυση

Οι διαλύτες που χρησιμοποιούνται είναι:

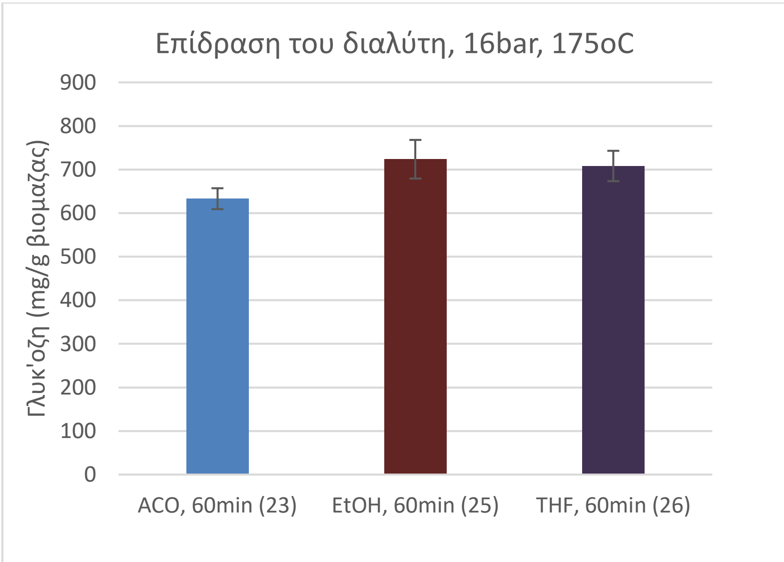
- Τετραϋδροφουράνιο (***TetraHydroFuran*, THF**)
- Αιθανόλη (*Ethanol*, **EtOH**)
- Ακετόνη (***Acetone*, ACO)**



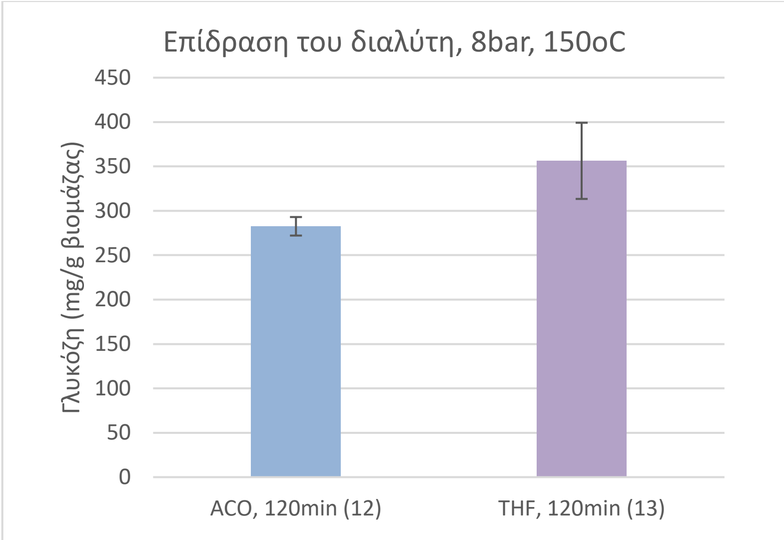
Διάγραμμα 1: Επίδραση του διαλύτη σε πίεση 16 bar και θερμοκρασία 150°C, σύμφωνα με την παραγωγή γλυκόζης μετά από 72 ώρες υδρόλυσης.



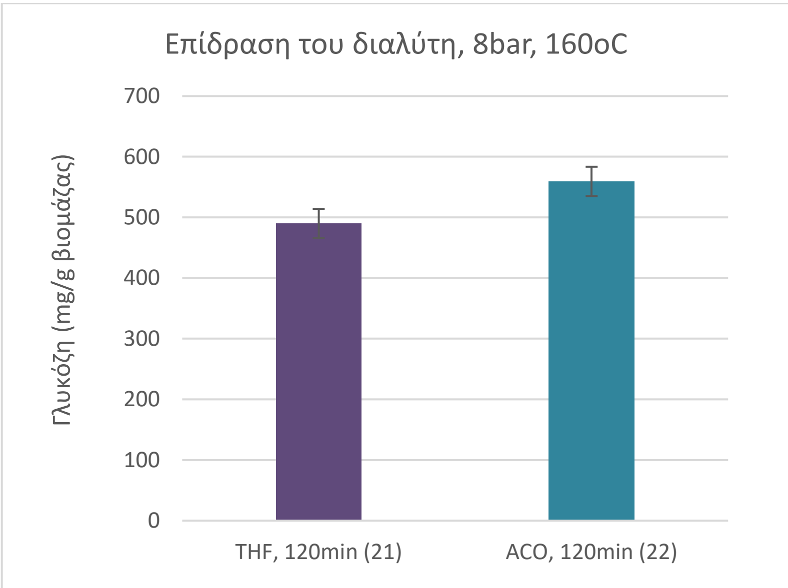
Διάγραμμα 2 : Επίδραση του διαλύτη σε πίεση 16 bar και θερμοκρασία 160°C, σύμφωνα με την παραγωγή γλυκόζης μετά από 72 ώρες υδρόλυσης.



Διάγραμμα 3: Επίδραση του διαλύτη σε πίεση 16 bar και θερμοκρασία 175°C, σύμφωνα με την παραγωγή γλυκόζης μετά από 72 ώρες υδρόλυσης



Διάγραμμα 4: Επίδραση του διαλύτη σε πίεση 8 bar και θερμοκρασία 150°C, σύμφωνα με την παραγωγή γλυκόζης μετά από 72 ώρες υδρόλυσης.



Διάγραμμα 5 : Επίδραση του διαλύτη σε πίεση 8 bar και θερμοκρασία 160°C, σύμφωνα με την παραγωγή γλυκόζης μετά από 72 ώρες υδρόλυσης.

Το τετραϋδροφουράνιο (THF) φαίνεται να ευνοεί την παραγωγή γλυκόζης όταν η προκατεργασία εκτελείται υπό συνθήκες πίεσης 16 bar, θερμοκρασίας 150°C και 160°C, για χρόνο 120min. Ο ίδιος διαλύτης στις ίδιες συνθήκες αλλά σε χρόνο προκατεργασίας 60min ευνοεί λιγότερο την παραγωγή γλυκόζης , ιδίως για τους 150°C, όμως υπερτερεί της ακετόνης (ACO) και της αιθανόλης (EtOH). (Διάγραμμα 1,2)

Η προκατεργασία με ακετόνη έχει καλύτερη απόδοση από αυτήν με αιθανόλη (EtOH) στους 150˚C τόσο για χρόνο επεξεργασίας 60min όσο και για 120min. Αντιθέτως, στους 160°C και για χρόνο προκατεργασίας 60min και για 120min, η απόδοση είναι όμοια και για την προκατεργασία με ακετόνη και για την προκατεργασία με αιθανόλη, ενώ για 175°C και χρόνο 60min η αιθανόλη έχει ελαφρώς καλύτερη απόδοση. (Διάγραμμα 1,2)

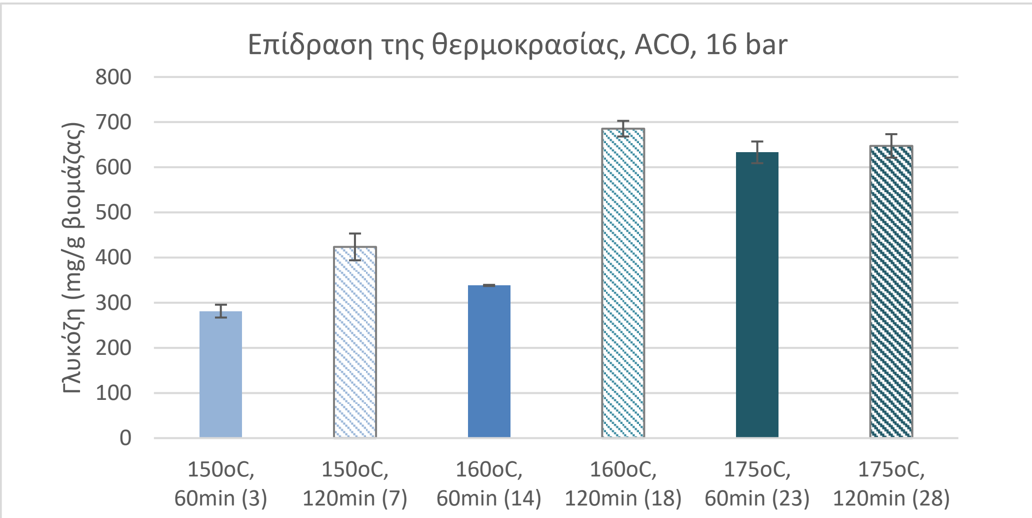
Για 120min προκατεργασίας, πίεση 8 bar, και θερμοκρασία 150ºC και 160ºC, πρακτικά δεν υπάρχει στατιστικά σημαντική διαφορά μεταξύ ακετόνης (ACO), τετραϋδροφουράνιου (THF). (Διάγραμμα 4,5)

Η παρουσία του καταλύτη νικελίου/μολυβδαίνιου (NiMo) δεν φαίνεται να βελτιώνει τη σακχαροποίηση της βιομάζας. (Διάγραμμα 1)

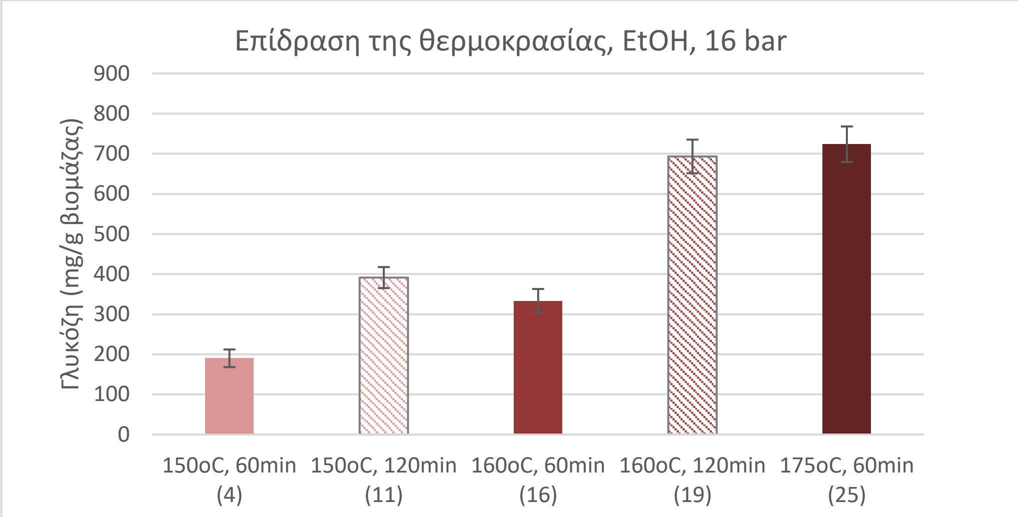
Στους 175°C και πίεση 16bar δεν υπάρχει στατιστικά σημαντική διαφορά μεταξύ των αποδόσεων των τριών διαλυτών. (Διάγραμμα 3)

Επίδραση της θερμοκρασίας στην ενζυμική υδρόλυση

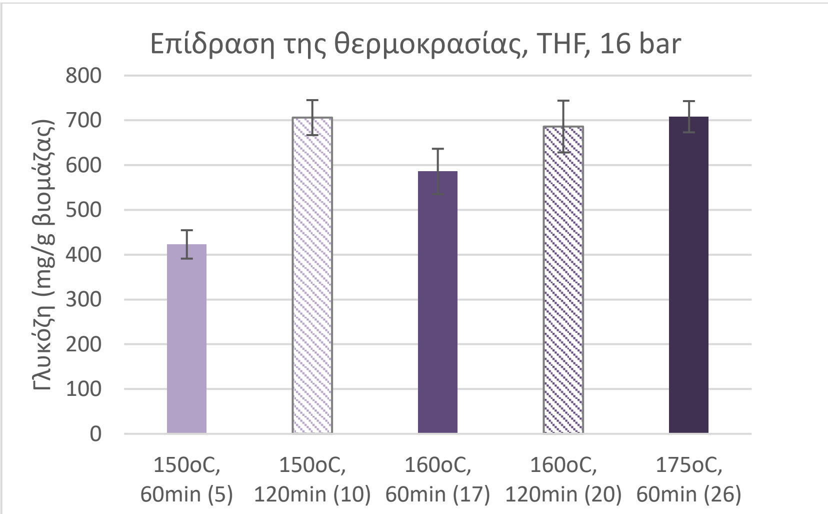
Η προκατεργασία έγινε σε θερμοκρασίες 150°C, 160°C, 175°C



Διάγραμμα 6: Επίδραση της θερμοκρασίας σε πίεση 16 bar και διαλύτη την ακετόνη (ACO) , σύμφωνα με την παραγωγή γλυκόζης μετά από 72 ώρες υδρόλυσης.



Διάγραμμα 7: Επίδραση της θερμοκρασίας σε πίεση 16 bar και διαλύτη την αιθανόλη (EtOH), σύμφωνα με την παραγωγή γλυκόζης μετά από 72 ώρες υδρόλυσης.



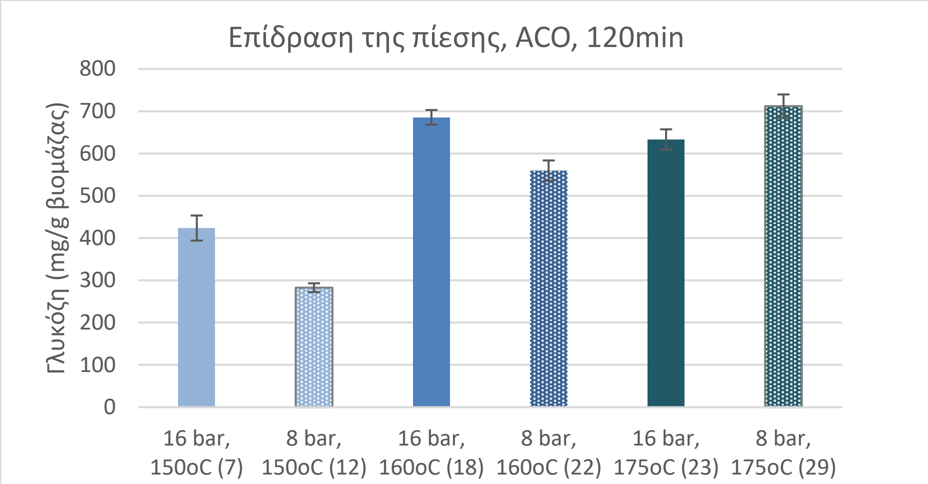
Διάγραμμα 8: Επίδραση της θερμοκρασίας σε πίεση 16 bar και διαλύτη το τετραϋδροφουράνιο (THF) , σύμφωνα με την παραγωγή γλυκόζης μετά από 72 ώρες υδρόλυσης.

Για πίεση 16 bar, σε χρόνο προκατεργασίας 60 min και στις τρεις περιπτώσεις διαλύτη η αύξηση της θερμοκρασίας φαίνεται να ευνοεί την σακχαροποίηση. Συγκεκριμένα, για την περίπτωση της ακετόνης η διαφορά είναι μικρή για αύξηση από 150°C στους 160°C, αλλά στους 175°C παρατηρείται διπλασιασμός στην ποσότητα γλυκόζης που παραρίχθηκε. Για τους άλλους δυο διαλύτες η αύξηση είναι σταδιακή.

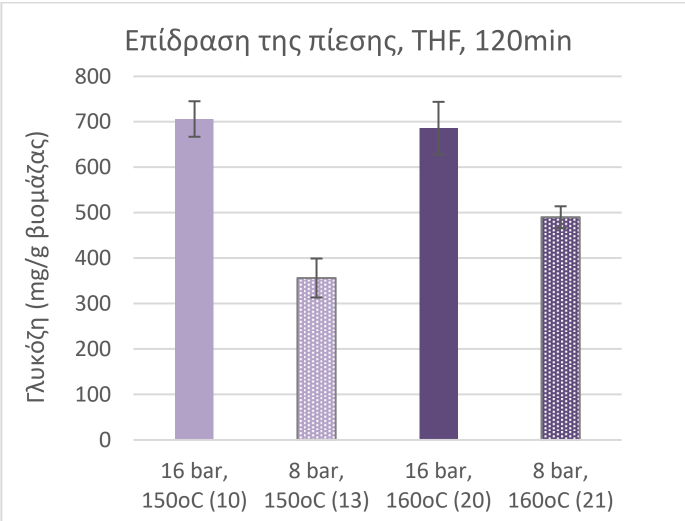
Στα 120 λεπτά, η αύξηση της θερμοκρασίας από τους 150°C στους 160°C δεν βελτιώνει περαιτέρω την απόδοση στην περίπτωση του τετραϋδροφουράνιου, ενώ για την αιθανόλη και την ακετόνη , η αύξηση από 150°C σε 160°C αυξάνει σημαντικά την απελευθέρωση της γλυκόζης. Παρόμοια τάση δεν παρατηρείται όταν η θερμοκρασία αυξάνεται στους 175°C.

Επίδραση της πίεσης στην ενζυμική υδρόλυση

Η προκατεργασίας έγινε σε πίεση 8bar και 16bar.



Διάγραμμα 9: Επίδραση της πίεσης για χρόνο 120 min και διαλύτη την ακετόνη (ACO), σύμφωνα με την παραγωγή γλυκόζης μετά από 72 ώρες υδρόλυσης.



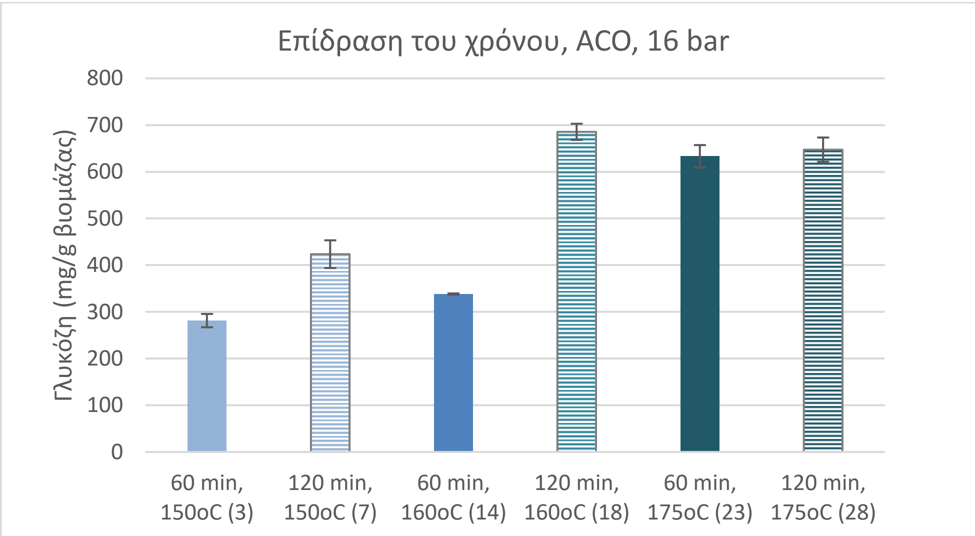
Διάγραμμα 10 : Επίδραση της πίεσης για χρόνο 120 min και διαλύτη το τετραϋδροφουράνιο (THF) , σύμφωνα με την παραγωγή γλυκόζης μετά από 72 ώρες υδρόλυσης.

Στην προκατεργασία της βιομάζας με ακετόνη (ACO) για χρόνο 120 min, στους 150°C και 160°C η πίεση 16 bar δείχνει να ευνοεί την παραγωγή γλυκόζης σε σχέση με τα 8 bar, ενώ στους 175°C το συμπέρασμα είναι το αντίθετο.

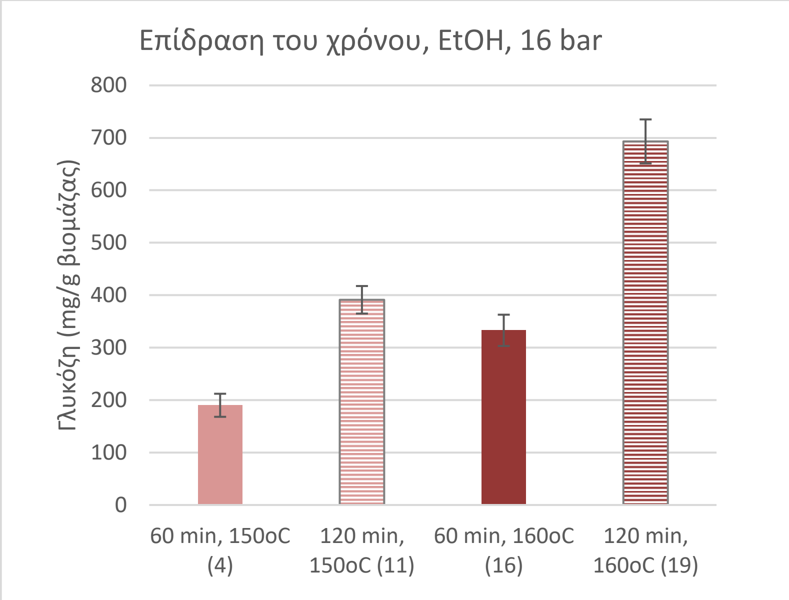
Για τον ίδιο χρόνο προκατεργασίας αλλά διαλύτη τετραϋδροφουράνιο (THF), για πίεση 16 bar η σακχαροποίηση είναι αποδοτικότερη σε σύγκριση με τα 8 bar, για τους 150°C και 160°C.

Επίδραση του χρόνου στην ενζυμική υδρόλυση

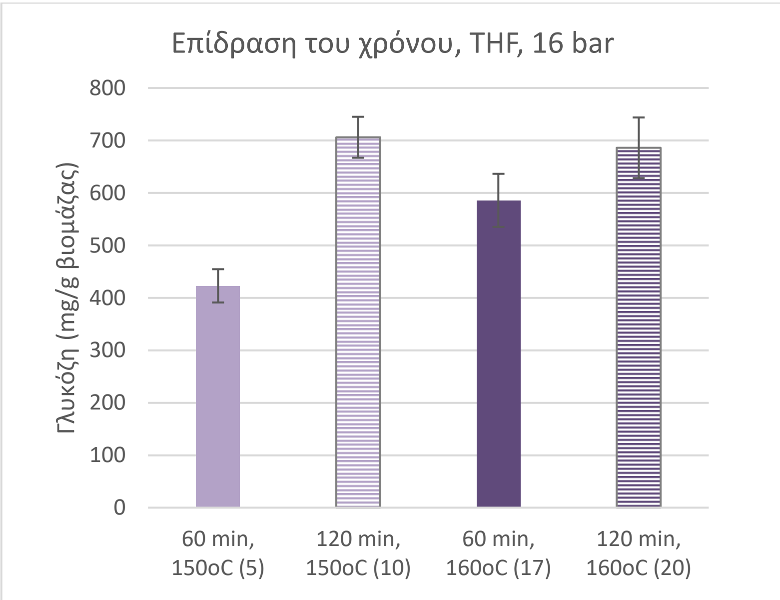
Η προκατεργασίας έγινε σε χρόνο 60min και 120min.



Διάγραμμα 11: Επίδραση του χρόνου για πίεση 16 bar και διαλύτη την ακετόνη (ACO), σύμφωνα με την παραγωγή γλυκόζης μετά από 72 ώρες υδρόλυσης.



Διάγραμμα 12: Επίδραση του χρόνου για πίεση 16 bar και διαλύτη την αιθανόλη (EtOH), σύμφωνα με την παραγωγή γλυκόζης μετά από 72 ώρες υδρόλυσης.



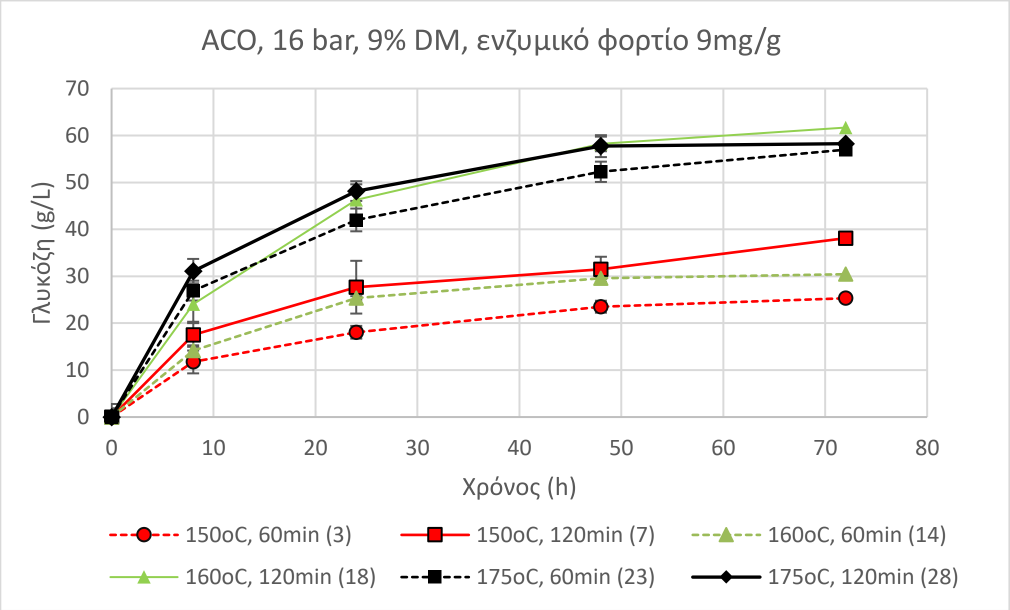
Διάγραμμα 13: Επίδραση του χρόνου για πίεση 16 bar και διαλύτη το τετραϋδροφουράνιο (THF), σύμφωνα με την παραγωγή γλυκόζης μετά από 72 ώρες υδρόλυσης.

Για προκατεργασία με πίεση 16 bar και θερμοκρασία 150°C και 160°C, και για τις τρεις περιπτώσεις διαλυτών, η αύξηση του χρόνου προκατεργασίας από 60 min σε 120 min ευνοεί την σακχαροποίηση, ιδίως στην προκατεργασία με ακετόνη και αιθανόλη στους 160°C όπου η απόδοση αυξάνεται ραγδαία. Από την άλλη, στην περίπτωση της ακετόνης τους 175°C, η αύξηση του χρόνου δεν επιφέρει στατιστικά σημαντική βελτίωση.

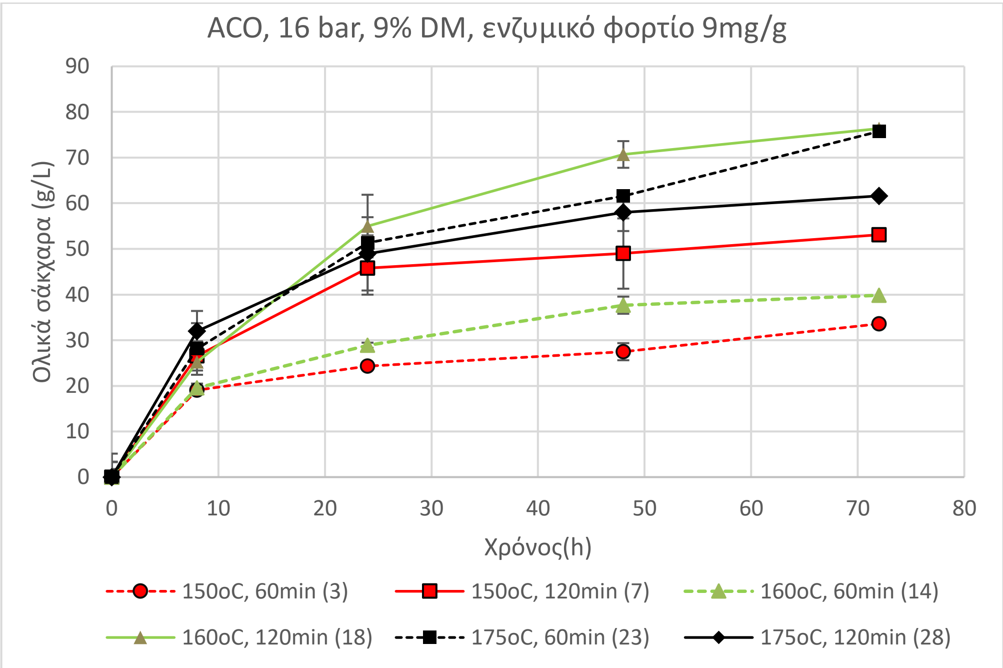
Συμπεράσματα

- Από τα αποτελέσματα των υδρολύσεων το τετραϋδροφουράνιο (THF) αποδείχθηκε ο πιο αποδοτικός διαλύτης στις περισσότερες συνθήκες προκατεργασίας. Για προκατεργασία σε συνθήκες θερμοκρασίας 160˚C, πίεσης 16 bar και χρόνου 120 min και 175˚C, 16 bar και 60 λεπτά, και οι τρεις διαλύτες έχουν μεγάλη απόδοση. Τέλος, η ακετόνη φαίνεται να υπερτερεί των άλλων δυο διαλυτών όταν η επεξεργασία της βιομάζας πραγματοποιείται σε πίεση 8 bar, θερμοκρασία 160˚C και χρόνο 120 λεπτά.
- Σε υψηλές πιέσεις και χαμηλότερο χρόνο επεξεργασίας η αύξηση της θερμοκρασίας φαίνεται από τα αποτελέσματα να επηρεάζει πολύ θετικά την σακχαροποίηση της βιομάζας, ενώ για χαμηλότερους χρόνους η επίδραση είναι μικρότερη.
- Παρατηρήθηκε ότι η αύξηση της πίεσης σε θερμοκρασίες έως και 160˚C βελτιώνει πολύ την υδρόλυση της βιομάζας προς γλυκόζη, ενώ σε υψηλότερες θερμοκρασίες παρατηρήθηκε το αντίθετο.
- Παρατηρήθηκε ότι μεγαλύτερος χρόνος προκατεργασίας σε θερμοκρασίες έως και 160˚C βελτιώνει πολύ την υδρόλυση της βιομάζας προς γλυκόζη, ενώ σε υψηλότερες θερμοκρασίες ο χρόνος σε επηρέασε το αποτέλεσμα.

72 ώρες ενζυμική υδρόλυση με 9% ξηρή βιομάζα, ενζυμικό φορτίο 9 mg/g υποστρώματος - Απελευθέρωση γλυκόζης και ολικών σακχάρων.

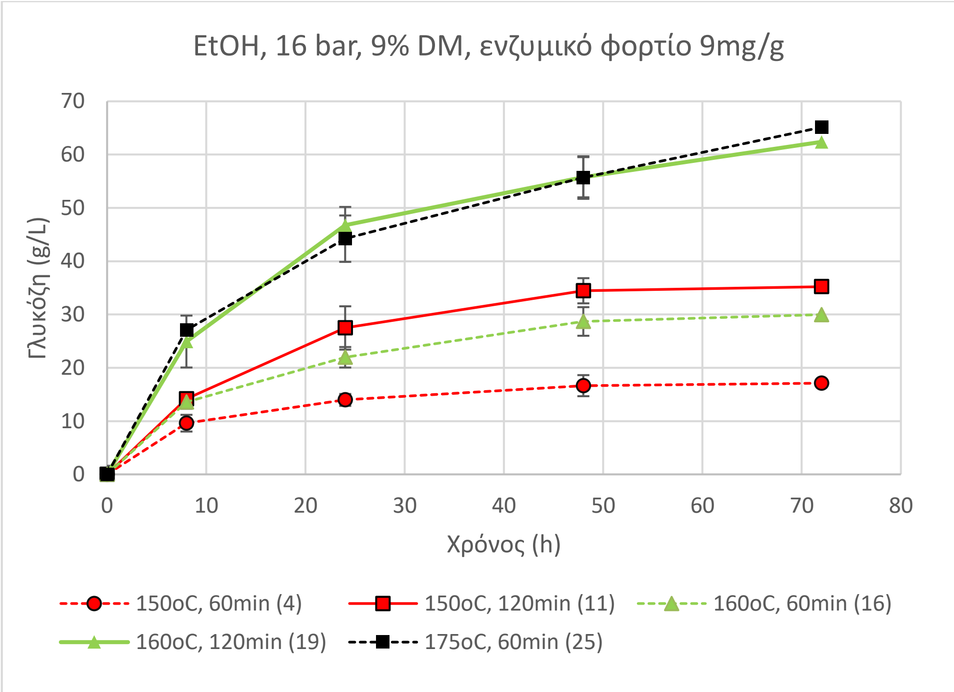


Διάγραμμα 14: Σύγκριση της γλυκόζης που απελευθερώθηκε σε διαφορετικές θερμοκρασίες και χρόνους προκατεργασίας, με διαλύτη την ακετόνη (ACO) σε πίεση 16 bar

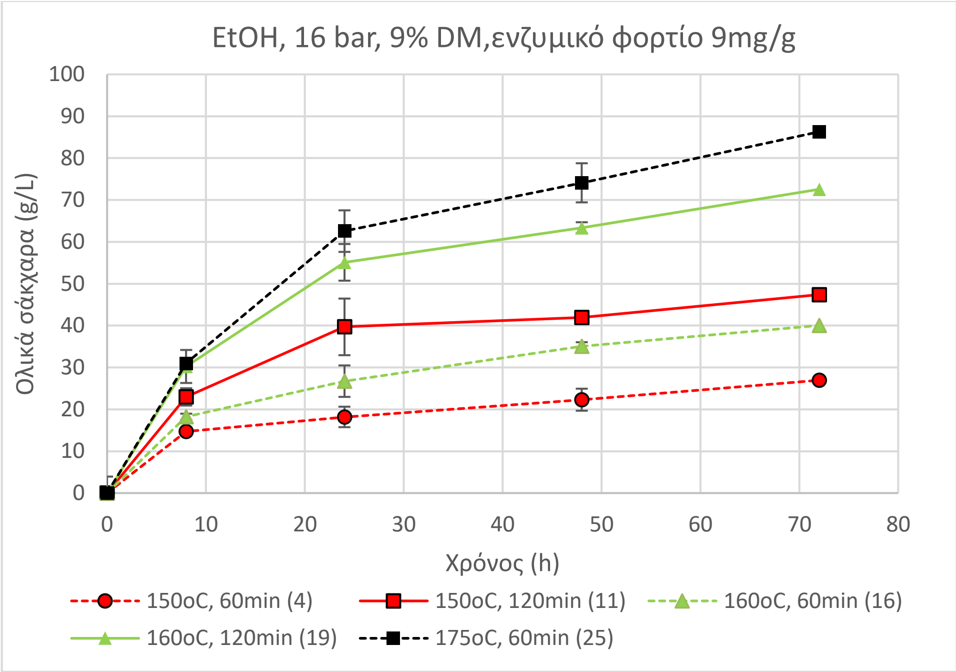


Διάγραμμα 15: Σύγκριση των σακχάρων που απελευθερώθηκαν σε διαφορετικές θερμοκρασίες και χρόνους προκατεργασίας, με διαλύτη την ακετόνη (ACO) σε πίεση 16 bar

Στην περίπτωση που η ακετόνη χρησιμοποιείται ως διαλύτης ,για προκατεργασία με 160˚C και 120min, 175˚C και 60min, 175˚C και 120min η παραγωγή γλυκόζης μεγιστοποιείται, ενώ για 160˚C και 120min μεγιστοποιείται η απελευθέρωση ολικών σακχάρων. Συγκεκριμένα η βιομάζα 28 έχει μόνο 8,6% ημικυτταρίνη, συγκριτικά με την βιομάζα 18 που έχει 13,32% και την βιομάζα 23 που έχει 11,45% ημικυτταρίνη.

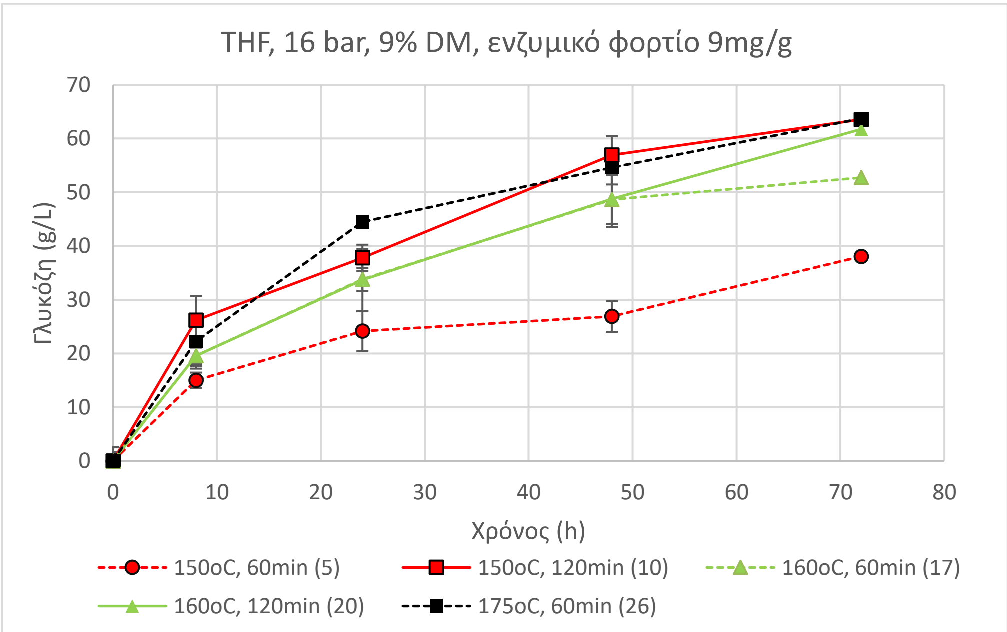


Διάγραμμα 16: Σύγκριση της γλυκόζης που απελευθερώθηκε σε διαφορετικές θερμοκρασίες και χρόνους προκατεργασίας, με διαλύτη την αιθανόλη (EtOH) σε πίεση 16 bar

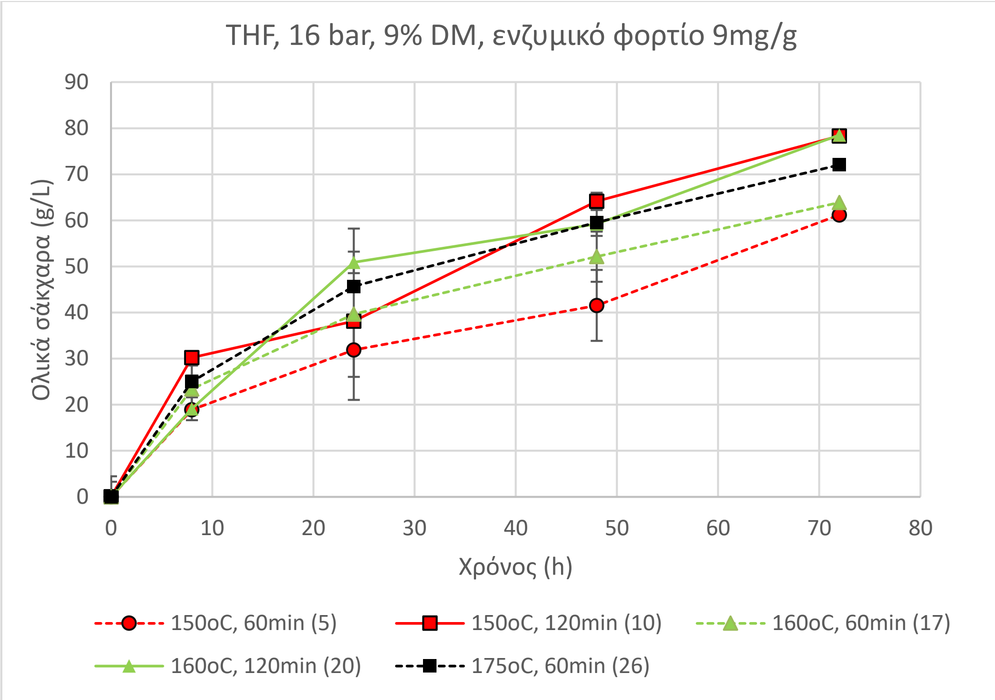


Διάγραμμα 17: Σύγκριση των ολικών σακχάρων που απελευθερώθηκαν σε διαφορετικές θερμοκρασίες και χρόνους προκατεργασίας, με διαλύτη την αιθανόλη (EtOH) σε πίεση 16 bar

Στην περίπτωση της αιθανόλης , για προκατεργασία με 160˚C και 120min, 175˚C και 120min εμφανίζεται η καλύτερη απόδοση στην παραγωγή γλυκόζης. Για τα ολικά σάκχαρα η μέγιστη απόδοση εμφανίζεται για συνθήκες 175˚C και 60min.



Διάγραμμα 18: Σύγκριση της γλυκόζης που απελευθερώθηκε σε διαφορετικές θερμοκρασίες και χρόνους προκατεργασίας, με διαλύτη το τετραϋδροφουράνιο (THF) σε πίεση 16 bar



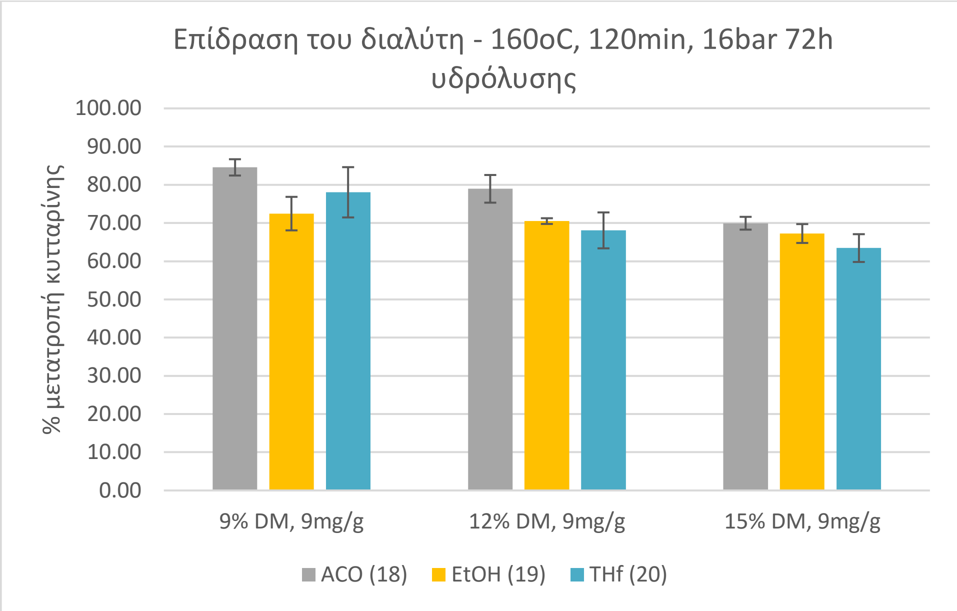
Διάγραμμα 19: Σύγκριση των ολικών σακχάρων που απελευθερώθηκαν σε διαφορετικές θερμοκρασίες και χρόνους προκατεργασίας, με διαλύτη το τετραϋδροφουράνιο (THF) σε πίεση 16 bar

Όταν χρησιμοποιείται ως διαλύτης το τετραϋδροφουράνιο ,στις 72 ώρες υδρόλυσης η παραγωγή γλυκόζης φτάνει σε μέγιστο για 150˚C και 120min, 160˚C και 120min, 175˚C και 60min, όμως κατά της διάρκεια των 72 ωρών για 150˚C και 120min και 175˚C και 60min η σακχαροποίηση είναι αποτελεσματικότερη. Από την άλλη, τα καλύτερα αποτελέσματα για τα ολικά σάκχαρα σημειώνονται για 150˚C και 120min και 160˚C και 120min.

Συγκρίνοντας τα αποτελέσματα με την μελέτη της αναφοράς [32] και [37] που παρουσιάζεται παραπάνω, παρατηρείται ότι τα ολικά αναγωγικά σάκχαρα που υπολογίστηκαν σε κάποιες περιπτώσεις είναι υπερεκτιμημένα καθώς φτάνουν σε πολύ μεγάλα ποσοστά (95,86% της βιομάζας για το δείγμα 25). Τα περισσότερα δείγματα έχουν πάνω από 50% ολικά αναγωγικά σάκχαρα, όπως και το αποτέλεσμα στο πείραμα της αναφοράς [34] (83 g/L ολικά αναγωγικά σάκχαρα/162,5 g/L βιομάζα), ενώ όλα είναι υψηλότερα το αποτέλεσμα στο πείραμα της αναφοράς [32].

72 ώρες ενζυμική υδρόλυση με 9%, 12%, 15% ξηρή βιομάζα, ενζυμικό φορτίο 9 mg/g υποστρώματος – σάκχαρα που απελευθερώθηκαν.

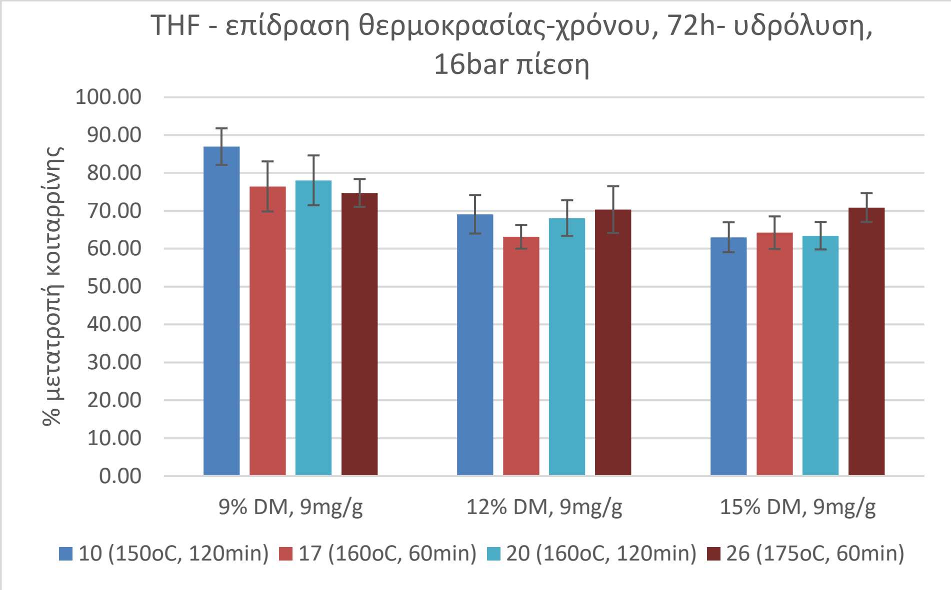
Επίδραση του διαλύτη στη μετατροπή της κυτταρίνης



Διάγραμμα 20: Η επί της εκατό μετατροπή της κυτταρίνης σε γλυκόζη, για τους τρεις διαλύτες σε συνθήκες προκατεργασίας 160˚C, 120min και 16 bar μετά από 72h υδρόλυσης, για 9%, 12%, 15% ξηρή μάζα και ενζυμικό φορτίο 9mg/g υποστρώματος

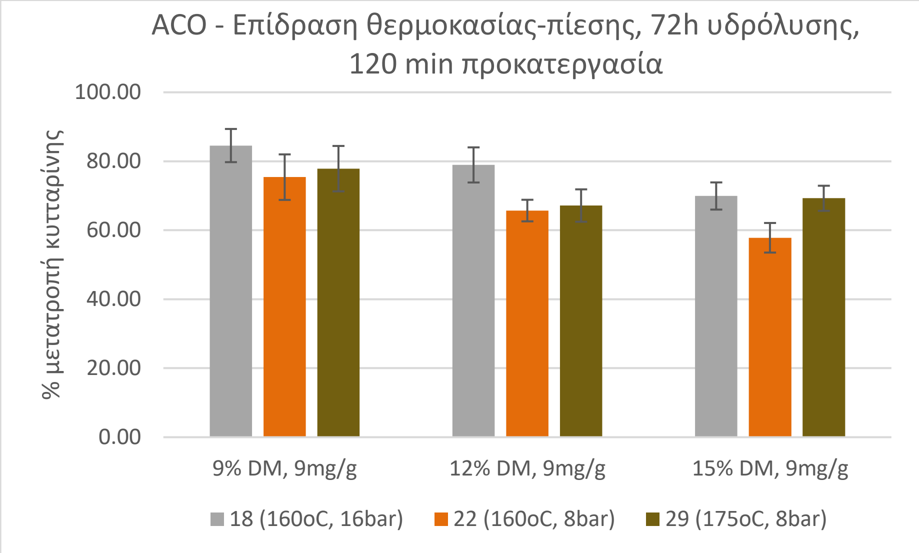
Από το διάγραμμα 20 είναι εμφανές πως για ενζυμικό φορτίο 9mg/g υποστρώματος, καλύτερη απόδοση στην μετατροπή κυτταρίνης σε γλυκόζη έχει η υδρόλυση με 9% ξηρή μάζα, καθώς και για τους τρεις διαλύτες έχει υψηλότερη τιμή.

Επίδραση των συνθηκών προκατεργασίας στη μετατροπή της κυτταρίνης (πίεση-θερμοκρασία-χρόνος)



Διάγραμμα 21: Η επί της εκατό μετατροπή της κυτταρίνης σε γλυκόζη, στην περίπτωση του τετραϋδροφουράνιου (THF) για 72 ώρες υδρόλυσης και προκατεργασία σε 16bar, για διαφορετικές συνθήκες θερμοκρασίας και χρόνου, για 9%, 12%, 15% ξηρή μάζα και ενζυμικό φορτίο 9mg/g υποστρώματος.

Στο διάγραμμα 21, για ενζυμικό φορτίο 9mg/g υποστρώματος, και οι τέσσερις διαφορετικές συνθήκες προκατεργασίας με διαλύτη το τετραϋδροφουράνιο (βιομάζα No 10, 17, 20, 26) παρουσιάζουν μεγαλύτερό ποσοστό μετατροπής της κυτταρίνης σε γλυκόζη για 9% ξηρή μάζα, ενώ μικρές διαφορές παρατηρούνται μεταξύ 12% και 15% ξηρής μάζας.



Διάγραμμα 22: Η επί της εκατό μετατροπή της κυτταρίνης σε γλυκόζη, στην περίπτωση της ακετόνης (ACO) για 72 ώρες υδρόλυσης και 120min προκατεργασίας, για διαφορετικές συνθήκες θερμοκρασίας και πίεσης, για 9%, 12%, 15% ξηρή μάζα και ενζυμικό φορτίο 9mg/g υποστρώματος.

Όπως επιβεβαιώνεται και από το διάγραμμα 22, για ενζυμικό φορτίο 9mg/g υποστρώματος, σε τρείς διαφορετικές συνθήκες προκατεργασίας με διαλύτη την ακετόνη (βιομάζα No 18, 22, 29), η μετατροπή της κυτταρίνης σε γλυκόζη μειώνεται όσο αυξάνεται το ποσοστό ξηρής μάζας από 9% σε 15%.

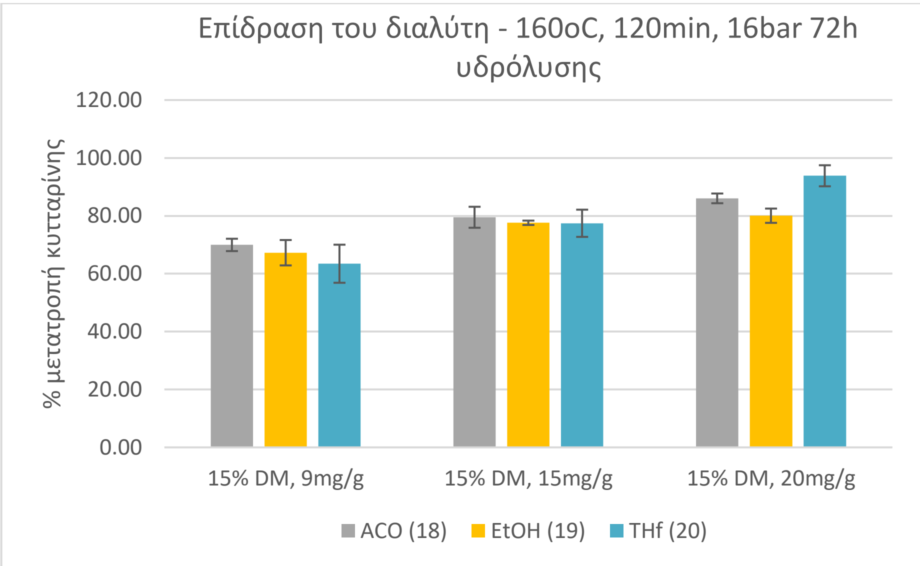
Συμπεράσματα

Συμπερασματικά, ανεξαρτήτως της προκατεργασία της βιομάζας, η αύξηση του ποσοστού ξηρής βιομάζας, για ενζυμικό φορτίο 9 mg/g ξηρής βιομάζας, δεν ευνόησε την ενζυμική υδρόλυση, καθώς το ποσοστό μετατροπής της κυτταρίνης ήταν σχεδόν σε κάθε περίπτωση χαμηλότερο όσο αυξανόταν το ποσοστό βιομάζας παρόλο που η συγκέντρωση γλυκόζης που υδρολήθηκε ήταν μεγαλύτερη (οι συγκεντρώσεις γλυκόζης φαίνονται σε πίνακα στο παράρτημα). Στο κεφάλαιο της θεωρίας παρουσιάζονται τα αποτελέσματα μίας μελέτης ενζυμικης υδρόλυσης σε διαφορετικές συγκεντρώσεις κυτταρίνης (αναφορά [1], πίνακας 1). Στο παρόν πείραμα, για 9% (β/ο) ξηρή βιομάζα η συγκέντρωση κυτταρίνης στα δείγματα βιομάζας κυμάνθηκε από 60,09 g/L σε 76,75 g/L, ενώ η συγκέντρωση γλυκόζης που προέκυψε κυμάνθηκε από 50,34 g/L σε 65,13 g/L και το ποσοστό μετατροπής της κυτταρίνης από 72,46 g/L σε 86,96 g/L. Στην βιβλιογραφική μελέτη, για αντίστοιχη συγκέντρωση κυτταρίνης, η γλυκόζη που παράχθηκε ήταν λιγότερη, αλλά το ποσοστό μετατροπής της κυτταρίνης είναι παρόμοιο. Για το 12% (β/ο) ξηρή βιομάζα η συγκέντρωση κυτταρίνης στα δείγματα βιομάζας κυμάνθηκε από 72,11 g/L σε 92,10 g/L, ενώ η συγκέντρωση γλυκόζης που προέκυψε κυμάνθηκε από 58,09 g/L σε 83,74 g/L και η μετατροπή της κυτταρίνης από 63,16 g/L σε

78,95 g/L. Εδώ τα αποτελέσματα συγκρίνονται με την δεύτερη σειρά του πίνακα 1 και τα συμπεράσματα είναι όμοια με την προηγούμενη συνθήκη. Για το 15% (β/ο) ξηρή βιομάζα η συγκέντρωση κυτταρίνης στα δείγματα βιομάζας κυμάνθηκε από 108,17 g/L σε 138,15g/L, ενώ η συγκέντρωση γλυκόζης που προέκυψε κυμάνθηκε από 64,34 g/L σε 104,25 g/L και η μετατροπή της κυτταρίνης από 57,82 g/L σε 78,07 g/L. Εδώ τα αποτελέσματα συγκρίθηκαν με την τρίτη σειρά του πίνακα 1 και η μεγαλύτερη τιμή συγκέντρωσης της γλυκόζης στο παρόν πείραμα είναι εμφανώς πολύ μεγαλύτερη από εκείνη της βιβλιογραφικής μελέτης. Η συνολική εικόνα στο πείραμα της βιβλιογραφίας είναι όμοια με αυτήν του παρόν πειράματος, δηλαδή ότι παρόλο που αυξάνεται η συγκέντρωση γλυκόζης όσο αυξάνεται η συγκέντρωση κυτταρίνης, και συνεπώς το ποσοστό ξηρής βιομάζας, το ποσοστό μετατροπής της κυτταρίνης μειώνεται.

72 ώρες ενζυμική υδρόλυση με 15% ξηρή βιομάζα, ενζυμικό φορτίο 9, 15 και 20 mg/g υποστρώματος – σάκχαρα που απελευθερώθηκαν

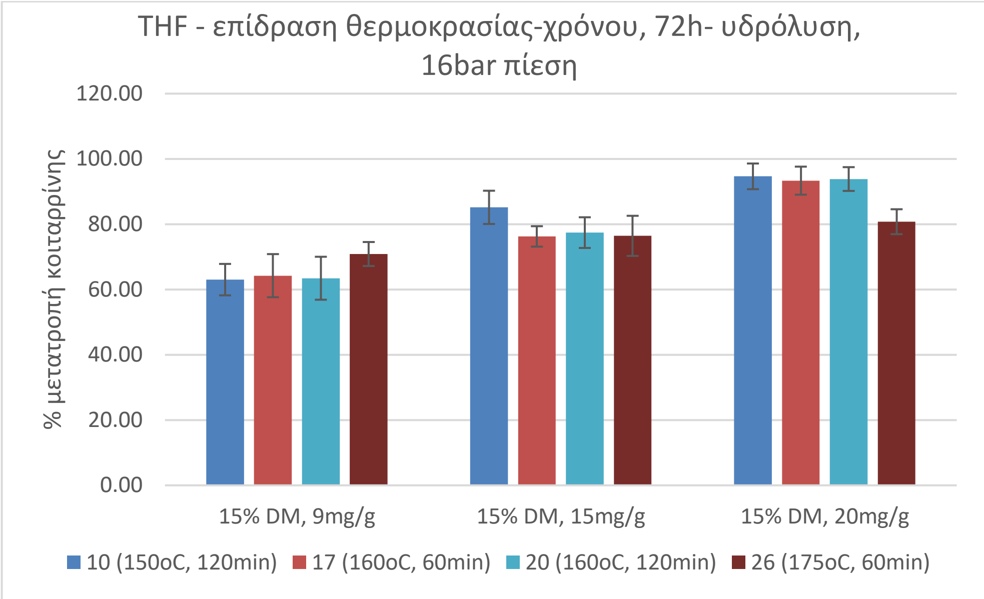
Επίδραση του διαλύτη στη μετατροπή της κυτταρίνης



Διάγραμμα 23: Η επί της εκατό μετατροπή της κυτταρίνης σε γλυκόζη, για τους τρεις διαλύτες σε συνθήκες προκατεργασίας 160˚C, 120min και 16 bar μετά από 72h υδρόλυσης, για ενζυμικό φορτίο 9, 15, 20mg/g υποστρώματος και ξηρή μάζα 15%

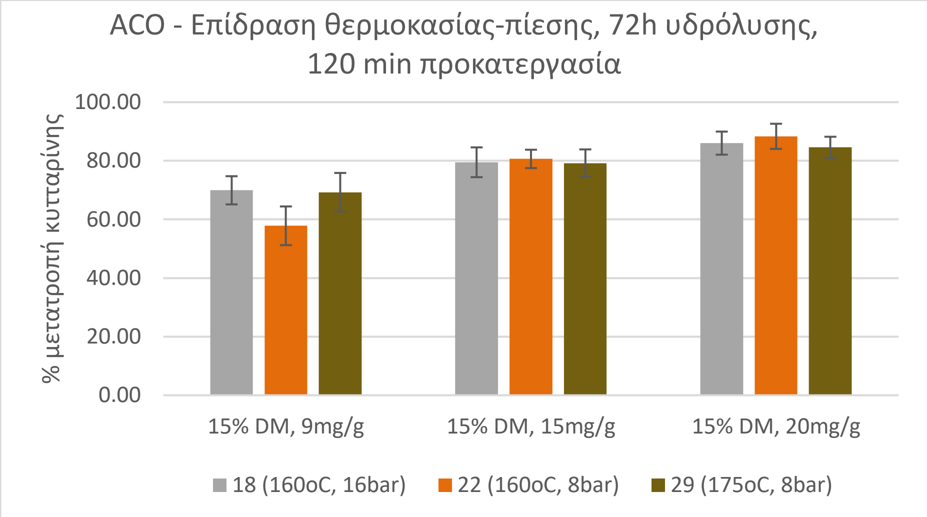
Στο διάγραμμα 23 παρατηρούμε ότι για 15% ξηρή μάζα, η αύξηση ενζύμου από 9 σε 20mg/g υποστρώματος έχει ως αποτέλεσμα την αύξηση στην απόδοση μετατροπής κυτταρίνης σε γλυκόζη.

Επίδραση των συνθηκών προκατεργασίας (πίεση-θερμοκρασία-χρόνος)



Διάγραμμα 24: Η επί της εκατό μετατροπή της κυτταρίνης σε γλυκόζη, στην περίπτωση του τετραϋδροφουράνιου (THF) για 72 ώρες υδρόλυσης και προκατεργασία σε 16bar, για διαφορετικές συνθήκες θερμοκρασίας και χρόνου, για ενζυμικό φορτίο 9, 15 και 20mg/g υποστρώματος και 15% ξηρή μάζα.

Στο διάγραμμα 24, για ξηρή μάζα 15%, και οι τέσσερις διαφορετικές συνθήκες προκατεργασίας με διαλύτη το τετραϋδροφουράνιο (βιομάζα Νο 10, 17, 20, 26) παρουσιάζουν μεγαλύτερό ποσοστό μετατροπής της κυτταρίνης σε γλυκόζη όσο αυξάνεται η ποσότητα ενζύμου από 9 σε 15mg/g υποστρώματος.



Διάγραμμα 25: Η επί της εκατό μετατροπή της κυτταρίνης σε γλυκόζη, στην περίπτωση της ακετόνης (ACO) για 72 ώρες υδρόλυσης και 120min προκατεργασίας, για διαφορετικές συνθήκες θερμοκρασίας και πίεσης, για 9, 15, 20mg/g υποστρώματος και ξηρή μάζα 15%.

Όπως επιβεβαιώνεται και από το διάγραμμα 25, για 15% ξηρή μάζα, σε τρείς διαφορετικές συνθήκες προκατεργασίας με διαλύτη την ακετόνη (βιομάζα Νο 18, 22, 29), η μετατροπή της κυτταρίνης σε γλυκόζη αυξάνεται όσο αυξάνεται το ενζυμικό φορτίο από 9 σε 20mg/g υποστρώματος.

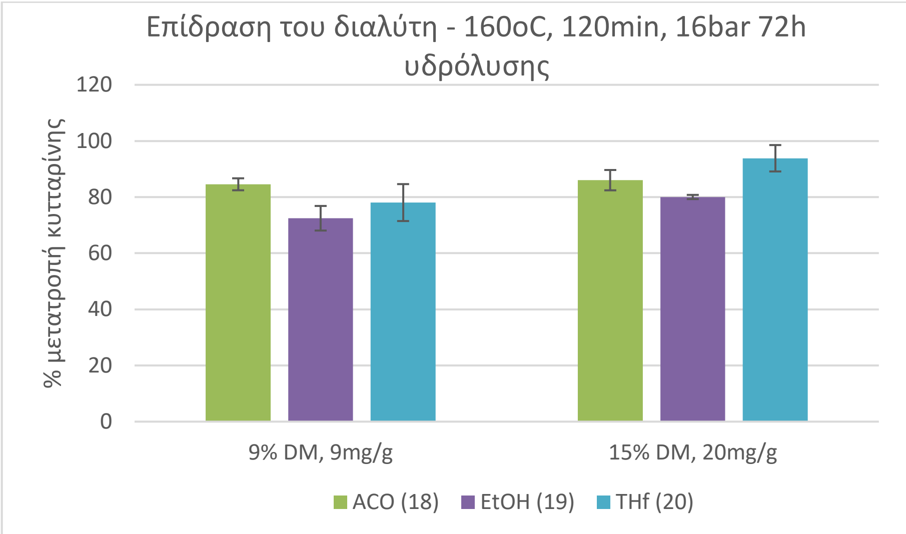
Συμπεράσματα

Καταληκτικά, ανεξαρτήτως την προκατεργασία της βιομάζας, το ποσοστό μετατροπής της κυτταρίνης αυξήθηκε σε κάθε δείγμα με την αύξηση του ενζυμικού φορτίου, για ποσοστό ξηρής βιομάζας 15% (β/ο) και συνεπώς είναι φανερό ότι η διεργασία επωφελήθηκε.

Σύγκριση των καλύτερων αποτελεσμάτων για 72 ώρες ενζυμικής υδρόλυσης

Επίδραση του διαλύτη στη μετατροπή της κυτταρίνης

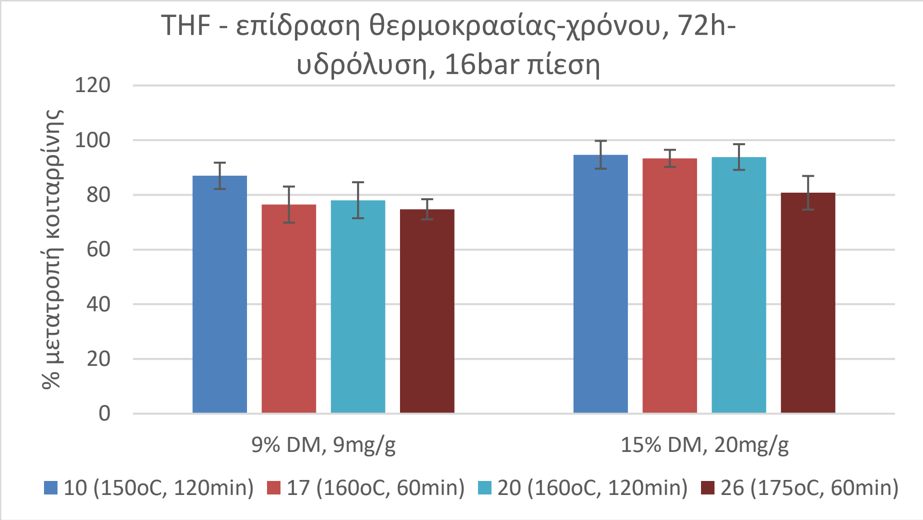
Από τα πειράματα των υδρολύσεων που πραγματοποιήθηκαν, τα καλύτερα αποτελέσματα σε ποσοστό μετατροπής κυτταρίνης σε γλυκόζη προέκυψαν για τους συνδυασμούς 9% ξηρή μάζα, 9mg/g υποστρώματος και 15% ξηρή μάζα, 20mg/g υποστρώματος.



Διάγραμμα 26: Η επί της εκατό μετατροπή της κυτταρίνης σε γλυκόζη, για τους τρεις διαλύτες σε συνθήκες προκατεργασίας 160˚C, 120min και 16 bar μετά από 72h υδρόλυσης, για 9% ξηρή μάζα και ενζυμικό φορτίο 9mg/g υποστρώματος και 15% ξηρή μάζα και 20mg/g υποστρώματος.

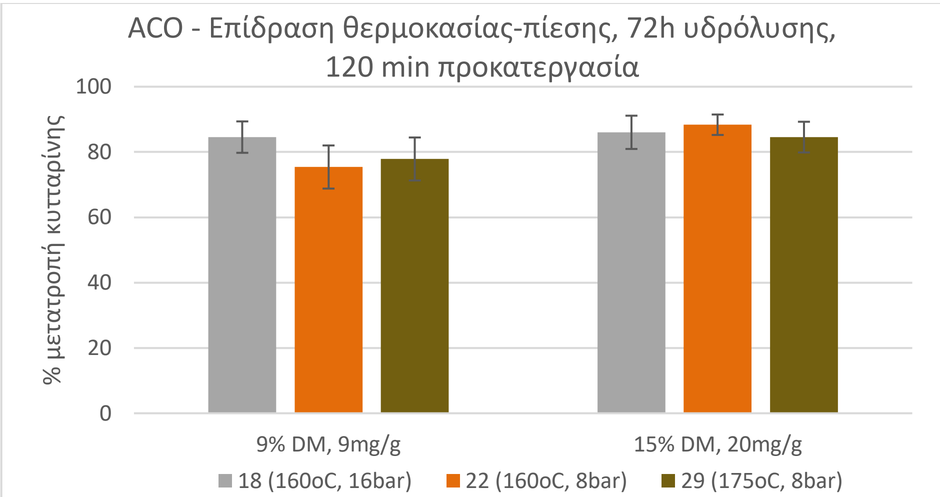
Στο διάγραμμα 26 παρατηρείτε ότι μεταξύ των δύο συνδυασμών ενζυμικού φορτίου και ξηρής μάζας, δεν υπάρχουν μεγάλες διαφορές ως προς το ποσοστό μετατροπής την κυτταρίνης σε γλυκόζη, ελάχιστα υπερτερεί ο συνδυασμός 15% ξηρή μάζα και 20mg/g υποστρώματος. Συγκεκριμένα, στην περίπτωση της ακετόνης το ποσοστό είναι μεγαλύτερο κατά 1,7%, της αιθανόλης κατά 9,5% και για το τετραϋδροφουράνιο κατά 16,8%.

Επίδραση των συνθηκών προκατεργασίας στη μετατροπή της κυτταρίνης (πίεση-θερμοκρασία-χρόνος)



Διάγραμμα 27: Η επί της εκατό μετατροπή της κυτταρίνης σε γλυκόζη, στην περίπτωση του τετραϋδροφουράνιου (THF) για 72 ώρες υδρόλυσης και προκατεργασία σε 16bar, για διαφορετικές συνθήκες θερμοκρασίας και χρόνου, για 9% ξηρή μάζα και ενζυμικό φορτίο 9mg/g υποστρώματος και 15% ξηρή μάζα και 20mg/g υποστρώματος.

Από το διάγραμμα 27 παρατηρείτε ότι και στις τέσσερις διαφορετικές συνθήκες προκατεργασίας με διαλύτη το τετραϋδροφουράνιο (βιομάζα Νο 10, 17, 20, 26), ο συνδυασμός 15% ξηρή μάζα και 20mg/g υποστρώματος δίνει καλύτερα αποτελέσματα στο ποσοστό μετατροπής την κυτταρίνης σε γλυκόζη, ιδίως για την βιομάζα 17(160˚C,60min) και 20(160˚C,120min), όπου η αύξηση είναι πάνω από 16%.



Διάγραμμα 28: Η επί της εκατό μετατροπή της κυτταρίνης σε γλυκόζη, στην περίπτωση της ακετόνης (ACO) για 72 ώρες υδρόλυσης και 120min προκατεργασίας, για 9% ξηρή μάζα και ενζυμικό φορτίο 9mg/g υποστρώματος και 15% ξηρή μάζα και 20mg/g υποστρώματος.

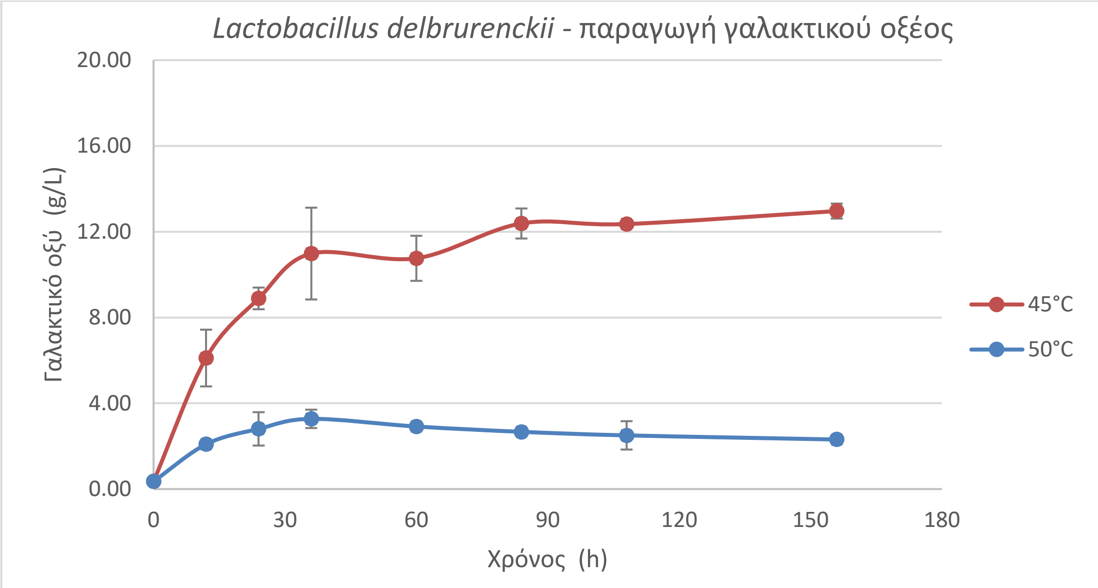
Και στο διάγραμμα 28 επιβεβαιώνεται ότι ο συνδυασμός 15% ξηρή μάζα και 20mg/g υποστρώματος δίνει ελάχιστα καλύτερα αποτελέσματα από τον συνδυασμό 9% ξηρή μάζα και 9mg/g υποστρώματος και για τις τρείς διαφορετικές συνθήκες προκατεργασίας με διαλύτη την ακετόνη (βιομάζα Νο 18, 22, 29). Την μεγαλύτερη αύξηση σημειώνει η βιομάζα 22(160˚C,8bar), η οποία είναι 14,7%.

Συμπεράσματα

Ο συνδιασμός 15% ξηρή βιομάζα, 20mg/g ενζυμικό φορτίο έχει υψηλότερο ποσοστό μετατροπής κυτταρίνης από τον συνδιασμό 9% ξηρή βιομάζα, 9mg/g ενζυμικό φορτίο, που σημαίνει πως πράγματι η διεργασία έγινε περισσότερο αποδοτική. Αυτό που πρέπει ασφαλώς να εξεταστεί είναι αν αυτή η αύξηση μπορεί να καλύψει ή τουλάχιστον να ισοσταθμίσει το επιπρόσθετο κόστος χρήσης βιομάζας αλλά κυρίως χρήσης ενζύμου, καθώς πρόκειται για πρώτη ύλη με υψηλό κόστος.

Αξιοποίηση προκατεργασμένης βιομάζας για την παραγωγή γαλακτικού οξέος από το στέλεχος *Lactobacillus delbrueckii subsp. bulgaricus* ATCC 11842

Καλλιέργειες με καθαρή γλυκόζη στους 45˚C και 50˚C, μελέτη επίδρασης της θερμοκρασίας της καλλιέργειας

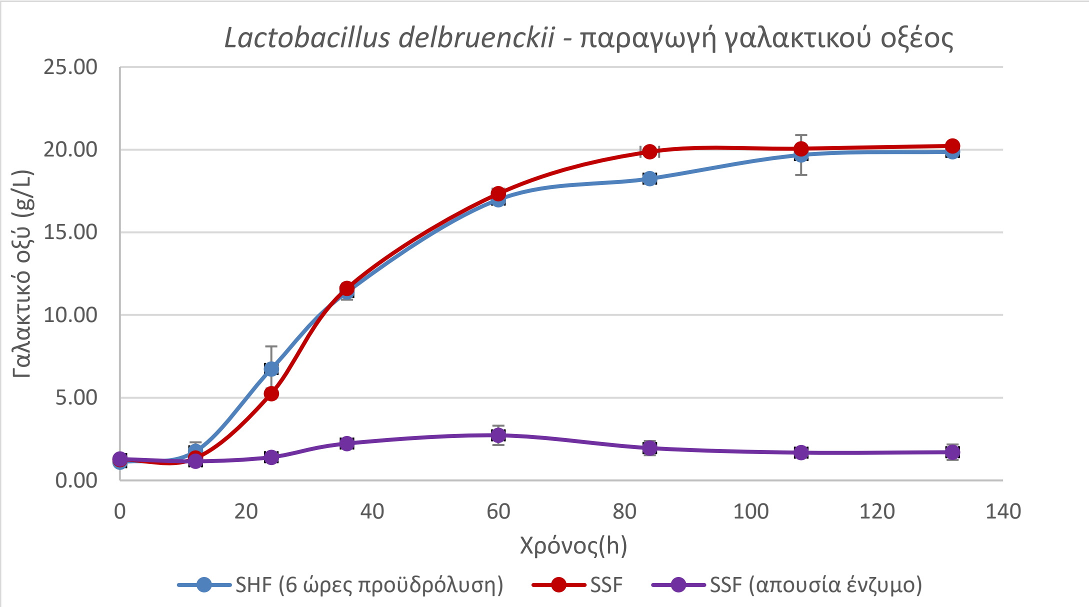


Διάγραμμα 29: Καμπύλη παραγωγή γαλακτικού οξέος συναρτήσει του χρόνου από το *Lactobacillus delbrueckii* για δύο συνθήκες: 45˚C-50˚C.

Όπως παρατηρείτε ο *Lactobacillus delbrueckii* δεν έχει αποδοτικά αποτελέσματα στους 50˚C καθώς παράγει πολύ μικρά ποσά γαλακτικού οξέος καθ'όλη την διάρκεια του πειράματος. Αντιθέτως, στους 45˚C η παραγωγικότατα του λακτοβάκιλλου έχει μια ανοδική πορεία, που μας οδηγεί αυτόματα στην επιλογή αυτής της θερμοκρασίας για την ανάπτυξη των πειραμάτων με τον *Lactobacillus delbrueckii*.

Το παραπάνω πείραμα είχε σκοπό να εξετάσει την βέλτιστη θερμοκρασία που ζυμώνει ο *L. delbrueckii* ATCC 11842 σύμφωνα με αναφορές που έχουν γίνει για τις βέλτιστες θερμοκρασίες ζύμωσης των λακτοβάκιλλων. Επιπλέον, ήταν σημαντικό να εξεταστεί αν το στέλεχος αποδίδει σε υψηλές θερμοκρασία καθώς εκεί μειώνονται και οι πιθανότητες ανάπτυξης μη θερμόφιλων μικροοργανισμών. Συγκεκριμένα, στους 50˚C υπάρχει δυνατότητα τα πειράματα να γίνουν σε μη αποστειρωμένο μέσο, όπως παρουσιάζεται στην βιβλιογραφία [1] και [38], γεγονός που έχει μεγάλα οφέλη κόστους και χρόνου, ιδίως σε βιομηχανική κλίμακα, και επίσης αποτελεί και την βέλτιστη θερμοκρασία της ταυτόχρονης σακχαροποίησης και ζύμωσης (SSF).

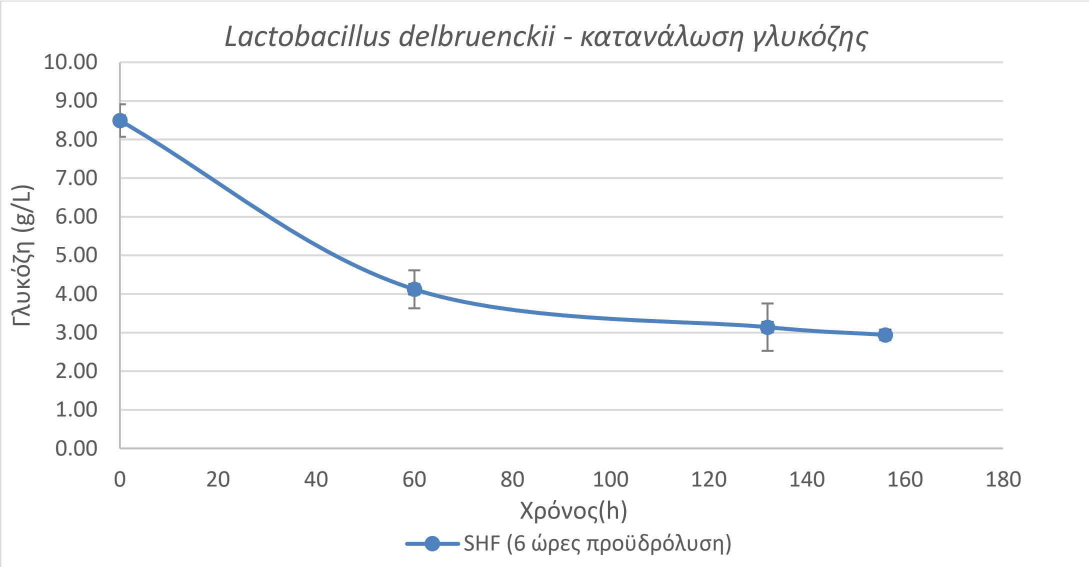
Καλλιέργειες με βιομάζα καλαμποκιού σε συνθήκες : ταυτόχρονη σακχαροποίηση και ζύμωση (SSF)/ διακριτή σακχαροποίηση και ζύμωση (SHF) (6 ώρες προϋδρόλυση)/ ταυτόχρονη σακχαροποίηση και ζύμωση (SSF) απουσία ενζύμου



Διάγραμμα 30: Καμπύλη παραγωγή γαλακτικού οξέος συναρτήσει του χρόνου από το *Lactobacillus delbrueckii* για τρεις συνθήκες: 6 ώρες προυδρόλυση-χωρίς προυδρόλυση-χωρίς ένζυμο.

Όπως παρατηρείτε από το διάγραμμα 30 η διαδικασία ταυτόχρονης σακχαροποίησης και ζύμωσης (SSF) έχει αντίστοιχα αποτελέσματα με την διακριτή σακχαροποίηση και ζύμωση (SHF). Αντιθέτως, η καμπύλη που περιγράφει την διαδικασία ταυτόχρονης σακχαροποίησης και ζύμωσης (SSF) απουσία ένζυμου διαφοροποιείται αισθητά καθώς η παραγωγή γαλακτικού οξέος είναι ελάχιστη και συνεπώς το συγκεκριμένο στέλεχος χρειάζεται την παρουσία ενζύμου για να υδρολύσει την βιομάζα και έπειτα να ζυμώσει τα σάκχαρα.

Το παραπάνω πείραμα έγινε με σκοπό να εκτιμηθεί ποια μέθοδος είναι πιο αποδοτική ως προς την παραγωγή γαλακτικού οξέος (SSF ή SHF) αλλά και να εξετασθεί αν το στέλεχος ATCC 11842 μπορεί να παράγει κυτταρινολυτικά ένζυμα όπως αποδείχθηκε στο στέλεχος *Bacillus coagulans* MA-13 [36]. Στην μελέτη που έχει πραγματοποιηθεί και έχει περιγραφεί παραπάνω (αναφορά [1]) το γαλακτικό οξύ για την SHF ήταν 32.22 g/L και για την SSF 50.54 g/L σε συγκέντρωση κυτταρίνης 60 g/L και ημικυτταρίνης 11.64 g/L, ενώ στο παρόν πείραμα 19,87 g/L και 20,83 g/L αντίστοιχα, σε συγκέντρωση κυτταρίνης 49,5 g/L και ημικυτταρίνης 20,7 g/L. Το πείραμα της βιβλιογραφίας πραγματοποιήθηκε με ένα στέλεχος που φάνηκε να παράγει κυτταρινολιτικά ένζυμα και συνεπώς ενισχύει την ταυτόχρονη σακχαροποίηση και ζύμωση, ενώ το στέλεχος *L. delbrueckii* ATCC 11842 έδειξε πως απουσία ενζύμου δεν μπορεί να παράγει γαλακτικό οξύ.

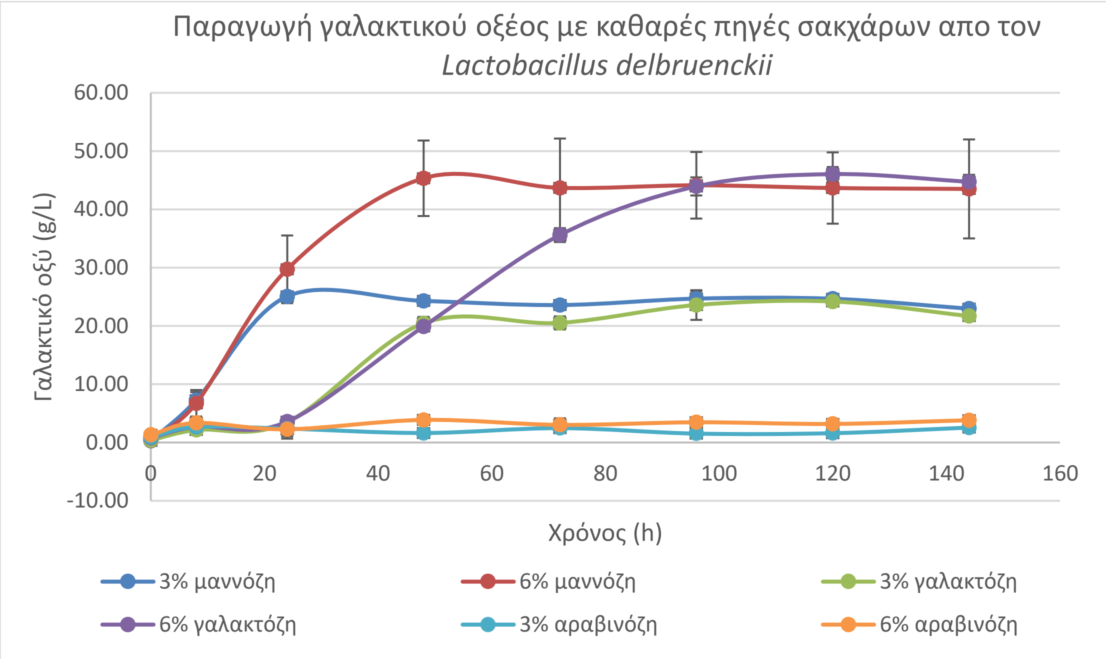


Διάγραμμα 31 : Καμπύλη κατανάλωσης γλυκόζης συναρτήσει του χρόνου από το *Lactobacillus delbrueckii* την SHF (6 ώρες προυδρόλυση)

Στο παραπάνω διάγραμμα φαίνεται η κατανάλωση γλυκόζης στην περίπτωση διακριτής υδρόλυσης και ζύμωσης (SHF) όπου η κατανάλωση της γλυκόζης που έχει παραχθεί από την προυδρόλυση γίνεται με ταχύ ρυθμό (0,07 g/L/h) μεταξύ 0 και 60 ωρών.

Καλλιέργειες με καθαρές πηγές σακχάρων

Παραγωγή γαλακτικού οξέος με καθαρές πηγές σακχάρων από τον Lactobacillus delbrueckii



Διάγραμμα 32 : Η παραγωγή γαλακτικού οξέος από τον *Lactobacillus delbrueckii* παρουσία καθαρών πηγών μαννόζης, γαλακτόζης και αραβινόζης σε καλλιέργεια 144 ωρών.

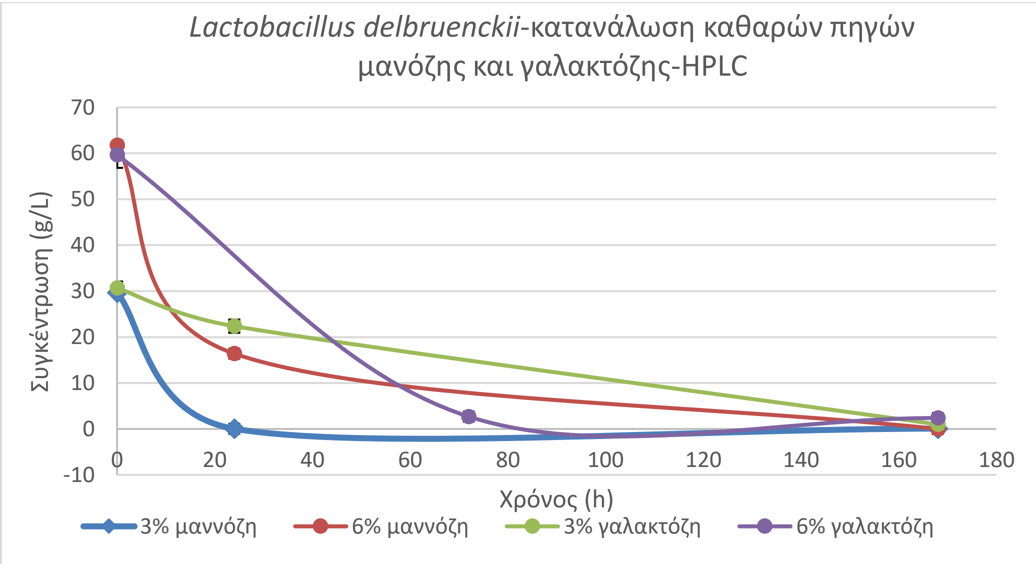
Από το διάγραμμα 32 είναι φανερό ότι με καθαρή πηγή την αραβινόζη ο λακτοβάκιλλος δεν παράγει γαλακτικό οξύ. Αντιθέτως, με 3% και 6% κ.ο μαννόζη παράγει μέχρι και τις 24 και 48 ώρες αντίστοιχα, ενώ με 3% και 6% κ.ο γαλακτόζη παράγει μέχρι και τις 48 και 120 ώρες αντίστοιχα.

Πίνακας 7: Παραγωγή γαλακτικού οξέος από τον *Lactobacillus delbrueckii* με καθαρές πηγές μανόζης και γαλακτόζης

Καθαρή πηγή σακχάρου	Συγκέντρωση σακχάρου που καταναλώθηκε (g/L)	Απόδοση (mg /g σακχάρου)	Απόδοση επί του θεωρητικού(%)
Μαννόζη	29,58 ± 0,71	816,47 ± 6,35	81,65 ± 6,35
Μαννόζη	60,00 ± 0,00	714,59 ± 87,01	71,46 ± 8,70
Γαλακτόζη	29,70 ± 1,41	796,70 ± 24,89	79,67 ± 2,49
Γαλακτόζη	57,28 ± 2,85	768,85 ± 22,37	76,88 ± 2,24

Με τα αποτελέσματα του παραπάνω πίνακα συγκρίνονται οι αποδόσεις γαλακτικού οξέος επί του θεωρητικά παραγόμενου, για 3% μαννόζης και 3% γαλακτόζης στις 144 ώρες και προκύπτει πως είναι εξαιρετικά παρόμοιες. Ομοίως για την περίπτωση 6% μαννόζη και 6% γαλακτόζη. Οι αποδόσεις είναι αρκετά υψηλές αποδεικνύοντας ότι το στέλεχος ATCC 11842 μπορεί να καταναλώσει μαννόζη και γαλακτόζη και να παράγει υψηλά ποσοστά γαλακτικού οξέος. Παρόλα αυτά στην βιβλιογραφία βρέθηκε πείραμα παραγωγής γαλακτικού οξέος με καθαρές πηγές ξυλόζης και γλυκόζης, το οποίο περιγράφεται παραπάνω, (αναφορά [38]) και η απόδοση ανά σάκχαρο υπολογίστηκε 0,86 g/g σακχάρου και 0,90 g/g σακχάρου αντίστοιχα. Οι παραπάνω αποδόσεις είναι παρόμοιες με αυτές του παρόντος πειράματος.

Κατανάλωση καθαρών πηγών μαννόζης και γαλακτόζης – Υγρή χρωματογραφία (HPLC)



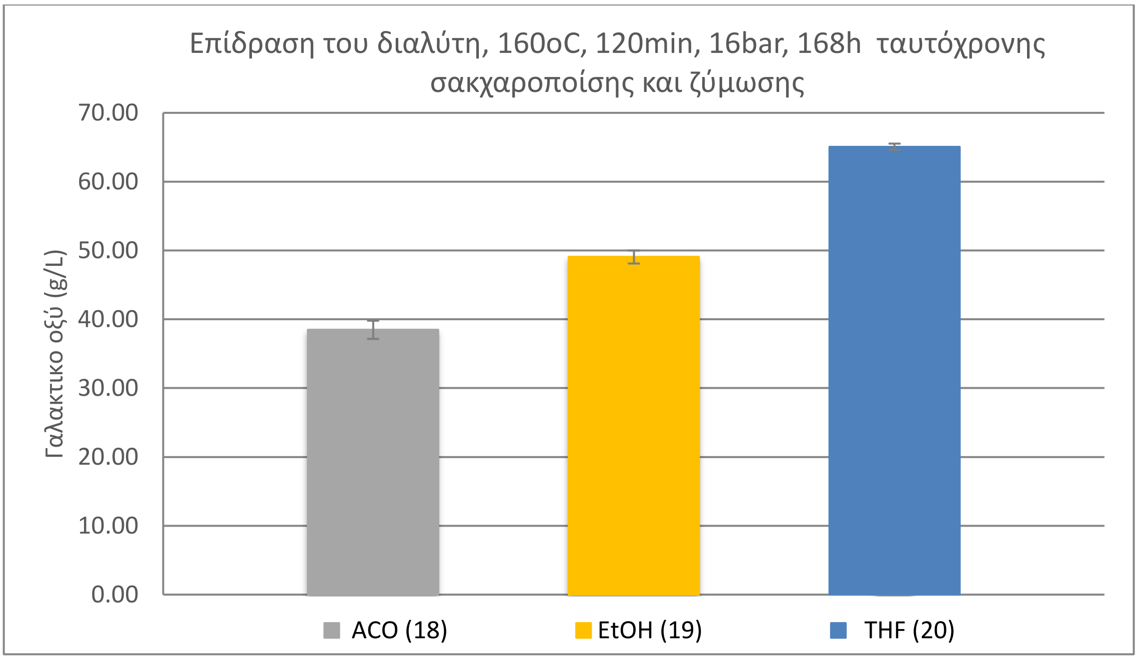
Διάγραμμα 33 : Η κατανάλωση των καθαρών πηγών μαννόζης και γαλακτόζης από τον *Lactobacillus delbrueckii* σε πείραμα 168h.

Από το παραπάνω διάγραμμα παρατηρείται ότι το 3% μαννόζης καταναλώνεται μέχρι τις 24 ώρες, ενώ το 6% μαννόζης μειώνεται απότομα μέχρι τις 24 ώρες και μετά καταναλώνεται σταθερά μέχρι τις 168 ώρες. Το 3% γαλακτόζης καταναλώνεται σταθερά μέχρι τις 168 ώρες, ενώ το 6% γαλακτόζης έχει καταναλωθεί σχεδόν ολοκληρωτικά μέχρι τις 72 ώρες. Παρατηρείται ότι για να καταναλώσει το στέλεχος τη γαλακτόζη απαιτείται μεγαλύτερο διάστημα όπως φαίνεται στο γράφημα, καθυστερώντας λίγο την ανάπτυξή του και συνεπώς την παραγωγή γαλακτικού, πιθανών για να συνθέσει ο οργανισμός τα κατάλληλα γονίδια για τον καταβολισμό της γαλακτόζης. Συγκρίνοντας, τα αποτελέσματα αυτά με την βιβλιογραφική αναφορά [38] παρατηρείται ότι για το χρονικό διάστημα 0 με 24 ώρες η κατανάλωση στο παρόν πείραμα ήταν για 3%, 6% μαννόζη και 3% γαλακτόζη 1,23 g/L/h, 1,89 g/L/h και 0,35 g/L/h αντίστοιχα, ενώ τις πρώτες 72 ώρες για 6% γαλακτόζη ήταν 0,79 g/L/h, ενώ η κατανάλωση της μελέτης ήταν 2,02 g/L/h και 1,58 g/L/h για την ξυλόζη και την γλυκόζη αντίστοιχα. Εκτός από το πείραμα με το 3% γαλακτόζης όπου η κατανάλωση στις πρώτες 24 ώρες είναι αρκετά χαμηλή τα υπόλοιπα αποτελέσματα είναι πολύ σχετικά με αυτά της βιβλιογραφίας.

Ταυτόχρονη σακχαροποίηση λιγνοκυτταρινούχου βιομάζας και ζύμωση γαλακτικού οξέος (SSF) στους 45˚C σε 9% (β/ο) ξηρή βιομάζα και 9mg/g υποστρώματος ενζυμικό φορτίο.

Στα παρακάτω διαγράμματα έγινε σύγκριση της παραγωγής γαλακτικού οξέος στις 168 ώρες ταυτόχρονης σακχαροποίησης και ζύμωσης καθώς σε αυτό τον χρόνο σταματάει η παραγωγή γαλακτικού οξέος από τον μικροοργανισμό αφού η συγκέντρωσή του παρέμεινε σταθερή συγκριτικά με την μέτρηση της προηγούμενης χρονικά δειγματοληψίας.

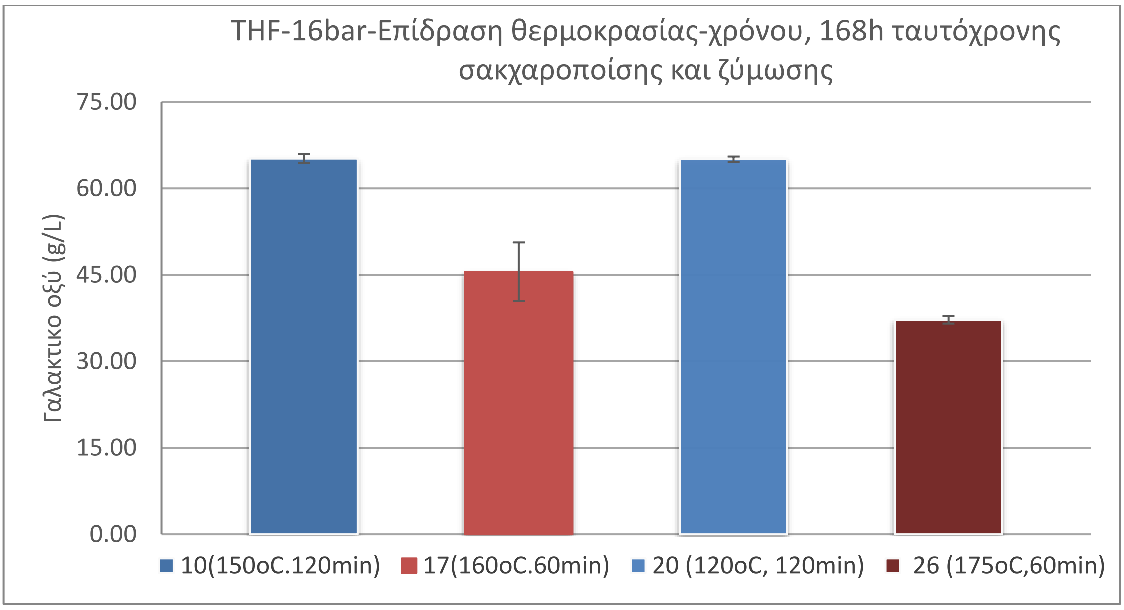
Επίδραση του διαλύτη στην παραγωγή γαλακτικού οξέος



Διάγραμμα 34: Η παραγωγή γαλακτικού οξέος από τον *Lactobacillus delbrueckii*, σε συνθήκες προκατεργασίας της βιομάζας, 160˚C, 120min και 16 bar για τους τρεις διαφορετικούς διαλύτες, για 168 ώρες ταυτόχρονης σακχαροποίησης και ζύμωσης.

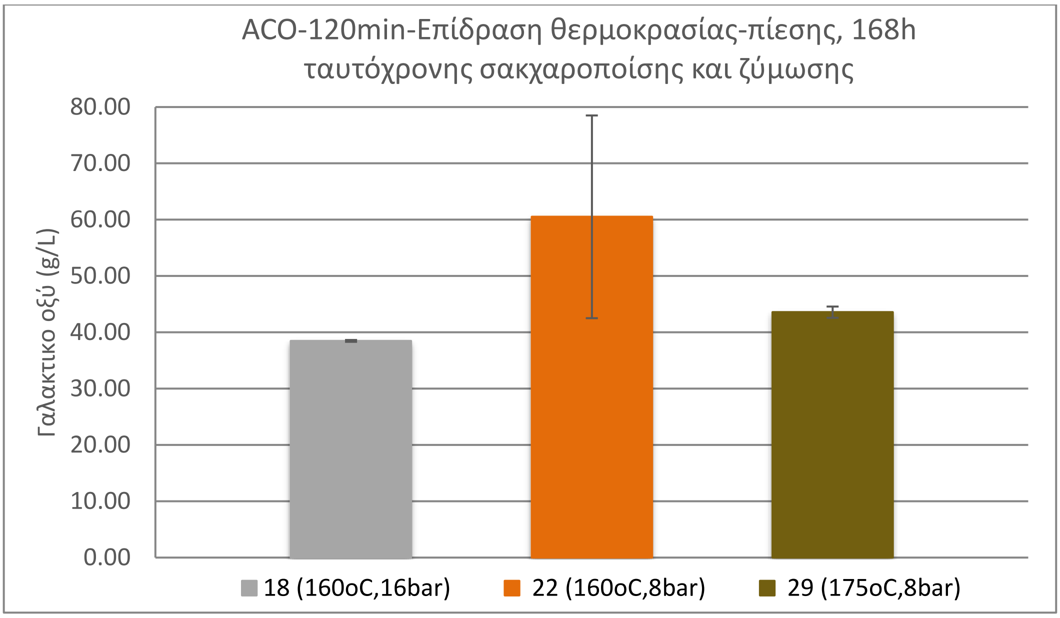
Από το παραπάνω διάγραμμα παρατηρείται ότι η παραγωγή γαλακτικού οξέος από τον *Lactobacillus delbrueckii* ευνοείται περισσότερο στην περίπτωση του τετραϋδροφουράνιου (THF), και λιγότερο στην περίπτωση της ακετόνης (ACO).

Επίδραση των συνθηκών προκατεργασίας στην παραγωγή γαλακτικού οξέος (πίεση-θερμοκρασία-χρόνος)



Διάγραμμα 35: Η παραγωγή γαλακτικού οξέος από τον *Lactobacillus delbrueckii* για 168 ώρες ταυτόχρονης σακχαροποίησης και ζύμωσης, στην περίπτωση του τετραϋδροφουράνιου (THF) για προκατεργασία βιομάζας σε 16bar, για τέσσερις διαφορετικές συνθήκες θερμοκρασίας και χρόνου.

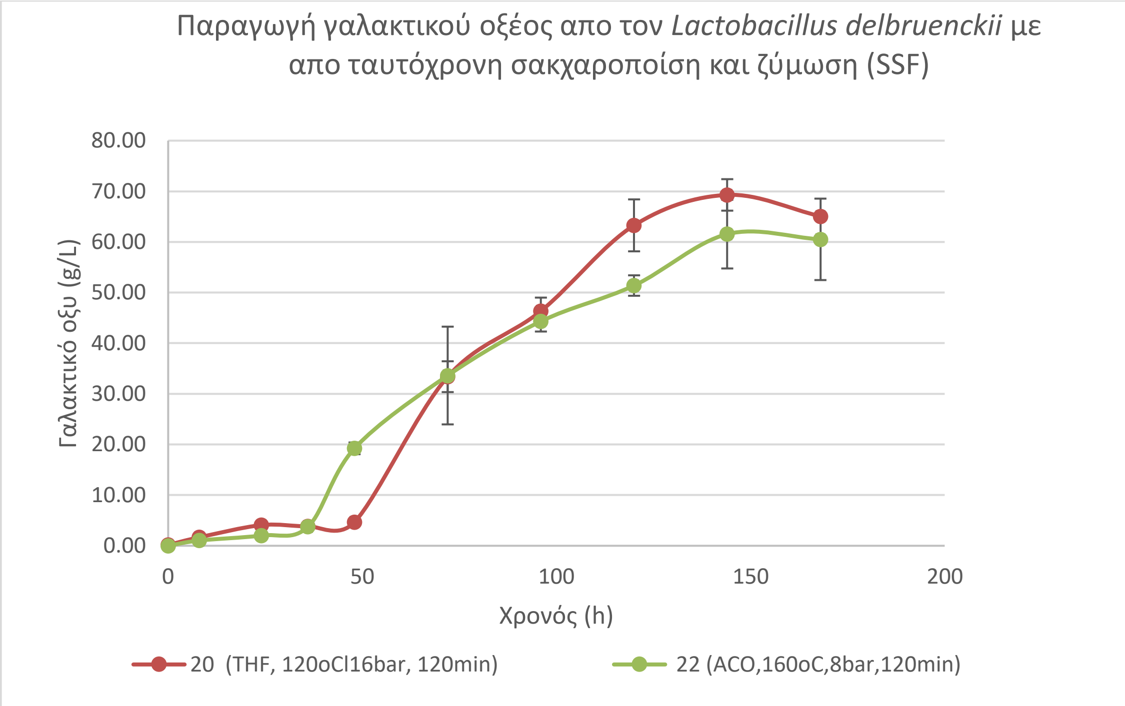
Στην περίπτωση που το τετραϋδροφουράνιο είναι διαλύτης της βιομάζας ,όπως παρατηρείται από το παραπάνω διάγραμμα, ο *Lactobacillus delbrueckii* παράγει περισσότερο γαλακτικό οξύ όταν έχει υπόστρωμα την βιομάζα με προκατεργασία 150˚C και 120 min (No 10) και 160˚C και 120min (No 20). Αρκετά μικρότερη είναι η παραγωγή όταν υπόστρωμα αποτελεί η βιομάζα με προκατεργασία 160˚C και 60 min (No 17) και ακολουθεί αυτή με προκατεργασία 175˚C και 60 λεπτά (No 26).



Διάγραμμα 36: Η παραγωγή γαλακτικού οξέος από τον *Lactobacillus delbrueckii* για 168 ώρες ταυτόχρονης σακχαροποίησης και ζύμωσης, στην περίπτωση της ακετόνης (ACO) για 120min προκατεργασίας, για τρείς διαφορετικές συνθήκες θερμοκρασίας και πίεσης.

Στην περίπτωση που η βιομάζα έχει προκατεργαστεί με ακετόνη, η παραγωγή γαλακτικού οξέος από τον *Lactobacillus delbrueckii* σημειώνει μέγιστο, μετά από 168 ώρες ταυτόχρονης σακχαροποίησης και ζύμωσης, στην περίπτωση της βιομάζας που επεξεργάστηκε με 160˚C και 8bar. Οι άλλες δύο περιπτώσεις σημειώνουν αρκετά χαμηλότερες τιμές.

Καμπύλες παραγωγής γαλακτικού οξέος



Διάγραμμα 37: Η παραγωγή γαλακτικού οξέος από τον *Lactobacillus delbrueckii* για διάστημα 168 ωρών ταυτόχρονης σακχαροποίησης και ζύμωσης, για τις δύο συνθήκες με τα βέλτιστα αποτελέσματα (βιομάζες 20, 22)

Οι καμπύλες παραγωγής γαλακτικού οξέος από τον *Lactobacillus delbrueckii* για τις δύο βιομάζες παρουσιάζουν έντονη ομοιότητα. Μέχρι περίπου τις 48 ώρες η παραγωγή είναι πολύ χαμηλή, ενώ μέχρι τις 144 ώρες υπάρχει ανοδική πορεία στην παραγωγικότητα και έπειτα οι καμπύλες φτάνουν σε πλατό καθορίζοντας την μέγιστη παραγωγή γαλακτικού οξέος.

Απόδοση γαλακτικού οξέος

Πίνακας 8: Απόδοση γαλακτικού οξέος από τον *Lactobacillus delbrueckii* μετά από 168 ώρες ταυτόχρονης σακχαροποίησης και ζύμωσης σε 9% (β/ο) ξηρή βιομάζα και 9mg/g υποστρώματος ενζυμικό φορτίο.

Αριθμός βιομάζας	Κυτταρίνη (%)	Μαννόζη (%)	Γαλακτόζη (%)	Γαλακτικό οξύ (g/L)	Απόδοση (mg/g βιομάζας)	Θεωρητική απόδοση (%)
10	73,09	1,69	0,00	65,16	724,08	87,14 ± 0,89
17	68,99	1,53	0,23	45,54	505,99	64,37 ± 7,71
18	76,63	1,39	0,00	38,47	427,50	49,31 ± 2,61
19	72,96	1,73	0,00	61,70	685,57	82,62 ± 1,12
20	79,13	1,55	0,03	65,07	722,98	80,42 ± 0,56
22	66,77	1,87	0,08	60,51	672,33	88,05 ± 8,94
25	81,28	1,75	0,00	53,70	596,72	64,69 ± 2,99
26	85,28	1,47	0,00	37,21	413,46	42,90 ± 1,49
27	79,74	1,56	0,00	41,80	464,41	51,42 ± 13,12
29	82,30	1,39	0,00	43,58	484,18	52,07 ± 0,31

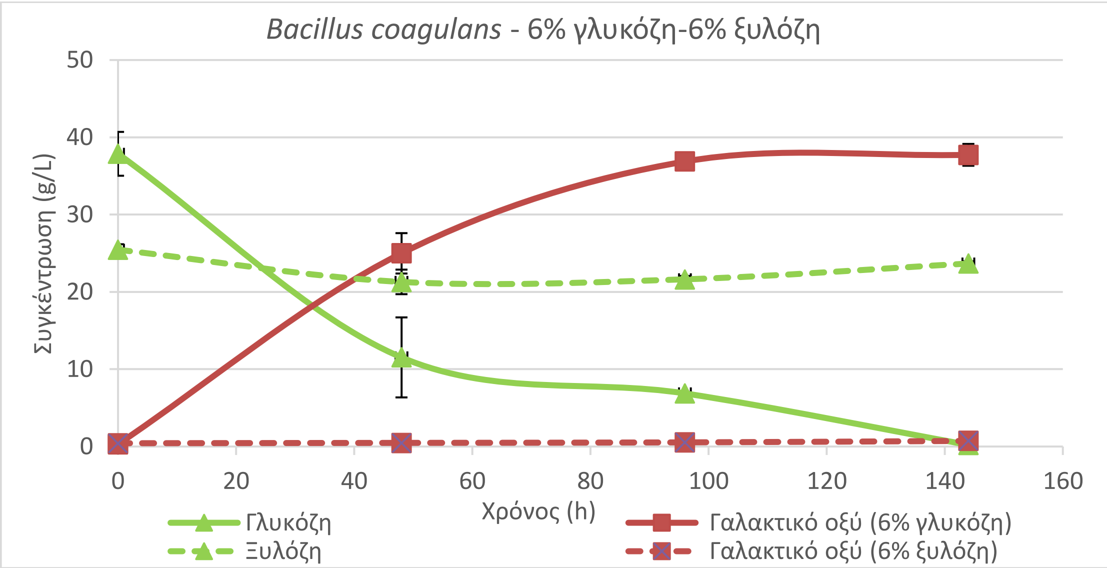
Συμπεράσματα

Από τα παραπάνω παρατηρείται ότι οι βιομάζες που έχουν επεξεργαστεί με τετραϋδροφουράνιο (THF) έχουν καλή απόδοση σε παραγωγή γαλακτικού οξέος. Επίσης σε μεγάλους χρόνους επεξεργασίας της βιομάζας η θερμοκρασία των 160˚C οδηγεί σε αποτελεσματική ζύμωση για πίεση 16 αλλά και 8 bar. Επίσης, όσο αναφορά τα αποτελέσματα του πίνακα 8 φαίνεται πως οι αποδόσεις επί του θεωρητικά παραγόμενου γαλακτικού οξέος σε κάποιες περιπτώσεις είναι πολύ υψηλές περνώντας ακόμα και το 100% απόδοση γεγονός που μας οδηγεί στο συμπέρασμα ότι τα αποτελέσματα συγκέντρωσης γαλακτικού οξέος ίσως είναι υπερεκτιμημένα. Στην βιβλιογραφική μελέτη της αναφοράς [32] με διαφορετικές συνθήκες ζύμωσης παράχθηκε 45,70 g/L, 47,80 g/L και 55,86 g/L γαλακτικό οξύ, για ποσότητα βιομάζας περίπου 1/3 της βιομάζας του παρόντος πειράματος. Συγκρίνοντας με το παρόν πείραμα τα περισσότερα είναι κοντά σε αυτά της βιβλιογραφίας. Στην μελέτη της αναφοράς [37] σημειώθηκε συγκέντρωση γαλακτικού οξέος 81,0 g/L με ζύμωση 162,5 g/L βιομάζας αραβοσίτου, τιμή της οποία είναι μεγαλύτερα από τα αποτελέσματα του παρόντος πειράματος έχοντας βέβαια την διπλάσια ποσότητα βιομάζας. Σε άλλη μελέτη (αναφορά [33]) με στέλεχος του ίδιου είδους λακτοβακίλλων, σημειώθηκε 0,83 g/g βιομάζας απόδοση γαλακτικού οξέος, τιμή που είναι κοντά στα υψηλά αποτελέσματα του πίνακα 8 (στήλη 6). Επιπλέον, από την αναφορά [38] και τον πίνακα 3 παρατηρείται ότι η απόδοση ανά γραμμάριο σακχάρου που προσομοιάζεται περισσότερο στα αποτελέσματα του παρόντος πειράματος είναι εκείνα που αφορούν την προκατεργασμένη βιομάζα, επιβεβαιώνοντας έτσι την σημασία μίας σωστής προκατεργασίας. Τέλος συγκρίνοντας τα αποτελέσματα SSF με εκείνα της ζύμωσης των καθαρών πηγών σακχάρων (πίνακας 7, 8) προκύπτει ότι οι αποδόσεις είναι παραπλήσιες με την μόνη παρατήρηση ότι στην περίπτωση της ζύμωσης καθαρών πηγών άνθρακα όλες οι αποδόσεις είναι άνω του 70%, ενώ στο πείραμα SSF υπάρχουν και δείγματα βιομάζας που έδωσαν χαμηλότερα αποτελέσματα, γεγονός που μπορεί να οφείλεται παρεμποδιστές που προκύπτουν κατά την υδρόλυση της βιομάζας. Παρόλα αυτά, το στέλεχος *Lactobacillus delbrueckii* ATCC 11842 μπορεί και παράγει γαλακτικό οξύ από ταυτόχρονη σακχαροποίηση και ζύμωση βιομάζας με υψηλά ποσοστά επιβεβαιώνοντας την αντοχή του σε παρεμποδιστές αλλά και την σωστή του ανάπτυξη και λειτουργικότητα στις συγκεκριμένες συνθήκες διεξαγωγής του πειράματος.

Αξιοποίηση της προκατεργασμένης βιομάζας οξιάς για την παραγωγή γαλακτικού οξέος με το στέλεχος *Bacillus coagulans*

Καλλιέργειες με καθαρές πηγές σακχάρων

Καλλιέργειες με 6% γλυκόζη και 6% ξυλόζη – Αποτελέσματα Υγρής Χρωματογραφίας (HPLC)



Διάγραμμα 38: Η κατανάλωση των καθαρών πηγών γλυκόζης και ξυλόζης από τον *Bacillus coagulans* και η παραγωγή γαλακτικού οξέος.

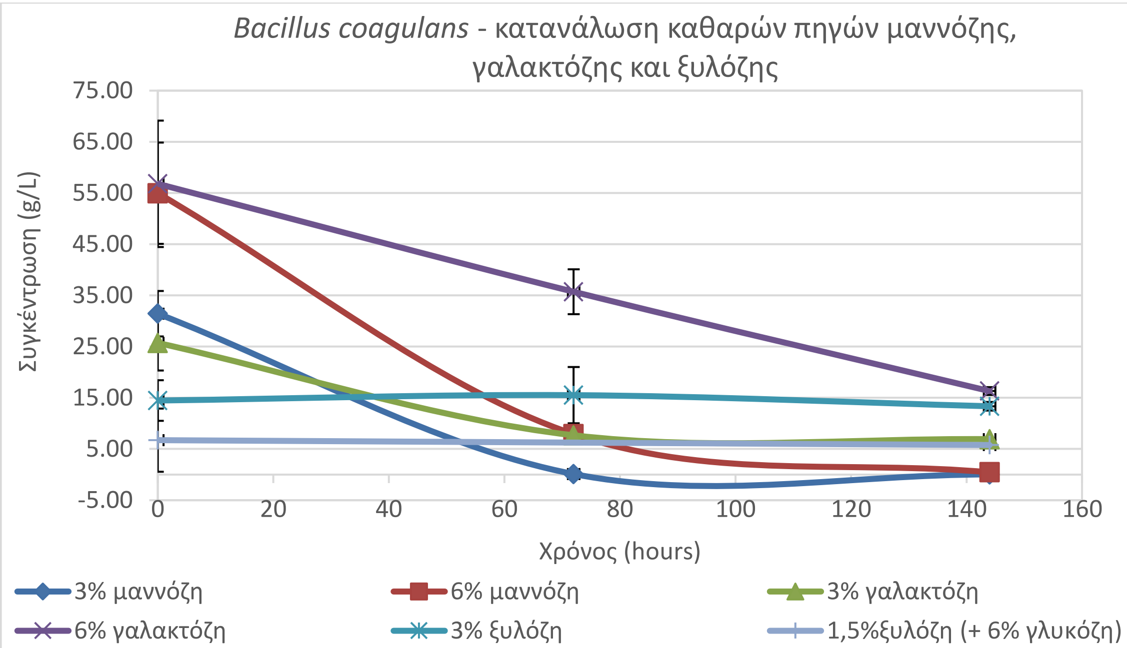
Από το διάγραμμα 38 προκύπτει το συμπέρασμα ότι ο βάκιλος καταναλώνει την γλυκόζη, καθώς η καμπύλη γλυκόζης μειώνεται μέχρι τον μηδενισμό, αλλά δεν καταναλώνει την ξυλόζη, αφού η καμπύλη της ξυλόζης παραμένει στην σχεδόν αρχική της τιμή. Κατά συνέπεια προκύπτει ότι στην περίπτωση του πειράματος με 6% γλυκόζη υπάρχει παραγωγή γαλακτικού οξέος, ενώ με 6% ξυλόζη δεν παράγει.

Πίνακας 9: Απόδοση γαλακτικού οξέος μετά από 144 ώρες ζύμωση με καθαρή πηγή γλυκόζης.

Καθαρή πηγή σακχάρου	Συγκέντρωση σακχάρου που καταναλώθηκε (g/L)	Συγκέντρωση γαλακτικού οξέος (g/L)	Απόδοση (mg /g σακχάρου)	Απόδοση επί του θεωρητικού (%)
Γλυκόζη	53,84 ± 2,62	37,44 ± 1,41	695,44 ± 65,58	69,54 ± 4,51

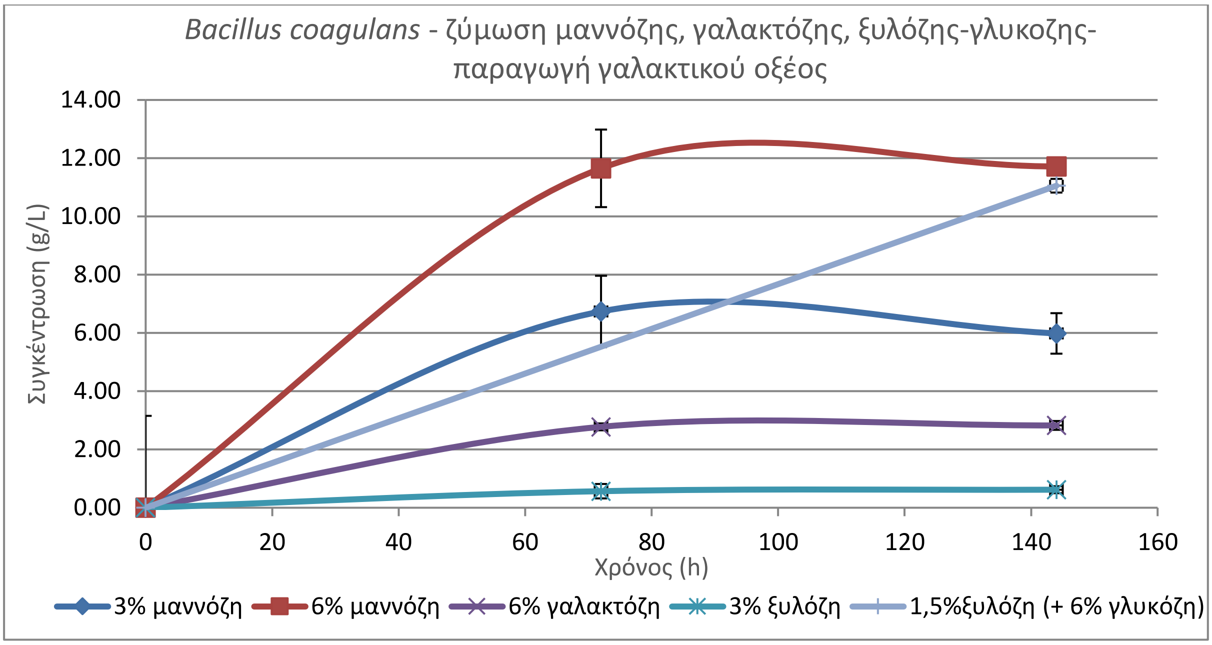
Από τον πίνακα 9 φαίνεται συγκρίνοντας τις αποδόσεις ανά γραμμάριο σακχάρου και επί του θεωρητικά παραγόμενου γαλακτικού, ότι η ζύμωση με γλυκόζη αποτελεί αποδοτική διεργασία.

Καλλιέργειες με 3% και 6% μαννόζη, 3% και 6% γαλακτόζη, 3% ξυλόζη, 1,5% ξυλόζη παρουσία 6% γλυκόζης – Αποτελέσματα Υγρής Χρωματογραφίας (HPLC)



Διάγραμμα 39: Η κατανάλωση των καθαρών πηγών μαννόζης, γαλακτόζης και ξυλόζης από τον *Bacillus coagulans*.

Στο διάγραμμα 39 φαίνεται πως *ο Bacillus coagulans* καταναλώνει σχεδόν ολοκληρωτικά το 3% και 6% μαννόζης και 3% γαλακτόζης μέχρι τις 72 ώρες, ενώ το 6% γαλακτόζης μειώνεται σταδιακά και δεν έχει καταναλωθεί πλήρως έως τις 144 ώρες. Η ξυλόζη δεν καταναλώνεται ούτε ως μοναδική πηγή άνθρακα, ούτε με την παρουσία γλυκόζης. Ο λόγος που επιλέχθηκε αυτό το ποσοστό στον συνδυασμό γλυκόζης – ξυλόζης, είναι για να προσομοιάζει την περιεκτικότητα γλυκάνης - ξυλάνης στην λιγνοκυτταρινούχα βιομάζας, που όπως βρέθηκε από μελέτη (αναφορά [42]) είναι 40,6% γλυκάνη και 7,8% ξυλάνη για βιομάζα πεύκου, σύσταση που πλησιάζει αυτή του πειράματος.



Διάγραμμα 40: Παραγωγή γαλακτικού οξέος με καθαρές πηγές μαννόζης, γαλακτόζης και ξυλόζης παρουσία γλυκόζης από τον *Bacillus coagulans*.

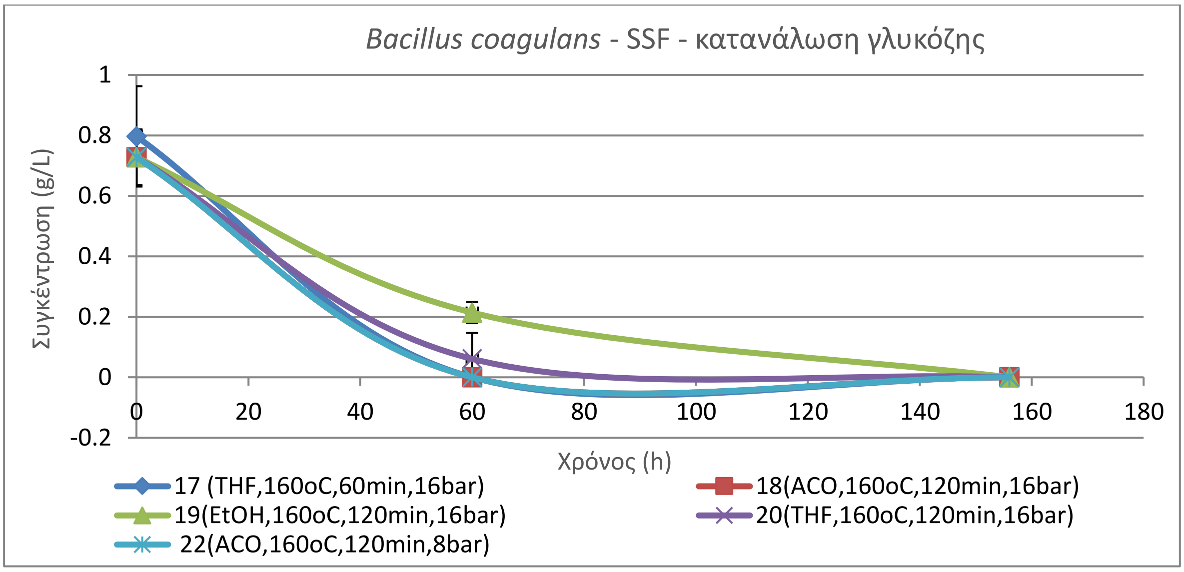
Το παραπάνω διάγραμμα απεικονίζει την παραγωγή γαλακτικού οξέος από τον *Bacillus coagulans*. Η παραγωγή φαίνεται να σταματάει μετά τις 72 ώρες και στις 144 ώρες η συγκέντρωση γαλακτικού παραμένει περίπου στα ίδια επίπεδα για τους περισσότερους συνδυασμούς. Στον συνδυασμός 1,5% ξυλόζη και 6% γλυκόζη δεν μετρήθηκε γαλακτικό οξύ σε ενδιάμεσο χρόνο, οπότε έχουμε πληροφορίες μονό για την τελική συγκέντρωση μετά από 144 ώρες ζύμωσης. Επίσης, από το διάγραμμα αφαιρέθηκε η καμπύλη με 3% γαλακτόζη καθώς εκτιμήθηκε ότι τα αποτελέσματά της ήταν υπερεκτιμημένα και συγκριτικά εκείνα των υπόλοιπων συνθηκών πολύ υψηλότερα.

Πίνακας 10: Απόδοση γαλακτικού οξέος μετά από ζύμωση με καθαρές πηγές σακχάρων.

Καθαρή πηγή σακχάρου	Συγκέντρωση σακχάρου που καταναλώθηκε (g/L)	Συγκέντρωση γαλακτικού οξέος (g/L)	Απόδοση (mg /g σακχάρου)	Απόδοση επί του θεωρητικού (%)
Μαννόζη	31,39 ± 4,44	5,98 ± 0,69	190,63 ± 34,89	19.06 ± 3,49
Μαννόζη	54,52 ± 9,89	11,72 ± 0,23	214,92 ± 39,22	21,49 ± 3,92
Γαλακτόζη	40,48 ± 12,37	2,83 ± 0,15	69,82 ± 21,66	6,98 ± 2,17
Ξυλόζη/Γλυκόζη	38,46 ± 6,18	5,78 ± 1,26	150,29 ± 40,71	15,03 ± 4,07

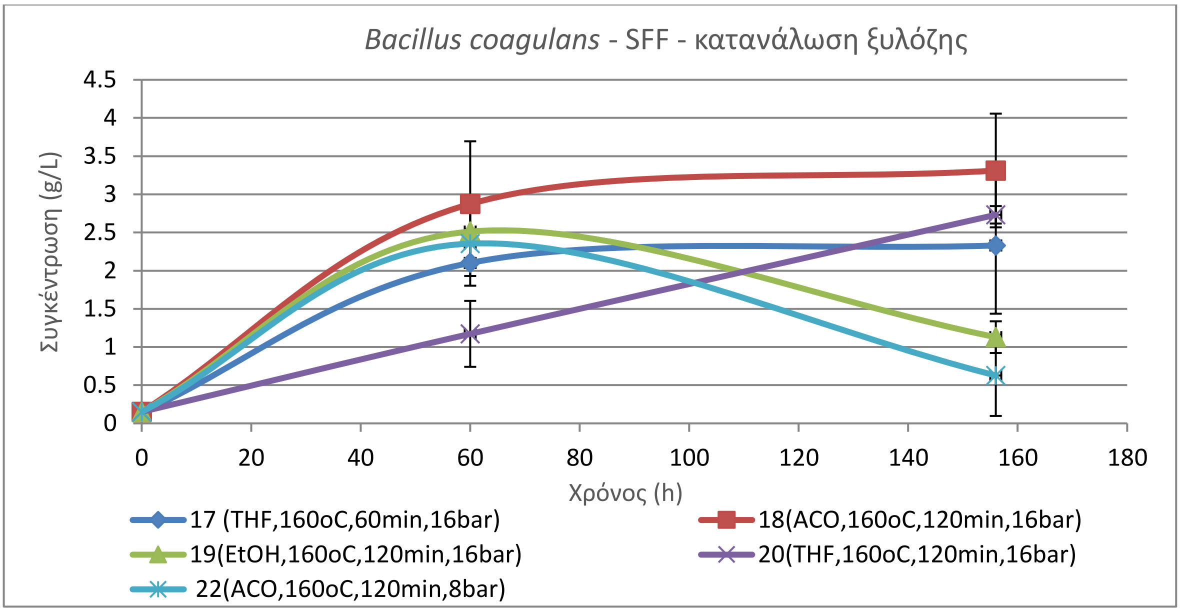
Για της συνθήκες 3% και 6% μαννόζη, οι αποδόσεις ανά γραμμάριο σακχάρου αλλά και επί του θεωρητικά παραγόμενου γαλακτικού, είναι παρόμοιες και για τον συνδυασμό ξυλόζης και γλυκόζης λίγο χαμηλότερες. Λιγότερη ποσότητα ανά γραμμάριο σακχάρου παράγεται όταν η καθαρή πηγή είναι 6% γαλακτόζη και επόμενος και η απόδοση είναι χαμηλή.

Καλλιέργειες με προκατεργασμένη λιγνοκυτταρινούχα βιομάζα οξιάς απουσία ενζύμου – Αποτελέσματα Υγρής Χρωματογραφίας (HPLC)



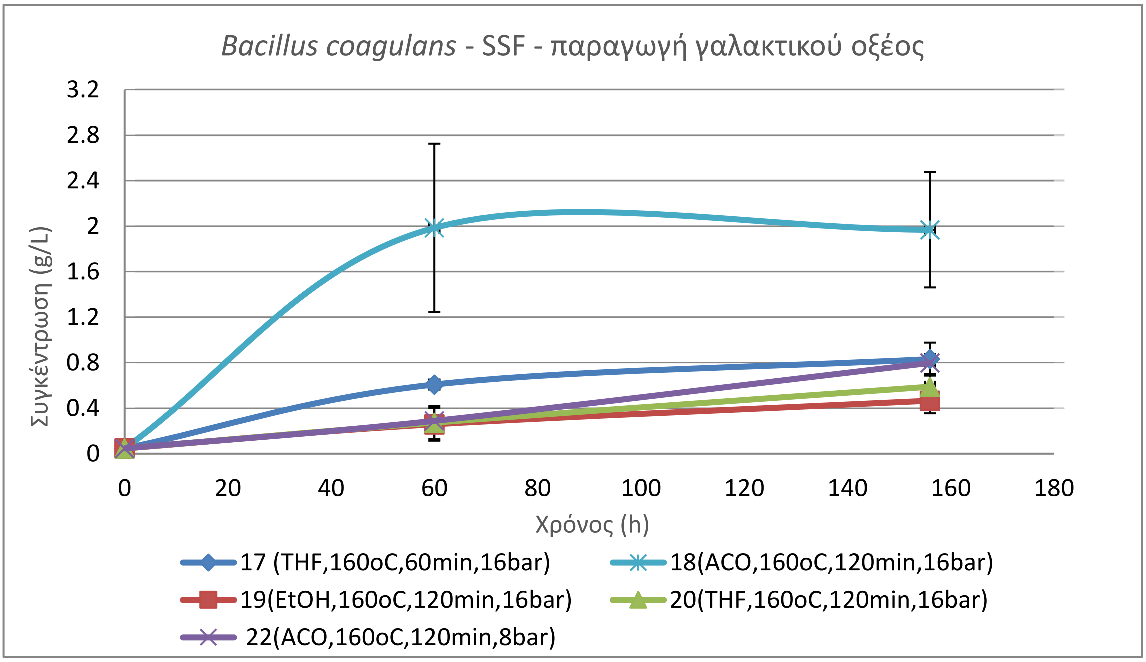
Διάγραμμα 41 : Συγκέντρωση γλυκόζης στην ταυτόχρονη σακχαροποίηση και ζύμωση από τον *Bacillus coagulans*.

Στο διάγραμμα 41 απεικονίζεται η συγκέντρωση γλυκόζης κατά την διάρκεια της ταυτόχρονης σακχαροποίηση και ζύμωση από τον *Bacillus coagulans*. Τα χαμηλά επίπεδα γλυκόζης, για τα περισσότερα δείγματα βιομάζας, καταναλώνονται από τον μικροοργανισμό μέχρι τις 60 ώρες, εκτός από το δείγμα 19 (EtOH,160˚C,120min,16bar) που καταναλώνεται στις 160 ώρες.



Διάγραμμα 42 : Συγκέντρωση ξυλόζης στην ταυτόχρονη σακχαροποίηση και ζύμωση από τον *Bacillus coagulans*.

Στο διάγραμμα 42 απεικονίζεται η συγκέντρωση ξυλόζης κατά την διάρκεια της ταυτόχρονης σακχαροποίηση και ζυμωση από τον *Bacillus coagulans*. Σε όλα τα δείγματα υπάρχει παραγωγή ξυλόζης, εφόσον η ξυλόζη παράγεται από την ενζυμική υδρόλυση, όμως δεν καταναλώνεται και συνεπώς συσσωρεύεται.



Διάγραμμα 43 : Παραγωγή γαλακτικού οξέος στην ταυτόχρονη σακχαροποίηση και ζύμωση από τον *Bacillus coagulans*.

Στο διάγραμμα 43 παρουσιάζεται η παραγωγή γαλακτικού οξέος κατά την διάρκεια της ταυτόχρονης σακχαροποίηση και ζύμωση από τον *Bacillus coagulans*. Για όλα τα δείγματα βιομάζας η παραγωγικότητα είναι σταθερή σε όλο το διάστημα των 160 ωρών και η τελική συγκέντρωση είναι αρκετά χαμηλή. Από αυτή την εικόνα διαφοροποιείται το δείγμα 17(THF,160˚C,60min,16bar), όπου η παραγωγηκότητα είναι αρκετά υψηλή εώς και τις 60 ώρες, ενώ στις 160 ώρες η τιμή της συγκέντρωσης γαλακτηκού οξέος έχει παραμείνει σχεδόν ίδια.

Πίνακας 11: Απόδοση γαλακτικού οξέος και οξικού οξέος στην ταυτόχρονη σακχαροποίηση και ζύμωση *με* τον *Bacillus coagulans* απουσία ενζύμου.

Αριθμός δείγματος βιομάζας	Γαλακτικό οξύ (mg/g βιομάζας)	Οξικό οξύ (mg/g βιομάζας)
17	8,73 ± 1,62	0,71 ± 0,03
19	21,35 ± 5,63	1,34 ± 0,48
18	4,66 ± 1,13	0,70 ± 0,05
20	6,02 ± 0,62	0,37 ± 0,04
22	8,34 ± 0,09	0,57 ± 0,13

Στο πίνακα 11 φαίνεται πως οι καλλιέργειες του *Bacillus coagulans* απουσία ενζύμου δεν ήταν ιδιαίτερα αποδοτικές, καθώς οι τιμές της απόδοσης για το γαλακτικό οξύ είναι πολύ χαμηλές. Στο πείραμα ταυτόχρονης σακχαροποίησης και ζύμωσης εκτός από γαλακτικό οξύ ανιχνεύθηκε και ποσότητα οξικού οξέος με απόδοση όμως ακόμα μικρότερη εκείνης του γαλακτικού. Καλύτερα αποτελέσματα σε απόδοση γαλακτικού και οξικού οξέος έδωσε το δείγμα 19(EtOH,160˚C,120min,16bar), ξεχωρίζοντας από τα υπόλοιπα με τουλάχιστον διπλάσια απόδοση.

Αποτελέσματα

Συγκρίνοντας τα αποτελέσματα από τις ζυμώσεις του *Bacillus coagulans* με καθαρή πηγή άνθρακα 6% γλυκόζη (πίνακας 9), με πείραμα της βιβλιογραφίας που αναφέρθηκε παραπάνω [38], παρατηρούμε ότι στο παρόν πείραμα οι αποδόσεις της ζύμωση των σακχάρων είναι πολύ διαφορετικές, παρόλο που αποτελούν διαφορετικά στελέχη του ίδιου είδους. Συγκρίνοντας τώρα με τα αποτελέσματα του πίνακα 10 και πάλι παρατηρείται ότι κανένας συνδυασμός σακχάρων του παρόντος πειράματος δεν πλησιάζει την απόδοση σε γαλακτικό οξύ της βιβλιογραφικής μελέτης. Ο ρυθμός κατανάλωσης των σακχάρων στο πείραμα ζύμωσης 6% γλυκόζης ήταν ταχύτερος τις πρώτες 48 ώρες (0,65 g/L/h) ενώ συγκριτικά με τα αντίστοιχα αποτελέσματα του βιβλιογραφικού πειράματος (αναφορά [38]) είναι πολύ μικρότερα, επιβεβαιώνοντας την δυσκολία του στελέχους ATCC 7050 να καταναλώσει σάκχαρα. Για την μέση παραγωγικότητα γαλακτικού οξέος στην περίπτωση ζύμωσης της γλυκόζης παρατηρείται ότι είναι περίπου στο ¼ εκείνης του βιβλιογραφικού πειράματος για την γλυκόζη. Οι διαφορές αυτές μπορεί να οφείλονται στην συμπεριφορά που κάθε στελέχους αλλά και στις διαφορετικές συνθήκες διεξαγωγής των πειραμάτων, όπως ότι το πείραμα της βιβλιογραφίας διεξάχθηκε σε βιοαντιδραστήρα, ενώ το παρόν πείραμα σε αναδευόμενες φιάλες.

Από την ταυτόχρονη σακχαροποίηση και ζύμωση απουσία ενζύμου με τον *Bacillus coagulans* συμπεραίνεται ότι το στέλεχος έχει την ικανότητα να παράγει κυτταρινολυτικά ένζυμα αποικοδομώντας την βιομάζα για χρησιμοποιήσει τα σάκχαρα και να παράγει γαλακτικό αλλά και οξικό οξύ. Η ζύμωση με καθαρές πηγές σακχάρων απέδωσαν καλύτερα αποτελέσματα από την ταυτόχρονη σακχαροποίηση και ζύμωση της βιομάζας απουσία ενζύμου. Το ίδιο φαινόμενο παρατηρείται και στην μελέτη που αναφέρθηκε παραπάνω και τα αποτελέσματα τις οποίας φαίνονται στον πίνακα 3. Το γεγονός αυτό πιθανώς αποδίδεται στους παρεμποδιστές που δημιουργούνται κατά την υδρόλυση του υποστρώματος βιομάζας. Συγκρίνοντας τον πίνακα 3 με τον πίνακα 11 φαίνεται πως και πάλι η απόδοση σε παραγωγή γαλακτικού οξέος του παρόντος πειράματος είναι εξαιρετικά μικρή, στις περισσότερες περιπτώσεις υποδεκαπλάσια. Ομοίως και για τις συγκεντρώσεις οξικού οξέος. Το γεγονός αυτό και πάλι αποδίδεται στις συνθήκες πειράματος και στην ανθεκτικότητα του κάθε στελέχους απέναντι στους παρεμποδιστές, αλλά κυρίως στο γεγονός ότι στο βιβλιογραφικό πείραμα η ταυτόχρονη σακχαροποίηση και ζύμωση γίνεται παρουσία ενζύμου βοηθώντας έτσι την υδρόλυση της βιομάζας προς διαθέσιμες πηγές άνθρακα. Τέλος, στην αναφορά [1] που περιγράφεται παραπάνω επιβεβαιώνεται η ικανότητα δράσεις στελέχους του *Bacillus coagulans* απουσία εξωγενούς προσθήκης β-γλυκοζιδάσης αλλά με την προσθήκη κυτταρινάσης, συνεπώς μπορεί να υποτεθεί πως προσθήκη κυτταρινασών στο παρόν πείραμα θα μπορούσε να ευνοήσει το στέλεχος του βακτηρίου για να δράσει περισσότερο αποδοτικά προς την παραγωγή γαλακτικού οξέος.

Συμπεράσματα

- Οι συνθήκες προκατεργασίας βιομάζας επηρεάζουν αρκετά τα αποτελέσματα ενζυμικής υδρόλυσης ως προς την μετατροπή της κυτταρίνης σε γλυκόζη.
- Η αύξηση ποσοστού ξηρής βιομάζας χωρίς την αύξηση του ενζυμικού φορτίου μπορεί να μειώσει την αποδοτικότητα της υδρόλυσης.
- Η αύξηση του ενζυμικού φορτίου επιδρά θετικά στην διεργασία της ενζυμικής υδρόλυσης.
- Υπό συγκεκριμένες συνθήκες η ταυτόχρονη σακχαροποίηση και ζύμωση (SSF) και η διακριτή σακχαροποίηση και ζύμωση (SHF) με τον *Lactobacillus delbrueckii subsp. Bulgaricus* ATCC® 11842 είναι εξίσου αποδοτικές.
- Ο *Lactobacillus delbrueckii subsp. Bulgaricus* ATCC® 11842 επιβεβαιώθηκε ότι ζυμώνει γλυκόζη, μαννόζη και γαλακτόζη σε διάφορα ποσοστά προς παραγωγή γαλακτικού οξέος.
- Η ταυτόχρονη σακχαροποίηση και ζύμωση (SSF) από τον *Lactobacillus delbrueckii subsp. Bulgaricus* ATCC® 11842 σε προκατεργασμένη λιγνοκυτταρινούχα βιομάζα, έδωσε διαφορετικά αποτελέσματα για τις διαφορετικές συνθήκες προκατεργασίας, με μεγάλες όμως αποδόσεις.

- Ο *Bacillus coagulans* ATCC® 7050 καταναλώνει με μεγάλο ρυθμό την γλυκόζη προς παραγωγή γαλακτικού οξέος σε ικανοποιητικά ποσοστά, ενώ δεν καταναλώνει καθόλου ξυλόζη. Επίσης, καταναλώνει μαννόζη και γαλακτόζη δίνοντας όμως μικρότερες αποδόσεις γαλακτικού οξέος.

- Η ταυτόχρονη σακχαροποίηση και ζύμωση (SSF) από τον *Bacillus coagulans* ATCC® 7050, με προκατεργασμένη λιγνοκυτταρινούχα βιομάζα, απουσία ενζύμου, είχε ως αποτέλεσμα πολύ μικρή παραγωγή γαλακτικού οξέος, με αποδόσεις πολύ μικρές συγκριτικά με την βιβλιογραφία, συμπεραίνοντας ότι παράγει κυτταρινολυτικά ένζυμα ικανά να συμμετέχουν στην υδρόλυση της βιομάζας αλλά ανεπαρκή για μια αποδοτική ζύμωση.

Προτάσεις για μελλοντική έρευνα

- Διεξαγωγή ενζυμικής υδρόλυσης με περισσότερους συνδυασμούς ποσοστού ξηρής βιομάζας και ενζυμικού φορτιού προκειμένου να βρεθεί ο πιο αποδοτικός συνδυασμός και οικονομικά επωφελής.
- Διεξαγωγή ταυτόχρονης σακχαροποίησης και ζύμωσης με τα παραπάνω βακτήρια σε διαφορετικούς συνδυασμούς θερμοκρασίας και pH, ώστε να εξεταστεί η δυνατότητα εκτέλεσης των πειραμάτων σε μη αποστειρωμένες συνθήκες.
- Ταυτοποίηση των παρεμποδιστών που δημιουργούνται από την ενζυμική υδρόλυση και εφαρμογή μεθόδων που αναφέρθηκαν παραπάνω για την αποτοξικοποίηση των υδρολυμάτων.
- Εφαρμογή και άλλον μεθόδων ζύμωσης (πίνακας 4).
- Ταυτόχρονης σακχαροποίησης και ζύμωσης με τον *Bacillus coagulans* ATCC® 7050 με διαφορετικά ένζυμα σε διαφορετικές συγκεντρώσεις με σκοπό την επίτευξη μίας αποδοτικής διεργασίας με όσο το δυνατών λιγότερη χρήση ενζύμου.
- Οικονομική μελέτη του κόστους διεργασίας με σκοπό την επίτευξη μίας αποδοτικής διεργασίας στα πλαίσια της κυκλικής οικονομίας.

Παράρτημα

ΣΥΝΘΗΚΕΣ ΠΡΟΚΑΤΕΡΓΑΣΙΑΣ ΤΗΣ ΛΙΓΝΟΚΥΤΤΑΡΙΝΟΥΧΑΣ ΒΙΟΜΑΖΑΣ

Αριθμός δείγματος βιομάζας	Διαλύτης	Ποσοστό διαλύτη	Αέριο	Αρχική πίεση (bar)	Θερμοκρασία (°C)	Χρόνος αντίδρασης (min)
1	H_2O/ACO	(50/50%)	O_2	16	130	240
2	H_2O/THF	(50/50%)	O_2	16	130	240
3	H_2O/ACO	(50/50%)	O_2	16	150	60
4	H_2O/EtOH	(50/50%)	O_2	16	150	60
5	H_2O/THF	(50/50%)	O_2	16	150	60
6	H_2O/ACO	(50/50%)	O_2	16	150	60
7	H_2O/ACO	(50/50%)	O_2	16	150	120
8	H_2O/ACO	(50/50%)	O_2	16	150	120
9	H_2O/ACO	(25/75%)	O_2	16	150	120
10	H_2O/THF	(50/50%)	O_2	16	150	120
11	H_2O/EtOH	(50/50%)	O_2	16	150	120
12	H_2O/ACO	(50/50%)	O_2	8	150	120
13	H_2O/THF	(50/50%)	O_2	8	150	120
14	H_2O/ACO	(50/50%)	O_2	16	160	60
15	H_2O/ACO	(50/50%)	O_2	16	160	60
16	H_2O/EtOH	(50/50%)	O_2	16	160	60
17	H_2O/THF	(50/50%)	O_2	16	160	60
18	H_2O/ACO	(50/50%)	O_2	16	160	120
19	H_2O/EtOH	(50/50%)	O_2	16	160	120
20	H_2O/THF	(50/50%)	O_2	8	160	120
21	H_2O/THF	(50/50%)	O_2	8	160	120
22	H_2O/ACO	(50/50%)	O_2	16	160	120
23	H_2O/ACO	(50/50%)	O_2	16	175	60
24	H_2O/ACO	(50/50%)	O_2	16	175	60
25	H_2O/EtOH	(50/50%)	O_2	16	175	60
26	H_2O/THF	(50/50%)	O_2	16	175	60
27	H_2O/ACO	(50/50%)	O_2	16	175	30
28	H_2O/ACO	(50/50%)	O_2	16	175	120
29	H_2O/ACO	(50/50%)	O_2	8	175	120
30	H_2O/ACO	(10/90%)	O_2	16	175	120

ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΑ ΔΕΔΟΜΕΝΑ ΕΝΖΥΜΙΚΗΣ ΥΔΡΟΛΥΣΗΣ 9% DM, ΕΝΖΥΜΙΚΟ ΦΟΡΤΙΟ 9mg/g DM

	γλυκόζη (g/L)				*Τυπική απόκλιση*			
#	**8h**	**24h**	**48h**	**72h**	**8h**	**24h**	**48h**	**72h**
1	5.79	8.64	9.08	**9.78**	0.51	1.40	1.08	1.46
2	10.75	19.67	21.30	**22.81**	0.37	0.55	2.78	0.19
3	11.74	18.07	23.51	**25.32**	1.53	2.43	1.36	1.28
4	9.60	13.97	16.65	**17.11**	0.48	1.57	1.12	1.98
5	14.99	24.15	26.89	**38.06**	0.51	1.45	3.72	2.85
6	8.22	12.25	13.39	**14.84**	0.93	1.62	2.00	2.07
7	17.49	27.67	31.49	**38.12**	1.66	2.53	5.62	2.67
8	20.89	28.58	33.52	**38.12**	2.49	2.58	4.85	3.56
9	6.52	9.66	14.49	**13.79**	0.31	1.32	0.90	2.28
10	26.20	37.80	56.92	**63.55**	2.59	4.48	2.44	3.52
11	14.16	27.47	34.45	**35.21**	0.61	0.87	4.06	2.36
12	9.88	16.33	24.27	**25.43**	1.20	0.49	0.79	0.94
13	10.88	19.47	23.80	**32.07**	0.83	2.82	3.98	3.86
14	14.14	25.38	29.57	**30.44**	1.01	1.14	0.38	0.12
15	12.54	26.54	32.24	**33.23**	1.55	0.87	2.03	2.15
16	13.55	21.97	28.69	**29.97**	0.66	1.24	1.92	2.68
17	19.57	33.79	48.66	**52.73**	2.53	1.52	2.14	4.56
18	24.05	46.30	58.20	**61.69**	2.79	3.74	3.30	1.56
19	24.92	46.73	55.76	**62.39**	1.61	4.87	3.45	3.77
20	19.57	33.66	48.76	**61.75**	0.95	1.88	5.82	5.21
21	10.71	21.10	26.19	**44.12**	0.74	0.86	3.24	2.15
22	13.28	26.01	34.40	**50.34**	0.63	0.80	4.60	2.17
23	26.95	42.01	52.26	**56.98**	0.81	2.11	2.42	2.16
24	26.31	43.97	50.37	**57.27**	0.55	0.69	2.99	3.33
25	27.07	44.22	55.69	**65.13**	1.17	1.01	4.35	3.99
26	22.24	44.48	54.59	**63.73**	1.63	5.06	1.03	3.14
27	23.02	42.70	50.57	**64.49**	0.69	2.96	2.26	4.82
28	31.09	48.16	57.73	**58.26**	1.88	2.60	2.10	2.34
29	31.53	51.59	60.59	**64.08**	1.20	2.96	0.72	2.49
30	12.12	21.36	21.24	**25.90**	1.18	1.73	2.76	2.96

	% μετατροπή κυτταρίνης				Τυπική απόκλιση			
#	**8h**	**24h**	**48h**	**72h**	**8h**	**24h**	**48h**	**72h**
1	11.41	17.03	17.89	**19.26**	1.00	2.75	2.12	2.88
2	20.75	37.97	41.11	**44.03**	0.72	1.05	5.37	0.37
3	20.42	31.42	40.88	**44.02**	2.66	4.23	2.36	2.23
4	18.70	27.20	32.41	**33.32**	0.94	3.05	2.17	3.86
5	24.81	39.99	44.52	**63.02**	0.84	2.40	6.16	4.73
6	15.17	22.60	24.70	**27.38**	1.71	2.99	3.69	3.82
7	27.31	43.22	49.17	**59.53**	2.60	3.94	8.78	4.17
8	33.31	45.55	53.44	**60.77**	3.97	4.11	7.74	5.67
9	12.42	18.41	27.61	**26.28**	0.59	2.52	1.71	4.34
10	35.86	51.72	77.88	**86.96**	3.54	6.14	3.34	4.81
11	24.96	48.44	60.75	**62.08**	1.08	1.54	7.16	4.16
12	18.79	31.06	46.17	**48.38**	2.29	0.93	1.51	1.79
13	19.23	34.40	42.06	**56.66**	1.47	4.99	7.03	6.82
14	22.31	40.03	46.64	**48.02**	1.60	1.80	0.60	0.18
15	20.15	42.64	51.81	**53.40**	2.49	1.39	3.27	3.45
16	23.87	38.72	50.56	**52.82**	1.16	2.19	3.39	4.73
17	28.37	48.98	70.53	**76.44**	3.67	2.20	3.11	6.60
18	32.96	63.46	79.78	**84.56**	3.82	5.12	4.52	2.13
19	28.95	54.28	64.76	**72.46**	1.87	5.66	4.00	4.38
20	24.73	42.54	61.62	**78.04**	1.20	2.38	7.35	6.58
21	16.42	32.34	40.12	**67.60**	1.13	1.32	4.96	3.30
22	19.89	38.96	51.52	**75.41**	0.94	1.20	6.88	3.25
23	31.55	49.19	61.20	**66.72**	0.95	2.47	2.84	2.53
24	30.61	51.16	58.61	**66.63**	0.65	0.80	3.48	3.87
25	33.31	54.42	68.53	**80.13**	1.44	1.25	5.36	4.91
26	26.09	52.17	64.01	**74.74**	1.92	5.94	1.21	3.68
27	28.87	53.56	63.42	**80.88**	0.87	3.71	2.83	6.04
28	36.11	55.93	67.05	**67.66**	2.18	3.02	2.44	2.72
29	38.31	62.70	73.62	**77.87**	1.46	3.59	0.88	3.02
30	19.67	34.67	34.48	**42.04**	1.92	2.80	4.49	4.80

		Ολικά σακχαρα (g/L)				*Τυπική απόκληση*			
#	***0***	**8h**	**24h**	**48h**	**72h**	**8h**	**24h**	**48h**	**72h**
3	0	19.05	24.29	27.48	**33.59**	1.50	0.94	0.19	1.88
4	0	14.74	18.19	22.30	**26.95**	0.47	0.19	2.44	2.63
5	0	18.92	31.86	41.55	**61.20**	3.29	0.00	5.82	7.70
6	0	12.08	17.26	21.11	**26.42**	0.56	2.82	1.50	0.19
7	0	26.55	45.80	48.98	**53.10**	3.29	3.19	5.82	7.70
10	0	30.20	38.10	64.12	**78.32**	0.47	0.94	0.56	1.88
11	0	22.97	39.69	41.95	**47.39**	0.00	2.07	6.76	0.56
12	0	16.33	25.22	26.55	**27.21**	5.07	2.25	5.44	5.63
13	0	19.91	35.44	31.20	**45.53**	0.66	3.19	4.32	2.82
14	0	19.56	28.90	37.67	**39.84**	1.78	0.94	0.56	1.88
15	0	24.46	33.54	39.22	**47.58**	0.00	2.07	9.20	0.56
16	0	18.21	26.73	35.09	**40.04**	0.38	0.75	3.75	0.94
17	0	23.43	39.63	52.12	**63.88**	0.56	5.07	18.59	5.44
18	0	25.23	55.01	70.69	**76.37**	0.66	1.17	6.86	2.92
19	0	30.24	55.11	63.36	**72.55**	3.94	3.94	4.38	1.31
20	0	19.12	50.88	59.24	**78.54**	1.39	2.48	2.34	1.46
21	0	12.04	31.76	47.27	**65.64**	1.61	2.63	0.15	6.28
22	0	15.88	39.84	52.84	**73.07**	1.24	0.44	3.94	1.46
23	0	28.08	51.36	61.61	**75.75**	3.39	5.66	1.61	0.88
24	0	29.48	55.60	72.96	**77.61**	1.70	3.17	0.29	5.98
25	0	31.00	62.56	74.10	**86.28**	0.62	0.79	4.96	4.67
26	0	24.99	45.67	59.55	**72.03**	4.47	1.36	0.58	2.92
27	0	30.72	55.28	71.62	**84.62**	3.39	5.66	2.48	0.88
28	0	31.99	48.92	58.00	**61.61**	5.15	4.41	8.03	4.09

ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΑ ΔΕΔΟΜΕΝΑ ΕΝΖΥΜΙΚΗΣ ΥΔΡΟΛΥΣΗΣ 9%,12%,15% DM, ΕΝΖΥΜΙΚΟ ΦΟΡΤΙΟ 9mg/g DM

	γλυκόζη (g/L)			*Τυπική απόκλιση*		
	9% DM, 9mg/g	*12% DM, 9mg/g*	*15% DM, 9mg/g*	*9% DM, 9mg/g*	*12% DM, 9mg/g*	*15% DM, 9mg/g*
#	**8h**	**8h**	**8h**	**8h**	**8h**	**8h**
10	26.20	25.17	31.25	2.59	2.30	4.52
17	19.57	22.97	28.46	2.53	3.16	2.94
18	24.05	37.13	46.96	2.79	0.98	4.00
19	**24.92**	30.75	31.91	1.61	1.35	1.78
20	19.57	28.21	32.53	0.95	2.56	2.02
22	13.28	22.44	25.14	0.63	8.11	1.60
25	27.07	40.83	45.98	1.17	2.48	6.60
26	22.24	33.17	42.51	1.63	2.34	3.96
27	23.02	35.50	40.91	0.69	2.20	1.72
29	31.53	40.78	36.28	1.20	0.77	1.72

	γλυκόζη(g/L)			*Τυπική απόκλιση*		
	9% DM, 9mg/g	*12% DM, 9mg/g*	*15% DM, 9mg/g*	*9% DM, 9mg/g*	*12% DM, 9mg/g*	*15% DM, 9mg/g*
#	**24h**	**24h**	**24h**	**24h**	**24h**	**24h**
10	37.80	43.82	48.68	4.48	0.56	1.81
17	33.79	45.94	56.64	1.52	8.07	3.79
18	46.30	58.62	74.37	3.74	2.22	2.63
19	46.73	55.65	63.82	4.87	4.78	7.97
20	33.66	47.40	52.96	1.88	0.91	3.86
22	26.01	30.00	42.66	0.80	5.41	2.10
25	44.22	61.23	68.09	1.01	1.90	5.24
26	44.48	53.91	77.51	5.06	1.65	1.36
27	42.70	55.13	78.68	2.96	4.36	1.64
29	51.59	62.01	73.13	2.96	2.98	3.00

	γλυκόζη (g/L)			*Τυπική απόκλιση*		
	9% DM, 9mg/g	*12% DM, 9mg/g*	*15% DM, 9mg/g*	*9% DM, 9mg/g*	*12% DM, 9mg/g*	*15% DM, 9mg/g*
#	**48h**	**48h**	**48h**	**48h**	**48h**	**48h**
10	56.92	55.35	64.25	2.44	1.48	7.70
17	48.66	54.02	62.57	2.14	1.08	2.72
18	58.20	71.64	85.54	3.30	3.11	3.40
19	55.76	60.72	66.10	3.45	4.19	9.34
20	48.76	62.80	75.66	5.82	3.67	2.82
22	34.40	46.56	55.93	4.60	5.52	4.42
25	55.69	72.98	90.73	4.35	1.72	3.18
26	54.59	72.16	87.23	1.03	2.93	5.65
27	50.57	67.51	85.83	2.26	3.27	2.17
29	60.59	68.99	73.34	0.72	2.69	3.75

	γλυκόζη (g/L)			*Τυπική απόκλιση*		
	9% DM, 9mg/g	*12% DM, 9mg/g*	*15% DM, 9mg/g*	*9% DM, 9mg/g*	*12% DM, 9mg/g*	*15% DM, 9mg/g*
#	**72h**	**72h**	**72h**	**72h**	**72h**	**72h**
10	63.55	67.33	76.76	3.52	4.23	4.68
17	52.73	58.09	73.85	4.56	3.84	4.18
18	61.69	80.65	89.32	1.56	3.11	2.19
19	62.39	68.58	81.77	3.77	6.72	3.35
20	61.75	71.82	83.66	5.21	4.88	4.56
22	50.34	58.50	64.34	2.17	5.16	6.37
25	65.13	81.59	104.25	3.99	4.73	1.05
26	63.73	79.96	100.72	3.14	5.97	4.46
27	64.49	83.74	103.74	4.82	2.35	2.68
29	64.08	73.70	95.01	2.49	0.43	2.22

	% μεττροπή κυτταρίνης			*Τυπική απόκλιση*		
	9% DM, 9mg/g	*12% DM, 9mg/g*	*15% DM, 9mg/g*	*9% DM, 9mg/g*	*12% DM, 9mg/g*	*15% DM, 9mg/g*
#	**8h**	**8h**	**8h**	**8h**	**8h**	**8h**
10	**35.86**	25.83	25.66	3.54	1.94	4.26
17	28.37	24.97	24.76	3.67	4.11	3.11
18	**32.96**	36.34	**36.77**	**3.82**	**1.01**	**3.83**
19	28.95	31.61	26.25	1.87	1.47	1.50
20	24.73	26.74	24.67	1.20	2.95	1.69
22	19.89	**25.20**	22.60	0.94	5.36	1.33
25	**33.31**	37.68	**33.94**	**1.44**	**2.43**	**3.52**
26	26.09	29.18	**29.91**	**1.92**	**2.35**	**2.95**
27	**28.87**	33.39	**30.78**	**0.87**	**2.51**	**1.58**
29	**38.31**	37.17	**26.45**	**1.46**	**0.23**	**1.15**

	% μετατροπή κυτταρίνης			*Τυπική απόκλιση*		
	9% DM, 9mg/g	*12% DM, 9mg/g*	*15% DM, 9mg/g*	*9% DM, 9mg/g*	*12% DM, 9mg/g*	*15% DM, 9mg/g*
#	**24h**	**24h**	**24h**	**24h**	**24h**	**24h**
10	**51.72**	44.97	39.97	6.14	0.59	1.52
17	48.98	49.95	49.26	2.20	10.73	4.01
18	**63.46**	57.37	**58.24**	**5.12**	**2.58**	**2.51**
19	**54.28**	57.21	**52.49**	**5.66**	**5.71**	**7.82**
20	42.54	44.93	40.16	2.38	0.35	3.43
22	38.96	33.70	38.34	1.20	7.35	0.37
25	**54.42**	56.50	50.27	1.25	0.99	4.44
26	52.17	47.41	**54.54**	**5.94**	**0.51**	**0.98**
27	53.56	51.85	**59.21**	**3.71**	**4.95**	**1.18**
29	**62.70**	56.52	**53.32**	**3.59**	**2.87**	**2.13**

	% μετατροπή κυτταρίνης			*Τυπική απόκλιση*		
	9% DM, 9mg/g	*12% DM, 9mg/g*	*15% DM, 9mg/g*	*9% DM, 9mg/g*	*12% DM, 9mg/g*	*15% DM, 9mg/g*
#	**48h**	**48h**	**48h**	**48h**	**48h**	**48h**
10	**77.88**	56.80	52.75	3.34	1.10	6.22
17	**70.53**	58.73	54.42	3.11	0.27	2.86
18	**79.78**	70.12	**66.98**	**4.52**	**0.48**	**3.03**
19	64.76	62.42	54.36	4.00	4.51	9.02
20	61.62	59.53	**57.37**	**7.35**	**3.67**	**0.75**
22	51.52	52.30	50.26	6.88	4.81	2.29
25	**68.53**	67.35	**66.99**	**5.36**	**1.37**	**0.30**
26	64.01	63.47	**61.37**	**1.21**	**1.95**	**4.86**
27	63.42	63.51	**64.59**	**2.83**	**3.02**	**1.49**
29	**73.62**	62.88	53.47	0.88	1.73	3.09

	% μετατροπή κυτταρίνης			*Τυπική απόκλιση*		
	9% DM, 9mg/g	*12% DM, 9mg/g*	*15% DM, 9mg/g*	*9% DM, 9mg/g*	*12% DM, 9mg/g*	*15% DM, 9mg/g*
#	**72h**	**72h**	**72h**	**72h**	**72h**	**72h**
10	**86.96**	**69.10**	63.02	4.81	5.09	3.94
17	76.44	63.16	64.23	6.60	3.13	4.29
18	**84.56**	**78.95**	**69.94**	**2.13**	**3.62**	**1.67**
19	72.46	**70.51**	67.25	4.38	0.75	2.47
20	**78.04**	68.08	63.44	6.58	4.70	3.64
22	75.41	65.72	57.82	3.25	7.02	6.65
25	**80.13**	**75.30**	**76.96**	**4.91**	**0.83**	**0.66**
26	74.74	**70.33**	**70.87**	**3.68**	**6.15**	**3.82**
27	**80.88**	**78.77**	**78.07**	**6.04**	**0.15**	**1.73**
29	77.87	67.17	**69.27**	**3.02**	**0.33**	**0.27**

ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΑ ΔΕΔΟΜΕΝΑ ΕΝΖΥΜΙΚΗΣ ΥΔΡΟΛΥΣΗΣ 15% DM, ΕΝΖΥΜΙΚΟ ΦΟΡΤΙΟ 9mg/g, 15mg/g, 20mg/g DM

	Γλυκόζη (g/L)			*Τυπική απόκλιση*		
	15% DM, 9mg/g	*15% DM, 15mg/g*	*15% DM, 20mg/g*	*15% DM, 9mg/g*	*15% DM, 15mg/g*	*15% DM, 20mg/g*
#	**8h**	**8h**	**8h**	**8h**	**8h**	**8h**
10	31.25	33.44	48.38	4.52	1.89	4.11
17	28.46	32.39	53.91	2.94	2.38	2.88
18	46.96	51.93	56.93	4.00	3.04	3.04
19	31.91	41.01	52.70	1.78	1.54	0.95
20	32.53	47.51	51.52	2.02	1.23	1.97
22	25.14	29.25	34.42	1.60	0.41	2.96
25	45.98	52.57	55.82	6.60	0.82	3.45
26	42.51	47.01	52.74	3.96	0.44	2.88
27	40.91	51.81	54.02	1.72	1.07	2.22
29	36.28	51.67	65.07	1.72	1.83	0.74

	Γλυκόζη (g/L)			*Τυπική απόκλιση*		
	15% DM, 9mg/g	*15% DM, 15mg/g*	*15% DM, 20mg/g*	*15% DM, 9mg/g*	*15% DM, 15mg/g*	*15% DM, 20mg/g*
#	**24h**	**24h**	**24h**	**24h**	**24h**	**24h**
10	48.68	57.68	64.43	1.81	0.66	0.33
17	56.64	57.92	58.62	3.79	2.96	1.97
18	74.37	75.48	77.57	2.63	2.80	4.44
19	63.82	69.62	78.82	7.97	0.44	2.34
20	52.96	67.22	71.41	3.86	3.62	1.97
22	42.66	49.66	51.99	2.10	2.47	2.14
25	68.09	78.27	83.97	5.24	1.81	4.28
26	77.51	75.92	76.64	1.36	2.78	2.80
27	78.68	77.80	78.04	1.64	3.45	1.81
29	73.13	77.27	80.94	3.00	2.78	5.59

	Γλυκόζη (g/L)			*Τυπική απόκλιση*		
	15% DM, 9mg/g	*15% DM, 15mg/g*	*15% DM, 20mg/g*	*15% DM, 9mg/g*	*15% DM, 15mg/g*	*15% DM, 20mg/g*
#	**48h**	**48h**	**48h**	**48h**	**48h**	**48h**
10	64.25	71.99	96.53	7.70	7.40	0.66
17	62.57	75.13	99.32	2.72	2.96	1.97
18	85.54	95.13	106.53	3.40	2.96	1.64
19	66.10	81.92	100.03	9.34	3.07	1.76
20	75.66	96.99	113.39	2.82	3.29	1.48
22	55.93	71.76	87.69	4.42	1.15	2.63
25	90.73	105.02	123.74	3.18	13.32	1.97
26	87.23	99.92	106.65	5.65	0.59	2.14
27	85.83	108.51	111.42	2.17	4.77	0.33
29	73.34	85.75	99.67	3.75	3.80	1.15

	Γλυκόζη (g/L)			Τυπική απόκλιση		
	15% DM, 9mg/g	15% DM, 15mg/g	15% DM, 20mg/g	15% DM, 9mg/g	15% DM, 15mg/g	15% DM, 20mg/g
#	**72h**	**72h**	**72h**	**72h**	**72h**	**72h**
10	76.76	103.74	115.30	4.68	0.66	0.88
17	73.85	87.68	107.32	4.18	3.97	0.78
18	89.32	101.52	109.86	2.19	3.77	1.09
19	81.77	94.34	103.54	3.35	2.34	2.05
20	83.66	102.09	123.74	4.56	5.24	0.33
22	64.34	89.74	98.31	6.37	0.92	2.42
25	104.25	126.40	133.59	1.05	1.12	4.17
26	100.72	108.61	114.79	4.46	5.28	0.82
27	103.74	103.16	104.54	2.68	0.16	0.80
29	95.01	108.61	113.79	2.22	6.29	2.04

	% μετατροπή κυτταρίνης			Τυπική απόκλιση		
	15% DM, 9mg/g	15% DM, 15mg/g	15% DM, 20mg/g	15% DM, 9mg/g	15% DM, 15mg/g	15% DM, 20mg/g
#	**8h**	**8h**	**8h**	**8h**	**8h**	**8h**
10	25.66	27.45	39.72	4.26	1.55	3.38
17	24.76	28.17	46.89	3.11	2.07	2.50
18	36.77	40.66	44.58	3.83	2.38	2.38
19	26.25	33.73	40.74	1.50	1.26	0.73
20	24.67	36.03	39.07	1.69	0.94	1.50
22	22.60	26.29	30.94	1.33	0.37	2.66
25	33.94	38.81	41.21	3.52	0.61	2.55
26	29.91	33.08	37.11	2.95	0.31	2.03
27	30.78	38.99	40.65	1.58	0.80	1.67
29	26.45	37.67	48.36	1.15	1.33	0.55

	% μετατροπή κυτταρίνης			Τυπική απόκλιση		
	15% DM, 9mg/g	15% DM, 15mg/g	15% DM, 20mg/g	15% DM, 9mg/g	15% DM, 15mg/g	15% DM, 20mg/g
#	**24h**	**24h**	**24h**	**24h**	**24h**	**24h**
10	39.97	47.36	52.90	1.52	0.54	0.27
17	49.26	50.38	50.98	4.01	2.57	1.72
18	58.24	59.10	60.74	2.51	2.19	3.48
19	52.49	57.26	60.93	7.82	0.36	1.81
20	40.16	50.98	54.15	3.43	2.74	1.50
22	38.34	44.63	46.72	0.37	2.22	1.92
25	50.27	57.78	61.99	4.44	1.34	3.16
26	54.54	53.42	53.93	0.98	1.96	1.97
27	59.21	58.55	58.72	1.18	2.60	1.36
29	53.32	56.34	60.16	2.13	2.03	4.16

% μετατροπή κυτταρίνης *Τυπική απόκλιση*

#	15% DM, 9mg/g 48h	15% DM, 15mg/g 48h	15% DM, 20mg/g 48h	15% DM, 9mg/g 48h	15% DM, 15mg/g 48h	15% DM, 20mg/g 48h
10	52.75	59.10	79.25	6.22	6.08	0.54
17	54.42	65.35	86.39	2.86	2.57	1.72
18	66.98	74.50	83.42	3.03	2.32	1.29
19	54.36	67.38	77.32	9.02	2.53	1.36
20	57.37	73.55	85.99	0.75	2.49	1.12
22	50.26	64.49	78.81	2.29	1.03	2.36
25	66.99	77.53	91.36	0.30	9.84	1.46
26	61.37	70.31	75.04	4.86	0.41	1.50
27	64.59	81.65	83.84	1.49	3.59	0.25
29	53.47	62.52	74.07	3.09	2.77	0.86

	% μετατροπή κυτταρίνης			*Τυπική απόκλιση*		
#	*15% DM, 9mg/g* **72h**	*15% DM, 15mg/g* **72h**	*15% DM, 20mg/g* **72h**	*15% DM, 9mg/g* **72h**	*15% DM, 15mg/g* **72h**	*15% DM, 20mg/g* **72h**
10	63.02	85.17	94.66	3.94	0.54	0.72
17	64.23	76.26	93.34	4.29	3.45	0.68
18	69.94	79.50	86.03	1.67	2.95	0.85
19	67.25	77.59	80.04	2.47	1.93	1.58
20	63.44	77.42	93.84	3.64	3.97	0.25
22	57.82	80.65	88.35	6.65	0.83	2.17
25	76.96	93.31	98.62	0.66	0.83	3.08
26	70.87	76.42	80.77	3.82	3.71	0.58
27	78.07	77.63	78.67	1.73	0.12	0.61
29	69.27	79.19	84.57	0.27	4.59	1.52

Βιβλιογραφία

1. Jie Zho, Jia Ouyang, Qianqian Xu, Zhaojuan Zheng. Cost-effective simultaneous saccharification and fermentation of L-lactic acid from bagasse sulfite pulp by Bacillus coagulans CC17. Bioresource Technology 222, 431-438, 2016.
2. Faithfull, N. T., "Methods in Agricultural Chemical Analysis: A Practical Handbook": Cabi Pub., (2002), pp. 181.
3. Ek, M., "Wood Chemistry and Wood Biotechnology": De Gruyterpp. 101 – 120, 2009.
4. P.F.H. Harmsen, W.J.J. Huijgen,L.M. Bermúdez López,R.R.C. Bakker. Literature Review of Physical and Chemical Pretreatment Processes for Lignocellulosic Biomass. 2010.
5. Eva Palmqvist, Barbel Hahn-Hagerdal. Fermentation of lignocellulosic hydrolysates. II: inhibitors and mechanisms of inhibition. Bioresource Technology 74, 25-33, 2000.
6. Kalogiannis, K.G., Stefanidis, S., Marianou, A., Michailof, C., Kalogianni, A., Lappas, A. Lignocellulosic biomass fractionation as a pretreatment step for production of fuels and green chemicals. Waste and Biomass Valorization 6, 781–790, 2015
7. Zarubin, B., Cellulosic Ethanol - Environmentally Friendly But Costly, Stanford University, http://large.stanford.edu/courses/2014/ph240/zarubin1/2014.
8. Mosier, N. et al. Features of promising technologies for pretreatment of lignocellulosic biomass. Bioresource Technology 96, 673-686, 2005.
9. Galbe, M. & Zacchi, G. in Biofuels Vol. 108 Advances in Biochemical Engineering-Biotechnology (ed L. Olsson) 41-65, 2007.
10. 10. Lin, Z., Huang, H., Zhang, H., Zhang, L., Yan, L., Chen, J.. Ball milling pretreatment of corn stover for enhancing the efficiency of enzymatic hydrolysis. Appl. Biochem. Biotechnol. 162, 1872–1880, 2010.
11. Alvira, P., Tomas-Pejo, E., Ballesteros, M. & Negro, M. J. Pretreatment technologies for an efficient bioethanol production process based on enzymatic hydrolysis: A review. Bioresource Technology 101, 4851-4861, 2010.
12. Taherzadeh, M. J. & Karimi, K. Pretreatment of lignocellulosic wastes to improve ethanol and biogas production: A review. International Journal of Molecular Sciences 9, 1621-1651, 2008.
13. Laura Capolupo Vincenza Faraco. Green methods of lignocellulose pretreatment for biorefinery development. Applied Microbiology and Biotechnology, Volume 100, Issue 22, pp 9451–9467, November 2016.
14. Xu, J., Thomsen, M.H., Thomsen, A.B.,. Pretreatment on corn stover with low concentration of formic acid. J. Microbiol. Biotechnol. 19, 845–50, 2009.
15. Local Phase Separation of Co-solvents Enhances Pretreatment of Biomass for Bioenergy Applications Barmak Mostofian, Charles M. Cai, Micholas Dean Smith, Loukas Petridis, Xiaolin Cheng, Charles E. Wyman, Jeremy C. Smith.

16. Banerjee, S., Sen, R., Mudliar, S., Pandey, R.A., Chakrabarti, T., Satpute, D., Alkaline peroxide assisted wet air oxidation pretreatment approach to enhance enzymatic convertibility of rice husk. Biotechnol. Prog. 27, 691–697, 2011.
17. Molecular Driving Forces behind the Tetrahydrofuran–Water Miscibility GapMicholas Dean Smith, Barmak Mostofian, Loukas Petridis†Xiaolin Cheng, Jeremy C. Smith J. Phys. Chem. B20161204740-747 Publication Date: January 6, 2016.
18. Wan, C., Li, Y. Microbial pretreatment of corn stover with Ceriporiopsis subvermispora for enzymatic hydrolysis and ethanol production. Bioresour. Technol. 101, 6398–6403, 2010.
19. Hayes, D. J. An examination of biorefining processes, catalysts and challenges. Catalysis Today 145, 138-151, 2009.
20. K.D., Mojsov. Aspergillus System Properties and Applications. New and Future Developments in Microbial Biotechnology and Bioengineering, 215-222, 2016
21. http://www.shinshu-u.ac.jp/faculty/engineering/chair/chem010/manual/Ctec2
22. http://www.ncbe.reading.ac.uk/MATERIALS/Enzymes/celluclast.html
23. Rodriguesa, M., Ostergaard Haven, J., Lindedamb, Claus Felby, M., Gama. Celluclast and Cellic® CTec2: Saccharification/fermentation of wheat straw, solid–liquid partition and potential of enzyme recycling by alkaline washing. Enzyme and Microbial Technology 79–80, 70–77, 2015.
24. Rojan P. John, K. Madhavan Nampoothiri, Ashok Pandey. Fermentative production of lactic acid from biomass: an overview on process developments and future perspectives. Appl Microbiol Biotechnol 74, 524–534, 2007.
25. Tayyba Ghaffar, Muhammad Irshad, Zahid Anwar, Tahir Aqil, Zubia Zulifqar, Asma Tariq, Muhammad Kamran, Nudrat Ehsan, Sajid Mehmood. Recent trends in lactic acid biotechnology: A brief review on production to purification. Journal of Radiation Research and Applied Sciences 7, 222-229, 2014.
26. Mohamed Ali Abdel-Rahmana, Yukihiro Tashiro, Kenji Sonomoto. Lactic acid production from lignocellulose-derived sugars using lactic acid bacteria: Overview and limits. Journal of Biotechnology 156, 286– 301, 2011.
27. Fabio Andres Castillo Martinez, Eduardo Marcos Balciunas, Jose Manuel Salgado, Jose Manuel Dominguez Gonzalez, Attilio Converti, Ricardo Pinheiro de Souza Oliveira. Lactic acid properties, applications and production: A review. Trends in Food Science & Technology 30, 70-83, 2013.
28. Mohamed Ali Abdel-Rahman, Yukihiro Tashiro, Kenji Sonomoto. Recent advances in lactic acid production by microbial fermentation processes. Biotechnology Advances 31 877–902, 2013.
29. Michael Sauer, Hannes Russmayer, Reingard Grabherr, Clemens K. Peterbauer, Hans Marx. The Efficient Clade: Lactic Acid Bacteria for Industrial Chemical Production. Trends in Biotechnology, Vol. 35, No. 8, 2017.
30. Zhao, K., Qiao, Q., Chu, D., Gu, H., Dao, T.H., Zhang, J., Bao, J. Simultaneoussaccharification and high titer lactic acid fermentation of corn stover

using anewly isolated lactic acid bacterium Pediococcus acidilactici DQ2. Bioresour.Technol. 135, 481–489, 2013.

31. Christian Chervaux, S. Dusko Ehrlich, Emmanuelle Maguin. Physiological Study of Lactobacillus delbrueckii subsp. Bulgaricus Strains in a Novel Chemically Defined Medium. Applied And Environmental Microbiology, 5306–5311, 2000.
32. Abhinay Kumar Srivastava & Abhishek Dutt Tripathi & Alok Jha & Amrita Poonia & Nitya Sharma. Production, optimization and characterization of lactic acid by Lactobacillus delbrueckii NCIM 2025 from utilizing agro-industrial byproduct (cane molasses). J Food Sci Technol 52(6):3571–3578, 2015
33. Zhang, Y., Vadlani, P.V. d-Lactic acid biosynthesis from biomass-derivedsugars via Lactobacillus delbrueckii fermentation. Bioprocess Biosyst. Eng. 36(12), 1897–1904, 2013
34. S. Plessas, L. Bosnea, C. Psarianos, A.A. Koutinas, R. Marchant, I.M. Banat. Lactic acid production by mixed cultures of Kluyveromyces marxianus, Lactobacillus delbrueckii ssp. Bulgaricus and Lactobacillus helveticus. Bioresource Technology 99 5951–5955, 2008.
35. Gözde Konuray, Zerrin Erginkaya. Potential Use of Bacillus coagulans in the Food Industry. Foods, 76-92, 2018.
36. Aulitto, Salvatore Fusco, Simonetta Bartolucci1, Carl Johan Franzén, Patrizia Contursi. Bacillus coagulans MA‑13: a promising thermophilic and cellulolytic strain for the production of lactic acid from lignocellulosic hydrolysate. Biotechnol Biofuels, 10-210, 2017.
37. Xue, Z., Wang, L., Ju, J., Yu, B., Xu, P., Ma, Y.,. Efficient production ofpolymer-grade l-lactic acid from corn stover hydrolyzate by thermophilic Bacillus sp. strain XZL4. SpringerPlus 1, 43–49, 2012.
38. Jinlong Hu, Zhenting Zhang, Yanxu Lin, Shumiao Zhao, Yuxia Mei, Yunxiang Liang, Nan Peng. High-titer lactic acid production from NaOH-pretreated corn stover by Bacillus coagulans LA204 using fed-batch simultaneous saccharification and fermentation under non-sterile condition. Bioresource Technology 182 251–257, 2015
39. Leif J. Jönsson, Björn Alriksson, Nils-Olof Nilvebrant. Bioconversion of lignocellulose: inhibitors and detoxification. Biotechnology for Biofuels, 6-16, 2013.
40. Leif J. Jönsson, Björn Alriksson, Nils-Olof Nilvebrant. Bioconversion of lignocellulose: inhibitors and detoxification. Biotechnology for Biofuels, 6-16, 2013.
41. Miller GL. Use of dinitrosalicylic acid reagent for determination of reduc- ing sugar. AnalChem. 1959;31:426–8.
42. Suan Shi, Li Kang, Y, Y, Lee, Production of Lactic Acid from the Mixure of Softwood Prehrydrolysate and Parer Mill Sludge by Simultaneous Saccharification and Fermentation. App Biochem Biotechnol 175, 2741-2754, 2015.