



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

Διπλωματική Εργασία

«Αξιοποίηση λιγνινοκυτταρινούχου βιομάζας για την
παραγωγή φρουκτόζης και
5-υδροξυμεθυλοφουρουράλης»

Μαρία-Δάφνη Αποστολοπούλου

Επιβλέπων Καθηγητής: Ευάγγελος Τόπακας

ΑΘΗΝΑ 2021

Ευχαριστίες

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

Αρχικά, θα ήθελα να ευχαριστήσω τον αναπληρωτή καθηγητή του Ε.Μ.Π. κ. Ευάγγελο Τόπακα για την ανάθεση του συγκεκριμένου θέματος που με βοήθησε να κατανοήσω καλύτερα και να εμπλουτίσω τις γνώσεις μου στον τομέα της Βιοτεχνολογίας. Επίσης, τον ευχαριστώ πολύ για το ενδιαφέρον και τον ζήλο με τον οποίο μάς γνώρισε τον κόσμο της Βιοτεχνολογίας κατά τη διάρκεια των φοιτητικών χρόνων με το ευρύ φάσμα γνώσεων που κατέχει, γεγονός που αποτέλεσε έμπνευση για πολλούς να θελήσουν να ακολουθήσουν αυτήν την κατεύθυνση.

Επίσης, θα ήθελα να ευχαριστήσω ιδιαίτερα τον υποψήφιο διδάκτορα του Ε.Μ.Π Γρηγόριο Δέδε για τη συνεχή καθοδήγηση και το ενδιαφέρον που επέδειξε καθ' όλη τη διάρκεια εκτέλεσης και συγγραφής της διπλωματικής μου εργασίας. Πέρα από τις πολύτιμες επιστημονικές γνώσεις και συμβουλές που μοιράστηκε μαζί μου, τον ευχαριστώ πολύ για το όμορφο και φιλικό κλίμα που δημιούργησε και για τη στήριξη και την αισιόδοξη διάθεση σε πολλές στιγμές της χρονιάς.

Ακόμα, θα ήθελα να ευχαριστήσω όλα τα μέλη του εργαστηρίου Βιοτεχνολογίας για το ευχάριστο κλίμα και τις συμβουλές που μου προσέφεραν.

Τέλος, θα ήθελα να ευχαριστήσω τα αγαπημένα μου πρόσωπα που έκαναν τα φοιτητικά χρόνια τόσο ξεχωριστά και γεμάτα αναμνήσεις και την οικογένεια μου για τη συνεχή στήριξη και αγάπη όλα τα χρόνια.

Αυτή η εργασία είναι ιδιαίτερα αφιερωμένη στη γιαγιά μου, που έφυγε αυτό το καλοκαίρι, αλλά ήταν πάντα δίπλα μου σε κάθε βήμα της ζωής μου.

Περίληψη

Ο σκοπός της συγκεκριμένης διπλωματικής εργασίας είναι η αξιοποίηση της λιγνινοκυτταρινούχου βιομάζας για την βιοχημειοκαταλυτική παραγωγή φρουκτόζης και 5-υδροξυμεθυλοφουρφουράλης (HMF), τα οξειδωτικά παράγωγα της οποίας μπορούν να λειτουργήσουν ως βασικές δομικές ενώσεις για την παραγωγή σημαντικών προϊόντων, μεταξύ των οποίων και βιοπολυμερών.

Αρχικά, μελετήθηκε η αποδοτικότητα της ήπιας οξειδωτικής προκατεργασίας λιγνινοκυτταρινούχων υλικών με οργανικούς διαλύτες ως προς τη χρήση διαφορετικών διαλυτών/καταλυτών και διαφορετικών συνθηκών. Γι' αυτόν τον λόγο πραγματοποιήθηκαν αρχικά πειράματα ενζυμικών υδρολύσεων προκειμένου από την κυτταρίνη των υλικών να παραχθεί γλυκόζη και στη συνέχεια πειράματα ενζυμικών ισομερειώσεων ώστε η παραγόμενη γλυκόζη να μετατραπεί σε φρουκτόζη. Με βάση τα αποτελέσματα αυτών των πειραμάτων συγκρίθηκαν τα προκατεργασμένα υλικά και αξιολογήθηκε η αποδοτικότητα της κάθε προκατεργασίας. Ειδικότερα, μεταξύ των προκατεργασμένων υλικών οι υψηλότερες μετατροπές κυτταρίνης σε γλυκόζη και τα υψηλότερα κλάσματα g φρουκτόζης ανά 100 g προκατεργασμένης βιομάζας επιτεύχθηκαν από υλικά οξιάς που είχαν προκατεργαστεί με ισοβουτανόλη σε υψηλότερη θερμοκρασία (175 °C) για 60 και 120 min και παρουσίασαν 87.5% και 84.2% μετατροπή κυτταρίνης σε γλυκόζη και παραγωγή 61.2 και 65.7 g φρουκτόζης ανά 100 g προκατεργασμένης βιομάζας, αντίστοιχα. Η προκατεργασία στην επίσης υψηλή θερμοκρασία των 160 °C για 120 min με χρήση ισοβουτανόλης, επέφερε και αυτή υψηλή μετατροπή κυτταρίνης σε φρουκτόζη (81.2%) και παραγωγή 57.0 g φρουκτόζης ανά 100 g προκατεργασμένης βιομάζας. Επίσης, σε χαμηλότερη θερμοκρασία (150 °C) και απουσία κάποιου στερεού μεταλλικού καταλύτη ξεχώρισε για την αποδοτικότητά του ως διαλύτης της προκατεργασίας το τετραϋδροφουράνιο και από τους στερεούς μεταλλικούς καταλύτες ο καταλύτης $Fe_3MO_{12}OP$ με τον οποίο πραγματοποιήθηκαν υψηλές μετατροπές κυτταρίνης σε γλυκόζη (80.3 % με χρήση ακετόνης και 81.0% με χρήση ισοβουτανόλης ως διαλύτη). Η χρήση του καταλύτη $Cu_3MO_{12}OP$ επέφερε κάποια ικανοποιητικά αποτελέσματα στην αποδοτικότητα της προκατεργασίας, ενώ ο καταλύτης POM αποδείχτηκε λιγότερο αποδοτικός.

Επίσης, επιχειρήθηκε να προκατεργαστούν στελέχη αραβοσίτου με τη χρήση μικροκυμάτων και νερού ή οργανικών διαλυτών σε διαφορετικές θερμοκρασίες και για διαφορετικούς χρόνους προκατεργασίας. Τα αποτελέσματα των υδρολύσεων για αυτά τα υλικά έδειξαν χαμηλές τελικές συγκεντρώσεις γλυκόζης μέχρι 35.4 g/L με τη χρήση νερού και 14.5 g/L με τη χρήση αιθανόλης. Από τη μία, η επιλογή του νερού ως διαλύτη αναμενόταν να επιφέρει χαμηλές συγκεντρώσεις γλυκόζης καθώς με το νερό δεν απομακρύνεται το κλάσμα της λιγνίνης, από την άλλη η χρήση αιθανόλης ως διαλύτη δεν πέτυχε υψηλές συγκεντρώσεις γλυκόζης πιθανόν εξαιτίας της απώλειας διαλύτη από το φιαλίδιο (vial) κατά την προκατεργασία και των μικρών χρόνων προκατεργασίας που επιλέχθηκαν.

Στη συνέχεια, εξετάστηκε η αφυδάτωση της φρουκτόζης σε HMF με τη χρήση όξινων ομογενών καταλυτών. Για τη μελέτη αυτή χρησιμοποιήθηκε προκατεργασμένο λιγνινοκυτταρινούχο υλικό από ξύλο οξιάς και πραγματοποιήθηκαν δύο στάδια υδρολύσεων, μια μεγαλύτερης και μια μικρότερης κλίμακας, για την παραγωγή υψηλής συγκέντρωσης γλυκόζης, ακολουθούμενα από ένα στάδιο ισομερείωσης της παραγόμενης γλυκόζης. Μετά το πέρας των πειραμάτων αυτών παράχθηκαν 129.6 g/L αναγωγικών σακχάρων (104.5 g/L φρουκτόζης και 25 g/L γλυκόζης). Για την αποτελεσματική χημική αφυδάτωση της

παραγόμενης φρουκτόζης χρησιμοποιήθηκαν όξινοι ομοιογενείς καταλύτες, από τους οποίους ξεχώρισε το φορμικό οξύ με τη μεγαλύτερη απόδοση HMF (44.6%).

Τέλος, επιχειρήθηκε να παραχθεί το ένζυμο οξειδάση της γαλακτόζης από τον *Fusarium oxysporum* προκειμένου να μελετηθεί η οξειδωτική του δράση στο HMF για την παραγωγή σημαντικών προϊόντων, όπως DFF, HMFCA, FFCA και FDCA. Το πρώτο στάδιο αυτής της διαδικασίας δεν ολοκληρώθηκε επιτυχώς, καθώς κατά τον μετασχηματισμό των κυττάρων *E.coli* με το πλασμίδιο έκφρασης pPICZ(alpha) C που έφερε το γονίδιο της οξειδάσης της γαλακτόζης, οι καλλιέργειες των κυττάρων στα τρυβλία δεν αναπτύχθηκαν. Δοκιμάστηκαν πολλοί διαφορετικοί τρόποι αντιμετώπισης αυτού του προβλήματος, εστιάζοντας περισσότερο σε τροποποιήσεις κατά τη διαδικασία της πέψης (digestion) και του ligation, μεταξύ των οποίων ήταν η αντικατάσταση των περιοριστικών ενζύμων και της λιγάσης με καινούργια, η χρήση διαφορετικών αναλογιών περιοριστικών ενζύμων κατά το στάδιο της πέψης και η σταδιακή προσθήκη τους, η αύξηση του χρόνου πέψης και η εφαρμογή τη μεθόδου λυοφιλίωσης (freeze-drying) για την παραλαβή υψηλότερης συγκέντρωσης πλασμιδίου και γονιδίου. Παρά τις διάφορες δοκιμές δεν κατέστη εφικτό σε καμία περίπτωση να προχωρήσει η διαδικασία, οπότε η αιτία του προβλήματος πιθανόν να οφείλεται σε κάποια μετάλλαξη στα άκρα του γονιδίου που δημιουργείται από το προηγούμενο στάδιο του μετασχηματισμού των κυττάρων *E.coli* με το πλασμίδιο πολλαπλασιασμού PCR Blunt που έφερε το γονίδιο.

Abstract

The purpose of this diploma thesis is the valorization of lignocellulosic biomass for the bio- and chemo-catalytic production of fructose and 5-hydroxymethylfurfural (HMF), whose oxidative derivatives can function as bio-based platform chemicals for the production of important compounds, including biopolymers.

The first part of the thesis examined the efficiency of mild oxidative pretreatment of lignocellulosic materials with organic solvents in terms of different solvents / catalysts and different conditions used. For this reason, experiments of enzymatic hydrolysis were carried out for the production of glucose from the cellulose of lignocellulosic materials and then experiments of enzymatic isomerizations were performed in order to convert the produced glucose into fructose. Each pretreatment was evaluated for its efficiency based on the results of these experiments. In particular, the highest conversions of cellulose to glucose and the highest fructose production were obtained from pretreated beechwood materials with isobutanol as solvent at a higher temperature (175 °C) for 60 min and 120 min and reached 87.5% and 84.2% conversion of cellulose to glucose and production of 61.2 and 65.7 g of fructose per 100 g of pretreated biomass, respectively. The pretreatment at the high temperature of 160 °C for 120 min using isobutanol, also resulted in a high conversion of cellulose to fructose (81.2%) and production of 57.0 g of fructose per 100 g of pretreated biomass. Moreover, at a lower temperature (150 °C) and in the absence of a solid metal catalyst, tetrahydrofuran stood out for its efficiency as a solvent and from the solid metal catalysts the $\text{Fe}_3\text{MO}_{12}\text{OP}$ catalyst performed high cellulose conversions (80.3% using acetone and 81.0% using isobutanol as solvent). The use of the $\text{Cu}_3\text{MO}_{12}\text{OP}$ catalyst gave some satisfactory results regarding the pretreatment efficiency, while the POM catalyst proved to be less effective.

Microwave pretreatment of corn stover materials using water or organic solvents was also attempted at different temperatures and for different pretreatment times. The results of the enzymatic hydrolysis of these materials showed low glucose concentrations up to 35.4 g/L using water and 14.5 g/L using ethanol. On the one hand, the choice of water as a solvent was expected to result in low glucose concentrations as water does not remove the lignin fraction and on the other hand, using ethanol as a solvent did not achieve high glucose concentrations probably due to solvent loss from the vial during pretreatment and the short pretreatment times selected.

Dehydration of fructose in HMF was then studied using acid homogeneous catalysts. Pretreated beechwood material was used for a larger scale hydrolysis followed by a smaller hydrolysis to produce high concentration of glucose and a concentrated fructose syrup was obtained from the isomerization of the produced glucose. At the end of the hydrolysis and isomerization steps, 129.6 g/L of reducing sugars (104.5 g/L fructose and 25 g/L glucose) were produced. For the efficient dehydration of fructose, acid homogeneous catalysts were used, from which the formic acid showed the highest HMF yield (44.6%).

In the last part of the thesis it was attempted to produce the enzyme galactose oxidase from *Fusarium oxysporum* in order to study its oxidative activity in HMF for the production of important products, such as DFF, HMFCA FFCA and FDCA. The first stage of this process was not successfully completed, because during the transformation of *E.coli* cells with the expression plasmid pPICZ(alpha) C carrying the galactose oxidase gene, the cell cultures in the plates did not grow. Many different ways to overcome this obstacle have been tried, focusing on modifications during digestion and ligation, including the replacement of

restriction enzymes and ligase with new ones, the use of different proportions of restriction enzymes during the stage of digestion and their gradual addition in the reaction, the increase of digestion time and the application of the freeze-drying method to obtain a higher plasmid and gene concentration. Despite the various tests, it was never possible to proceed from this step, so the problem was probably caused from a mutation in the ends of the gene created by the previous stage of *E.coli* cell transformation with the PCR Blunt amplification plasmid who carried the gene.

Περιεχόμενα

1. Εισαγωγή.....	1
2. Θεωρητικό μέρος.....	5
2.1. Λιγνινοκυτταρινούχος βιομάζα	5
2.1.1 Κυτταρίνη.....	6
2.1.2 Ημικυτταρίνη	8
2.1.3 Λιγνίνη.....	9
2.2 Προκατεργασία λιγνινοκυτταρινούχου βιομάζας	10
2.2.1 Χημικές προκατεργασίες	11
2.2.1.1 Όξινη προκατεργασία	11
2.2.1.2 Αλκαλική προκατεργασία	12
2.2.1.3 Προκατεργασία με χρήση οργανικών διαλυτών	12
2.2.1.4 Οζονόλυση	13
2.2.1.5 Προκατεργασία με χρήση ιοντικών υγρών.....	13
2.2.2 Φυσικές προκατεργασίες	14
2.2.2.1 Μηχανική προκατεργασία	14
2.2.2.2 Προκατεργασία μέσω εξώθησης (extrusion)	14
2.2.2.3 Εναλλακτικές φυσικές προκατεργασίες	15
2.2.2.3.1 Προκατεργασία με χρήση μικροκυμάτων	15
2.2.2.3.2 Προκατεργασία με χρήση υπερήχων	17
2.2.3 Φυσικοχημικές προκατεργασίες	17
2.2.3.1 Υδροθερμική προκατεργασία.....	17
2.2.3.1.1 Προκατεργασία με έκρηξη ατμού	17
2.2.3.1.2 Προκατεργασία με υγρό καυτό νερό.....	19
2.2.3.2 Προκατεργασία με έκρηξη αμμωνίας (Ammonia Fiber Expansion, AFEX)	19
2.2.3.3 Υγρή προκατεργασία οξείδωσης	20
2.2.3.4 Προκατεργασία με έκρηξη CO ₂	21
2.2.4 Βιολογική προκατεργασία	21
2.2.5 Συνδυασμός προκατεργασιών.....	21
2.3 Ενζυμική υδρόλυση κυτταρίνης, ημικυτταρίνης και λιγνίνης.....	22
2.3.1 Κυτταρινάσες	22
2.3.2 Ημικυτταρινάσες.....	25
2.3.3 Λιγνινάσες.....	26

2.3.4 Παράγοντες που επηρεάζουν την ενζυμική υδρόλυση της κυτταρίνης.....	26
2.4 Ενζυμική ισομερείωση γλυκόζης προς παραγωγή φρουκτόζης.....	28
2.5 Χημική αφυδάτωση φρουκτόζης προς σχηματισμό 5-υδροξυμεθυλοφουρφουράλης (HMF)	29
2.6 Ενζυμική μετατροπή των φουρανίων σε δομικές ενώσεις (building blocks) για τη σύνθεση πολυμερών.....	30
2.6.1 Παράγωγα των φουρανίων	31
2.6.1.1 Τρόποι σύνθεσης του 2,5-φουρανοδικαρβοξυλικού οξέος (FDCA) και εφαρμογές του ...	32
2.6.1.2 Εφαρμογές άλλων παραγώγων ενώσεων του HMF	35
2.6.2 Οξειδωτικές αντιδράσεις του HMF για την παραγωγή FDCA.....	36
2.6.3 Βιβλιογραφική επισκόπηση βιοκαταλυτικών μεθόδων για την πραγματοποίηση των οξειδωτικών αντιδράσεων του HMF	36
3. Πειραματικό μέρος	45
3.1 Υλικά.....	45
3.1.1 Εμπορικά ένζυμα	45
3.1.2 Ρυθμιστικά διαλύματα	45
3.1.3 Θρεπτικά μέσα.....	46
3.1.4 Χημικά αντιδραστήρια.....	46
3.1.5 Συσκευές και όργανα	46
3.2 Μέθοδοι.....	47
3.2.1 Ήπια οξειδωτική προκατεργασία λιγνινοκυτταρινούχων υλικών με χρήση οργανικών διαλυτών.....	47
3.2.2 Προκατεργασία λιγνινοκυτταρινούχων υλικών με τη χρήση μικροκυμάτων και οργανικών διαλυτών.....	47
3.2.3 Ενζυμική υδρόλυση προκατεργασμένων λιγνινοκυτταρινούχων υλικών.....	49
3.2.4 Ενζυμική ισομερείωση γλυκόζης προς παραγωγή φρουκτόζης.....	51
3.2.5 Μέτρηση συγκέντρωσης αναγωγικών σακχάρων και γλυκόζης	52
Μέτρηση συγκέντρωσης αναγωγικών σακχάρων με τη μέθοδο DNS	52
Μέτρηση συγκέντρωσης γλυκόζης με τη μέθοδο Glucotest.....	53
3.2.6 Χημική αφυδάτωση φρουκτόζης προς παραγωγή 5-υδροξυμεθυλοφουρφουράλης (HMF)...	55
3.2.7 Παραγωγή οξειδάσης της γαλακτόζης από τον μύκητα <i>Fusarium oxysporum</i>	56
4. Αποτελέσματα – Σχολιασμός.....	59
4.1 Υδρολύσεις και ισομερείωσεις προκατεργασμένων υλικών με χρήση ήπιας οξειδωτικής προκατεργασίας και οργανικών διαλυτών.....	59
4.2 Χημική αφυδάτωση φρουκτόζης προς παραγωγή 5-υδροξυμεθυλοφουρφουράλης (HMF).....	73

4.3 Προκατεργασία λιγνινοκυτταρινούχων υλικών με μικροκύματα και χρήση οργανικών διαλυτών	75
4.4 Παραγωγή οξειδάσης της γαλακτόζης από τον μύκητα <i>Fusarium oxysporum</i>	77
5. Συμπεράσματα.....	79
5.1 Συζήτηση αποτελεσμάτων	79
5.2 Μελλοντικές προτάσεις	81
Βιβλιογραφία.....	83

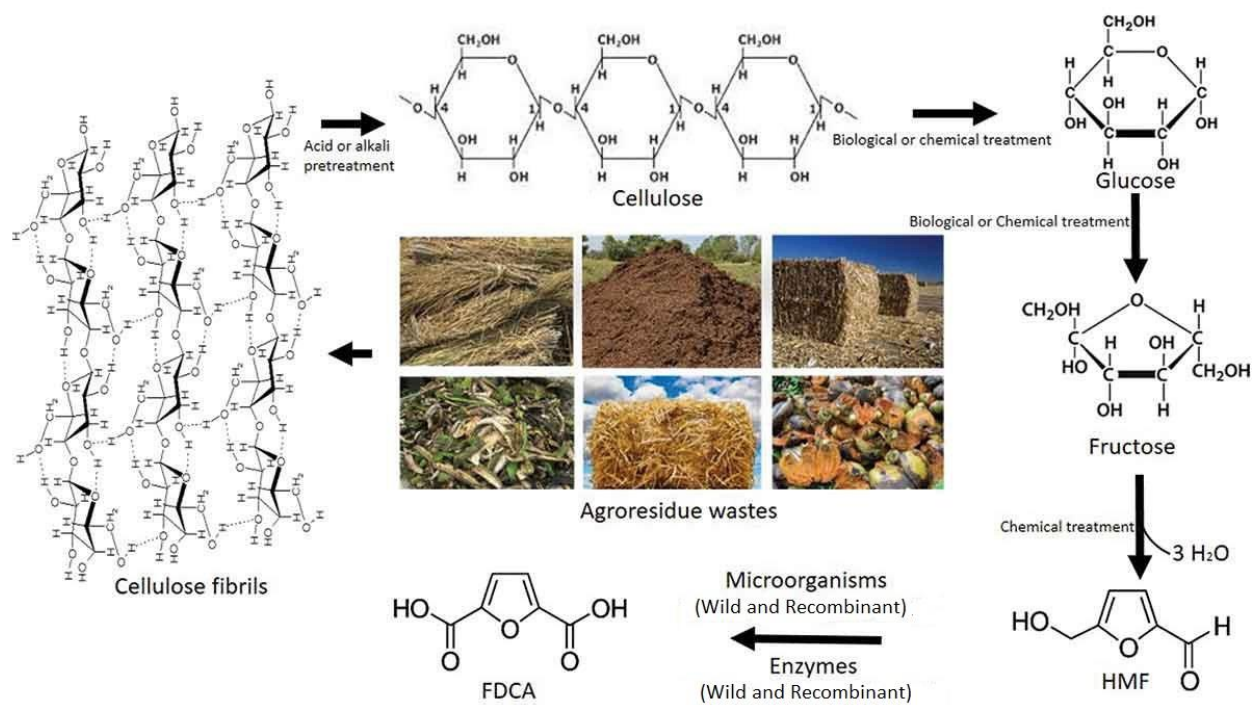
1. Εισαγωγή

Την τελευταία δεκαετία περιβαλλοντικά ζητήματα, όπως η διάθεση των απορριμμάτων, η αυξανόμενη κατανάλωση ενέργειας και η αναπόφευκτη εξάντληση των ορυκτών πόρων, που προκύπτουν από την ραγδαία αύξηση του παγκόσμιου πληθυσμού και των αναγκών του, με τις παράλληλες συνεχείς ανησυχίες για την υπερθέρμανση του πλανήτη, απασχολούν όσο ποτέ άλλοτε την επιστήμη, τη βιομηχανία και την κοινωνία συνολικά. Οι σύγχρονες βιομηχανίες στρέφονται σε πράσινες προσεγγίσεις με τη χρήση ανανεώσιμων πόρων για την ανάπτυξη εναλλακτικών μακρομοριακών υλικών έναντι αυτών που προέρχονται από ορυκτούς πόρους. Η λιγνινοκυτταρινούχος βιομάζα, που αποτελεί μια τέτοια ανανεώσιμη πρώτη ύλη πλούσια σε άνθρακα, μπορεί να αξιοποιηθεί αν επεξεργαστεί κατάλληλα εξαιτίας του χαμηλού κόστους και της αφθονίας της. Μάλιστα, τα τελευταία χρόνια η αξιοποίησή της μπορεί να επεκταθεί πέρα από την παραγωγή βιοκαυσίμων δεύτερης γενιάς (βιοαιθανόλη και βιοντίζελ) στη σύνθεση πολυάριθμων χημικών ενώσεων που χρησιμοποιούνται αντί ομόλογών τους που παράγονται από το πετρέλαιο. Έτσι, με την εμφάνιση της έννοιας του βιοδιυλιστηρίου στις αρχές της δεκαετίας του 2000, όταν υπήρξε η στροφή από το μη αειφόρο μοντέλο ανάπτυξης που βασιζόταν στο πετρέλαιο προς ένα βιώσιμο με βάση τους ανανεώσιμους πόρους, ένας αριθμός οργανικών ενώσεων που μπορούν να παραχθούν από βιομάζα αναδείχθηκαν ως χημικά-πλατφόρμες για τη μελλοντική ανάπτυξη της βιο-οικονομίας, όπως και οι τρόποι παραγωγής και μετατροπής τους σε προϊόντα με προστιθέμενη αξία. Το σύνολο των μελετών που δημοσιεύθηκαν έκτοτε για τη βελτίωση των συνθετικών προσεγγίσεων για την απόκτηση αυτών των μορίων, καθώς και για τη μετατροπή τους σε χημικά και υλικά που χρησιμοποιούνται στην καθημερινότητα, είναι πολύ μεγάλος, ενώ η πλειοψηφία αυτών των μελετών αποσκοπεί στην εύρεση οδών μετατροπής που διέπονται από τις θεμελιώδεις αρχές της βιωσιμότητας και της πράσινης χημείας. Σε αυτό το πλαίσιο, τα τελευταία χρόνια έχει προσελκύσει το ενδιαφέρον των χημικών η ικανότητα των ενζύμων να καταλύουν χημικά αντιδράσεις με εξαιρετική επιλεκτικότητα και περιβαλλοντικά φιλικό τρόπο. Έτσι, η βιοτεχνολογία που για χρόνια περιοριζόταν στα ερευνητικά εργαστήρια, χρησιμοποιείται όλο και περισσότερο βιομηχανικά, καλύπτοντας όλες τις τεχνολογίες και τις εφαρμογές που περιλαμβάνουν τη χρήση ή την τροποποίηση ζωντανών υλικών με κύριο αντικείμενο των λεγόμενων «*λευκών βιοτεχνολογιών*» την κατασκευή χημικών ουσιών, υλικών ή βιοκαυσίμων από ανανεώσιμες βιολογικές πρώτες ύλες χρησιμοποιώντας μικροοργανισμούς ή απομονωμένα ένζυμα. Προς αυτήν την κατεύθυνση αλλάζουν και τα ευρωπαϊκά και αμερικάνικα νομοθετικά πλαίσια διευκολύνοντας τη χρήση των προϊόντων βιολογικής προέλευσης και δυσχεραίνοντας τη χρήση των πετροχημικών. Ενδεικτικά αναφέρεται ότι το Υπουργείο Ενέργειας και Γεωργίας των ΗΠΑ έχει θέσει ως στόχο τη μείωση κατά 30% της κατανάλωσης πετρελαίου στις ΗΠΑ με αντικατάσταση αυτού από βιοκαύσιμα έως το 2030.

Μία πολύ διαδεδομένη και εντατική χρήση των ορυκτών πόρων, που ταυτόχρονα συντελεί στη ρύπανση του περιβάλλοντος, γίνεται για την παραγωγή πλαστικών τα οποία κατασκευάζονται από πολυμερή πετροχημικής προέλευσης που δύσκολα διασπώνται. Τα πλαστικά είναι από τα πιο ευρέως χρησιμοποιούμενα υλικά λόγω του χαμηλού κόστους και βάρους, της αντοχής και της ευκολίας κατασκευής τους, με ποικίλες εφαρμογές όπως συσκευασίες, επιχρίσματα, ίνες, κόλλες, αφρούς και ειδικά πολυμερή. Λόγω της εξέλιξης της προόδου των κοινών τεχνικών πολυμερισμού, στις αρχές του 20^{ου} αιώνα παρατηρήθηκε ανάπτυξη των συνθετικών πολυμερών, γεγονός που οδήγησε σε σημαντική

αύξηση της κατανάλωσης αυτών των υλικών. Ωστόσο, η μαζική ζήτηση για πολυμερή υλικά συνοδεύεται από σοβαρά περιβαλλοντικά προβλήματα που εγείρουν πολλές ανησυχίες. Αρχικά, οι ορυκτοί πόροι, στους οποίους βασίζεται, ως επί το πλείστον, η βιομηχανία πολυμερών, όντας περιορισμένοι, αναμένεται νομοτελειακά να εξαντληθούν. Παράλληλα, από τους 25 εκατομμύρια τόνους πλαστικών απορριμμάτων που παράγονται κάθε χρόνο στην Ευρώπη, το 40% αυτών δεν επαναχρησιμοποιείται ούτε ανακυκλώνεται, ενώ από τους 8300 Mt καθαρών πλαστικών που έχουν κατασκευαστεί έως τώρα παγκοσμίως, το 79% έχει απορριφθεί σε χώρους υγειονομικής ταφής ή στο περιβάλλον και μόνο το 12% έχει αποτεφρωθεί. Ταυτόχρονα προκύπτουν προβλήματα, όπως η σταδιακή μείωση των διαθέσιμων χώρων υγειονομικής ταφής, η συσσώρευση μη αποικοδομήσιμων αποβλήτων, η ρύπανση των ωκεανών από νανο- και μικροπλαστικά και η εκπομπή τοξικών ουσιών από τις αποτεφρώσεις των πλαστικών. Επίσης, εκτιμάται ότι η παραγωγή πρωτογενών πλαστικών θα υπερβεί τους 28000 Mt μέχρι το τέλος του 2050, πιθανόν λόγω αύξησης του πληθυσμού, επέκτασης της αγοράς και σημαντικής αύξησης της ζήτησης νέων εφαρμογών. Έτσι, με κίνητρο τη γενική ανησυχία για θέματα αειφορίας και περιβάλλοντος, η ανάγκη για βιώσιμες και πιο φιλικές προς το περιβάλλον εναλλακτικές διεργασίες και το αυξανόμενο ενδιαφέρον για ανανεώσιμα βιοπολυμερή, έχει οδηγήσει στην αναζήτηση νέων οδών σύνθεσης για την παραγωγή δομικών μονάδων πολυμερών.

Οι ενδιάμεσες ενώσεις που μπορούν να καταστήσουν εφικτή τη γεφύρωση του χάσματος μεταξύ βιομάζας και βιοχημικών προϊόντων, μεταξύ αυτών και βιοπολυμερών, είναι τα φουράνια όπως η 5-υδροξυμεθυλοφουρφουράλη (HMF) και η φουρφουράλη, που μπορούν να παραχθούν μέσω αφυδάτωσης των εξοζών και των πεντοζών της λιγνινοκυτταρινούχου βιομάζας και να αναβαθμιστούν σε πολλές χρήσιμες χημικές ουσίες μέσω κλασικών χημικών μετασχηματισμών, λόγω της παρουσίας αντιδραστικών λειτουργικών ομάδων όπως οι πρωτογενείς υδροξυλομάδες και φορμυλομάδες. Τα τελευταία χρόνια εξαιτίας της μη ικανοποιητικής επιλεκτικότητας και των έντονων συνθηκών αντίδρασης των χημικά καταλυόμενων μεθόδων, η βιοκατάλυση έχει προκύψει ως μια πολλά υποσχόμενη εναλλακτική λύση για την οξείδωση αυτών των εγγενώς ασταθών φουρανίων βιολογικής προέλευσης, λόγω της υψηλής επιλεκτικότητας για συγκεκριμένα υποστρώματα, της αποδοτικότητας και των ρυθμών αντίδρασης που μπορούν να αυξηθούν έως και 10 δισεκατομμύρια φορές από τις κανονικές αντιδράσεις. Τα παράγωγα των φουρανίων ως δομικά μόρια (platform molecules) παρουσιάζουν μεγάλες δυνατότητες για τη σύνθεση βιολογικής προέλευσης πολυεστέρων, πολυαμιδίων, πολυουρεθανών και συμπολυμερών τους. Ειδικά μεταξύ των παραγώγων του HMF, το FDCA, το HMFCA και το DFF θεωρούνται πρόδρομες μονομερείς ενώσεις για την παραγωγή πολυμερών με πολλά από τα πλαστικά βιολογικής προέλευσης να έχουν ιδιότητες που ανταγωνίζονται αυτές των πλαστικών πετρελαϊκής προέλευσης. Έτσι, προέκυψε μεγάλο ερευνητικό ενδιαφέρον, τόσο από τον ακαδημαϊκό όσο και από τον βιομηχανικό κλάδο, για την σύνθεση του FDCA και της πρόδρομης ένωσής του, HMF, όπως και μιας μεγάλης ποικιλίας υλικών με βάση το FDCA που στοχεύουν να εφαρμοστούν σε τομείς όπως ενδεικτικά συσκευασίες, υφάσματα και επιχρίσματα. Πολυεστέρες που προέρχονται από FDCA, μεταξύ άλλων πολυμερών, έχουν ξεχωρίσει λόγω της ομοιότητας αυτού του ανανεώσιμου μονομερούς με το γνωστό πετρελαϊκό τереφθαλικό οξύ που χρησιμοποιείται για την παραγωγή τереφθαλικού πολυαιθυλενίου (PET) [22-29,37,38,42].

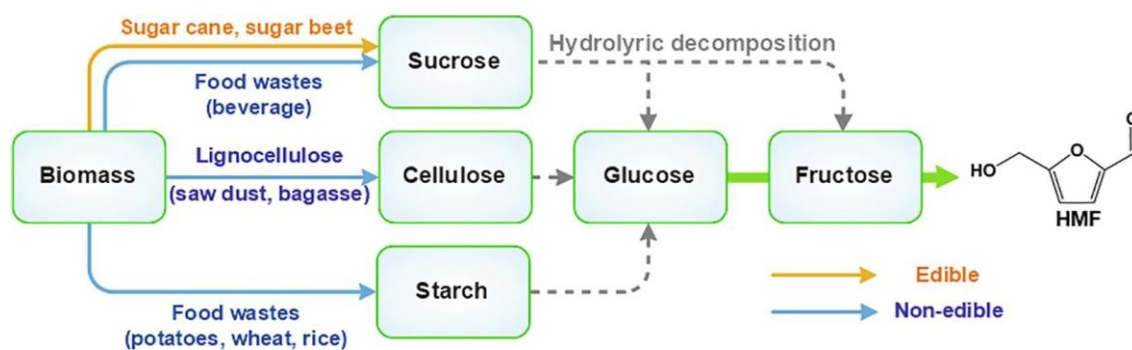


Σχήμα 1: Συνολική επισκόπηση της διεργασίας μετατροπής λιγνινοκυτταρινούχων υλικών σε HMF και παραγωγής FDCA μέσω χημειοκαταλυτικών και βιοκαταλυτικών μεθόδων [27].

2. Θεωρητικό μέρος

2.1. Λιγνινοκυτταρινούχος βιομάζα

Οι πηγές της βιομάζας για τη σύνθεση βιοχημικών προϊόντων μπορούν να χωριστούν σε δύο κατηγορίες: τη βρώσιμη και τη μη βρώσιμη βιομάζα. Τα ζαχαροκάλαμα και τα ζαχαρότευτλα μπορούν να δώσουν σακχαρόζη, αν και η χρήση βρώσιμης βιομάζας για την παραγωγή βιοχημικών προϊόντων είναι αμφιλεγόμενη. Επίσης, τα απορρίμματα τροφίμων, που συνήθως περιέχουν άφθονα σάκχαρα και υδατάνθρακες (π.χ. με τη μορφή αμύλου), μπορούν να αποτελέσουν μια καλή πρώτη ύλη, δεδομένου ότι η σπατάλη τροφίμων, όπως αναφέρει ο Οργανισμός Τροφίμων και Γεωργίας των Ηνωμένων Εθνών (FAO), ανέρχεται παγκοσμίως σε περίπου 1.3 δισεκατομμύρια τόνους ανά έτος με το ποσό αυτό να αναμένεται να αυξηθεί έως και 2.1 δισεκατομμύρια τόνους ετησίως έως το 2030. Ως η πιο ελπιδοφόρα όμως πρώτη ύλη για τη σύνθεση δομικών ενώσεων όπως το HMF θεωρείται η λιγνινοκυτταρινούχος βιομάζα, η οποία ως μη βρώσιμη δεν θέτει το δίλημμα της αξιοποίησής της για χημικά και καύσιμα έναντι τροφής, καθώς αποτελεί μια πιθανή λύση στο πρόβλημα της αξιοποίησης σακχάρων από ύλες που διαφορετικά θα απορρίπτονταν, σε αντίθεση με την περίπτωση της χρήσης σακχάρων πρώτης γενιάς που προέρχονται από τη βιομηχανία τροφίμων. Επίσης, άλλος ένας λόγος για την αξιοποίηση των λιγνινοκυτταρινούχων αποβλήτων έγκειται στο γεγονός ότι η καύση τους σε ανοιχτό χώρο, αν και αποτελεί μια παγκόσμια κοινή πρακτική καθώς αντιπροσωπεύει ένα φθινό, γρήγορο και πρακτικό τρόπο προετοιμασίας του εδάφους για την επόμενη καλλιέργεια, απειλεί τη δημόσια υγεία εξαιτίας των αερίων εκπομπών από τη διαδικασία καύσης του ξύλου και των υπολειμμάτων των καλλιεργειών. Ειδικότερα, η διαδικασία καύσης της λιγνινοκυτταρινούχου βιομάζας σε ανοιχτό χώρο μειώνει την ποιότητα του αέρα, δημιουργώντας ποικίλα προβλήματα υγείας από την απόρριψη καρκινογόνων οξειδίων (NO_x, SO₂ και CO_x) με τις ετήσιες εκπομπές να είναι περίπου 0.37 Tg SO₂, 2,8 Tg NO_x, 1100 Tg CO₂, 67 Tg CO και 3,1 Tg μεθανίου (CH₄)[1,2,38].



Σχήμα 2: Διάφορες πηγές βιομάζας για την παραγωγή HMF [38].

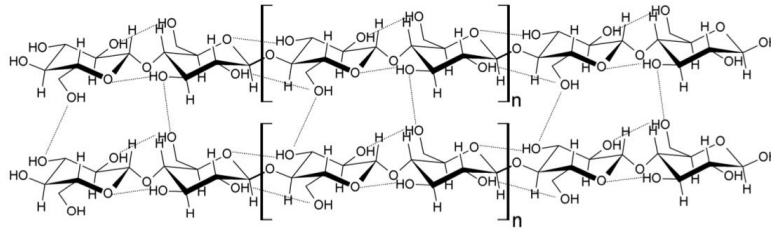
Η λιγνινοκυτταρινούχος βιομάζα ως παραπροϊόν της αγροτικής βιομηχανίας προέρχεται κυρίως από δασικά και γεωργικά κατάλοιπα, όπως άχυρα, κλαδέματα, πριονίδια, προϊόντα υλοτομίας, καθώς επίσης και από πολυετή πόωδη είδη φυτών και ξυλώδεις καλλιέργειες. Αποτελεί την πιο άφθονη ανανεώσιμη

πηγή άνθρακα και ευρέως κατανεμημένη στον πλανήτη, ενώ εκτιμάται ότι η ετήσια παραγωγή της είναι 2×10^{11} τόνοι. Λόγω της περίπλοκης φύσης τους τα λιγνινοκυτταρινούχα υλικά είναι δύσκολα στον χειρισμό και η διαδικασία αποδόμησης του κυτταρικού τοιχώματος των φυτών αποτελεί σοβαρό εμπόδιο για την εκβιομηχάνιση της βιοδιύλισης της λιγνοκυτταρίνης, γι' αυτό απαιτείται κατάλληλη προκατεργασία για να καταστούν περισσότερο διαχειρίσιμα στις διαδικασίες καθαρισμού τελικού προϊόντος (downstream processes). Η περιπλοκότητα της βιομάζας έγκειται στην άκαμπτη δομή του φυτικού κυτταρικού τοιχώματος, ενώ άλλοι παράγοντες που συμβάλλουν στη δυσκολία χειρισμού της είναι η κρυσταλλικότητα της κυτταρίνης, η επιφάνεια που είναι προσβάσιμα τα ένζυμα, η προστασία που προσφέρει η λιγνίνη και ο ετερογενής χαρακτήρας όλων των σωματιδίων βιομάζας [1,7,11].

Συγκεκριμένα, η λιγνινοκυτταρινούχος βιομάζα είναι ένα σύνθετο ετερογενές πολυμερές που αποτελείται κυρίως από δομικούς υδατάνθρακες σε μορφή βιοπολυμερούς, όπως η κυτταρίνη και η ημικυτταρίνη και μη - υδατανθρακικά πολυμερή, όπως η λιγνίνη, ενώ περιέχει επίσης πηκτίνη, πρωτεΐνες, εκχυλίσματα και ανόργανες ενώσεις σε μικρότερες ποσότητες. Οι ακριβείς αναλογίες κάθε κλάσματος μπορεί να ποικίλουν ανάλογα με τον τύπο του τοιχώματος των φυτικών κυττάρων. Τα τρία βασικά συστατικά της λιγνινοκυτταρινούχου βιομάζας δημιουργούν ένα ετερογενές σύμπλεγμα πολυμερών υδατανθράκων (κυτταρίνη και ημικυτταρίνη) και λιγνίνης που συνδέονται μέσω ομοιοπολικών δεσμών και δεσμών υδρογόνου, με αποτέλεσμα τη σκληρή και περίπλοκη δομή της βιομάζας, που είναι αδιάλυτη στο νερό, παρουσιάζει υψηλή αντοχή και ανθεκτικότητα απέναντι σε κατεργασίες και αποτελεί μια σύνθετη μήτρα που έχει προστατευτικό ρόλο για το φυτό, καθώς εμποδίζει την πρόσβαση μικροοργανισμών ή ενζύμων στα δομικά σάκχαρα του κυτταρικού τοιχώματος και κατ' επέκταση την αποδόμησή τους. Ειδικότερα, τα πρωτογενή λεπτά και σχετικά ευλύγιστα κυτταρικά τοιχώματα δύο γειτονικών φυτικών κυττάρων αποτελούνται από κυτταρίνη και ημικυτταρίνη με την πηκτίνη ως κολλώδη ουσία να συγκολλά και να συγκρατεί τα γειτονικά κύτταρα στη θέση τους. Ορισμένα κύτταρα δημιουργούν και ένα δευτερογενές κυτταρικό τοίχωμα που αποτελείται από λιγνίνη, μεταξύ της κυτταρικής μεμβράνης και του πρωτογενούς τοιχώματος, που ισχυροποιεί επιπρόσθετα τη μηχανική υποστήριξη του φυτού. Γενικά, η κυτταρίνη προσδίδει υψηλή αντοχή σε αξονικό εφελκυσμό, ενώ οι ημικυτταρίνες και η λιγνίνη προσδίδουν αντοχή σε κάμψη, θλίψη και κρούση [1,2,6,7,13].

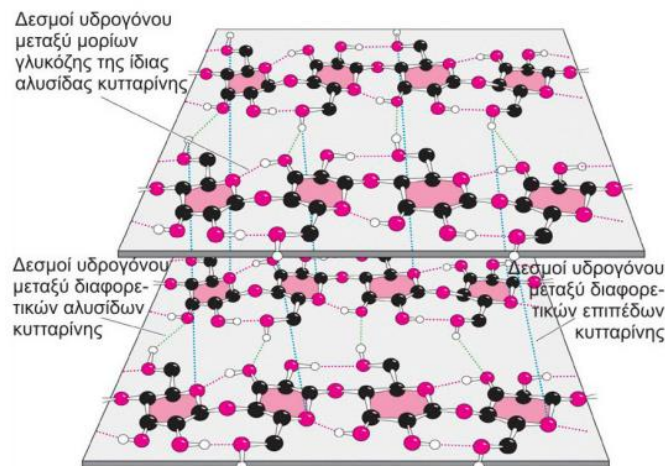
2.1.1 Κυτταρίνη

Το κλάσμα της κυτταρίνης βρίσκεται στη μεγαλύτερη αναλογία στη λιγνινοκυτταρινούχο βιομάζα, δηλαδή 35-55% και θεωρείται το σημαντικότερο δομικό συστατικό του φυτικού κυτταρικού τοιχώματος. Συγκεκριμένα, είναι ένας γραμμικός ομοπολυσακχαρίτης που αποτελείται από μια μακρά αλυσίδα από άνυδρες μονομερικές μονάδες D-γλυκόζης που ενώνονται μεταξύ τους γραμμικά με β-1,4-γλυκοζιδικούς δεσμούς, με την κελλοβιόζη ως τη μικρότερη επαναλαμβανόμενη μονάδα και παρουσιάζει βαθμό πολυμερισμού που εκτείνεται από 5000 έως 15000 μόρια γλυκόζης και μέσο μοριακό βάρος 100000 Da.



Σχήμα 3: Η δομική μονάδα της κυτταρίνης και εντός των αγκυλών η κελλοβιοζή [7].

Ο προσανατολισμός των β-1,4 γλυκοζιδικών δεσμών οδηγεί στον πιθανό σχηματισμό ενδομοριακών και διαμοριακών δεσμών υδρογόνου, οι οποίοι καθιστούν τη φυσική κυτταρίνη πολύ κρυσταλλική, συμπαγή, αδιάλυτη και ανθεκτική σε ένζυμα. Ειδικότερα, ορισμένες από τις αλυσίδες της κυτταρίνης διατάσσονται τακτικά και ευθυγραμμισμένα μεταξύ τους σε παράλληλη επίπεδη διάταξη μέσω δεσμών υδρογόνου προκαλώντας ταυτόχρονα και τον σχηματισμό υδρογονικών δεσμών μεταξύ των παράλληλων επιπέδων κυτταρίνης. Αυτό έχει ως αποτέλεσμα τη δημιουργία μιας κρυσταλλικής και ισχυρής δομής μήτρας και τον σχηματισμό μικροϊνιδίων εξαιτίας της διασταυρούμενης σύνδεσης διαφόρων υδροξομάδων, ενώ άλλες μικρές αλυσίδες κυτταρίνης διασπείρονται σε άμορφα τμήματα. Τα μικροϊνίδια εξασφαλίζουν την ακαμψία του κυτταρικού τοιχώματος των φυτών και έχουν διάμετρο 2-20 nm και μήκος 100 - 40 000 nm, ενώ το καθένα περιέχει μέχρι 36 αλυσίδες κυτταρίνης. Η διαλυτότητα της κρυσταλλικής κυτταρίνης είναι περιορισμένη, ενώ η άμορφη κυτταρίνη υδρολύεται εύκολα με βασικό παράγοντα που ευνοεί τη διαλυτότητα τον βαθμό έκθεσης των β-1,4-γλυκοζιδικών δεσμών στον διαλύτη. Η κυτταρίνη διογκώνεται απεριόριστα, ενώ ο υψηλός δείκτης κρυσταλλικότητας που παρουσιάζει η δομή της, περίπου 70% (ποσοστό βάρους ή όγκου κρυσταλλικών περιοχών σε σχέση με το σύνολο του πολυμερούς το οποίο περιέχει και άμορφες περιοχές), εμποδίζει τη διάσπασή της και ο υψηλός βαθμός πολυμερισμού τη καθιστά λιγότερο εύκαμπτη και αδιάλυτη στο νερό και στους περισσότερους διαλύτες, αν και διαλύεται πλήρως από θειικό, υδροχλωρικό και φωσφορικό οξύ [1,5,6,7,11,13].



Σχήμα 4: Περιπτώσεις υδρογονικών δεσμών που μπορεί να σχηματιστούν στην κυτταρίνη [7].

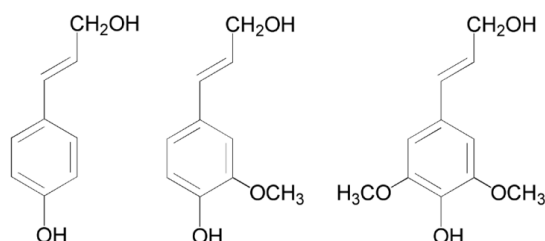
2.1.2 Ημικυτταρίνη

Η ημικυτταρίνη, όπως και η κυτταρίνη, ανήκει στην κατηγορία των πολυμερικών υδατανθράκων της λιγνινοκυτταρινούχου βιομάζας αλλά βρίσκεται σε μικρότερη αναλογία, περίπου 25-35% και παρέχει σύνδεση μεταξύ λιγνίνης και κυτταρίνης. Συγκεκριμένα, αποτελεί ένα βραχύ, πολύ διακλαδισμένο πολυμερές που αποτελείται κυρίως από σάκχαρα πεντοζών (D-ξυλόζης και L-αραβινόζης), από σάκχαρα εξοζών σε μικρές ποσότητες (D-γλυκόζης, D-μαννόζης και D-γαλακτόζης) με 50-200 μονάδες, ενώ μπορεί να περιέχει και οξέα σακχάρων, τα λεγόμενα ουρονικά οξέα (α-D-γλυκουρονικό, α-D-γαλακτουρονικό και α-D-4-O-μεθυλ-γλυκουρονικό οξύ). Σε ορισμένες περιπτώσεις που οι υδροξυλομάδες των σακχάρων είναι μερικώς υποκατεστημένες με ακετυλομάδες, συναντώνται και άλλα σάκχαρα σε μικρή ποσότητα συμπεριλαμβανομένης της α-L-ραμνόζης και της α-L-φρουκτόζης. Η βασική δομή της αλυσίδας αποτελείται κυρίως από β-(1,4) ξυλοζιδικούς δεσμούς που περιλαμβάνουν τη D-ξυλόζη (σχεδόν 90%) και την L-αραβινόζη (περίπου 10%). Επίσης, η ημικυτταρίνη είναι άμορφη και παρουσιάζει χαμηλό βαθμό πολυμερισμού που κυμαίνεται μεταξύ 100-200 και λόγω αυτής της μη κρυσταλλικής της φύσης είναι πιο ευάλωτη σε αποπολυμερισμό από την κυτταρίνη. Ακόμα, έχει υδρόφιλες ιδιότητες και μπορεί εύκολα να διαλυθεί σε νερό, ενώ είναι λιγότερο ανθεκτική σε χημικά. Η ημικυτταρίνη είναι γενικά διεσπαρμένη στην επιφάνεια των μικροϊνών της κυτταρίνης και συνδέεται διασταυρούμενα με τη λιγνίνη προσδίδοντας σταθερότητα στα κυτταρικά τοιχώματα. Υπάρχουν ενδείξεις ότι η ημικυτταρίνη μπορεί να ενώνεται μη ομοιοπολικά με τις ίνες κυτταρίνης, γεγονός που οδηγεί σε μια πολύπλοκη μήτρα που περιορίζει την πρόσβαση κυτταρινασών και ημικυτταρινασών στο σύμπλεγμα αυτό και που παρέχει μηχανική αντοχή στον φυτικό ιστό.

Στην πραγματικότητα ο όρος «ημικυτταρίνη» είναι λανθασμένος, αφού υπάρχουν πολλοί διαφορετικοί τύποι ημικυτταρινών και η κατηγοριοποίησή τους γίνεται συνήθως με βάση το κυριότερο μονομερές σάκχαρο με αποτέλεσμα να διακρίνονται σε γλυκάνες, μαννάνες, αραβινάνες, γαλακτάνες και ξυλάνες. Στη φύση όμως οι ημικυτταρίνες σπάνια αποτελούνται από ένα μόνο τύπο μονοσακχαρίτη, γι' αυτό και συναντώνται πιο περίπλοκες δομές, όπως η γλυκουρονοξυλάνη (ξυλόζη και ουρονικό οξύ), η αραβινογλυκουρονοξυλάνη (αραβινόζη, ξυλόζη και ουρονικό οξύ), η γλυκομαννάνη (ετεροπολυμερές γλυκόζης και μαννόζης), η αραβινογαλακτάνη (ετεροπολυμερές αραβινόζης και γαλακτόζης), η ξυλογλυκάνη (ετεροπολυμερές ξυλόζης και γλυκόζης) και η γαλακτογλυκομαννάνη (ετεροπολυμερές γαλακτόζης, γλυκόζης και μαννόζης). Οι πιο γνωστές από τις ημικυτταρίνες είναι οι ξυλάνες και οι γλυκομαννάνες με τη ξυλάνη να αποτελεί τον δεύτερο πιο άφθονο πολυσακχαρίτη στη φύση μετά την κυτταρίνη. Η ξυλάνη ουσιαστικά λειτουργεί ως συνδετικός ιστός ανάμεσα στην κυτταρίνη και τη λιγνίνη, ώστε να εξασφαλιστεί η συνεκτικότητα και η ακεραιότητα των κυτταρικών τοιχωμάτων και αποτελείται από μια κεντρική αλυσίδα μορίων D-ξυλοπυρανόζης ενωμένων μεταξύ τους με β-1,4-γλυκοζιδικούς δεσμούς. Συνήθως συνδέεται με ομοιοπολικούς δεσμούς με τη λιγνίνη μέσω φαινολικών οξέων και με δεσμούς υδρογόνου με τους άλλους πολυσακχαρίτες. Η δομή της μπορεί να είναι από μια απλή, σχεδόν γραμμική, μη υποκατεστημένη αλυσίδα μέχρι ένα πολύπλοκο σύμπλεγμα ετεροπολυσακχαριτών με πολύ υψηλό βαθμό διακλαδώσεων. Ο σκελετός της συνδέεται μέσω γλυκοζιδικών δεσμών με τους σακχαρικούς υποκαταστάτες και μπορεί να διακλαδίζεται με τα μονομερή του να ενώνονται με ακέτυλο και μεθυλομάδες ή κινναμικά, φερουλικά, γλυκουρονικά και γαλακτουρονικά οξέα που σε μερικές περιπτώσεις είναι εστεροποιημένα με ομάδες οξικού οξέος [1,2,5,6,7,11,13].

2.1.3 Λιγνίνη

Η λιγνίνη που αποτελεί ένα μικρότερο κλάσμα της λιγνινοκυτταρινούχου βιομάζας, με ποσοστό περίπου 15-25%, είναι ένα ετερογενές, άμορφο, άκαμπτο και διασταυρούμενο αρωματικό πολυμερές με μοριακό βάρος 10000 Da. Είναι η πιο άφθονη ουσία που αποτελείται από αρωματικά τμήματα στη φύση και συνίσταται βασικά από τρεις φαινολικές ενώσεις της φαινυλοπροπιονικής αλκοόλης: την κουμαρυλική, την κωνιφερυλική και τη σιναυλική αλκοόλη που ενώνονται μεταξύ τους με διαφορετικούς δεσμούς άνθρακα-άνθρακα και αιθερικούς δεσμούς και βρίσκονται σε διαφορετικές αναλογίες ανάλογα με την προέλευση του φυτού.



Σχήμα 5: Τα φαινυλοπροπάνια της λιγνίνης [7].

Στο τοίχωμα των φυτικών κυττάρων η λιγνίνη συνδέεται ομοιοπολικά με πλευρικές ομάδες (ξυλάνες) σε διαφορετικές ημικυτταρίνες, σχηματίζοντας μια πολύπλοκη μήτρα που περιβάλλει τις μικροΐνες της κυτταρίνης αποτρέποντας την πρόσβαση των κυτταρινολυτικών ενζύμων σε αυτή. Η λιγνίνη παρέχει δομική ενίσχυση, ακαμψία και ανθεκτικότητα στον φυτικό ιστό, εμποδίζοντας την αποδόμησή του από χημικά και ένζυμα. Συγκεκριμένα, η ύπαρξη ισχυρού δεσμού άνθρακα-άνθρακα (C-C) και αιθέρα (C-O-C) στη λιγνίνη προσδίδει αντοχή στο φυτικό κυτταρικό τοίχωμα και προστασία από μικροοργανισμούς. Επίσης, η λιγνίνη είναι άμορφη, έχει πολύ υψηλό βαθμό πολυμερισμού (100 000-300 000), εμφανίζει χαμηλή διόγκωση, είναι υδρόφοβη και δεν μπορεί να διαλυθεί στο νερό λόγω των αρωματικών δακτυλίων της, ενώ υδρολύεται δύσκολα κυρίως με αλκαλικά διαλύματα σε υψηλές θερμοκρασίες (150-180°C).

Ωστόσο, πέρα από τους φυσικούς περιορισμούς, έχει αποδειχθεί ότι η λιγνίνη απορροφά αναντιστρεπτά τις κυτταρινάσες, γεγονός που αποτελεί μια μη παραγωγική δέσμευση του ενζύμου και παράλληλα τις εμποδίζει να έρθουν σε επαφή με την κυτταρίνη. Επιπλέον, οι φαινολικές ομάδες που σχηματίζονται από την αποδόμηση της λιγνίνης απενεργοποιούν τα κυτταρινολυτικά ένζυμα και επομένως επηρεάζουν την ενζυμική υδρόλυση. Ακόμα, τα βιοπολυμερή πολυσακχαριτών (σύμπλεγμα κυτταρίνης-ημικυτταρίνης) ενθυλακώνονται με τη λιγνίνη που σχηματίζει ένα φυσικό φράγμα, το οποίο αυξάνει την αντίσταση σε χημικά και μικροοργανισμούς και εμποδίζει την υδρόλυση στα αναγωγικά σάκχαρα. Έτσι, μια αποτελεσματική ενζυμική επεξεργασία απαιτεί ένα βήμα απολιγνινοποίησης, το οποίο επιτυγχάνεται κυρίως με την προκατεργασία. Εφόσον η λιγνίνη είναι διαλυτή μόνο σε οργανικούς διαλύτες και όχι στο νερό, οι πιο αποτελεσματικές προκατεργασίες για την αφαίρεση της λιγνίνης είναι διεργασίες με οργανικούς διαλύτες καταλυόμενες ή μη από αλκαλικές ενώσεις [1,2,5,6,7,11,13,14].

2.2 Προκατεργασία λιγνινοκυτταρινούχου βιομάζας

Εξαιτίας της πολύπλοκης φυσικοχημικής δομής της λιγνινοκυτταρινούχου βιομάζας η ενζυμική υδρόλυση επηρεάζεται από πολλούς παράγοντες που την εμποδίζουν να διασπαστεί απευθείας. Προκειμένου τα λιγνινοκυτταρινούχα υλικά να καταστούν πιο επιδεκτικά στις ενζυμικές δράσεις είναι απαραίτητο να προηγηθεί ένα στάδιο προκατεργασίας (φυσικής ή/και χημικής), που θα αυξήσει την απόδοση της ενζυμικής μετατροπής στο επόμενο στάδιο. Συγκεκριμένα, η προκατεργασία στοχεύει στην τροποποίηση της άκαμπτης δομής και χημικής σύστασης της βιομάζας, αυξάνοντας την πεπτικότητα της κυτταρίνης ή της ημικυτταρίνης και στην επίτευξη ενός αποδοτικού διαχωρισμού των τριών βασικών συστατικών (κυτταρίνη, ημικυτταρίνη και λιγνίνη), ώστε να αυξηθεί και η απόδοση των εξοζών και πεντοζών που προκύπτουν από την κυτταρίνη και ημικυτταρίνη, αντίστοιχα. Ακόμα, μέσω της προκατεργασίας επιδιώκεται η αύξηση της επιφάνειας και του όγκου των πόρων, όπως επίσης και η μείωση της κρυσταλλικότητας της κυτταρίνης. Η κρυσταλλικότητα και ο βαθμός πολυμερισμού της κυτταρίνης, η περιοχή της επιφάνειας που είναι προσβάσιμη σε ένζυμα και ο βαθμός ακετυλίωσης των ημικυτταρινών είναι οι κύριοι παράγοντες που θεωρείται ότι επηρεάζουν τον ρυθμό της βιολογικής αποικοδόμησης της λιγνοκυτταρίνης από ένζυμα. Σχετικά με την αποικοδόμηση της κυτταρίνης η ημικυτταρίνη και η λιγνίνη θεωρούνται φυσικά εμπόδια γι' αυτό μέσω της σωστής διαδικασίας προκατεργασίας μπορεί να αλλάξει ή να καταστραφεί η δομή τους, ώστε να διευκολυνθεί η ενζυμική υδρόλυση [1,6,7,8,10].

Μερικά από τα ιδανικά χαρακτηριστικά μιας προκατεργασίας είναι η χαμηλή κατανάλωση ενέργειας και πόρων, η οικονομική προσιτότητα και η μηδενική παραγωγή ροής αποβλήτων. Μάλιστα, προκειμένου να είναι χαμηλό το κόστος των αντιδραστήρων που χρησιμοποιούνται, πρέπει να επιδιώκεται η ελαχιστοποίηση του όγκου τους, η χρήση κατάλληλων υλικών κατασκευής για πολύ διαβρωτικά χημικά περιβάλλοντα και οι οικονομικές πιέσεις λειτουργίας. Επίσης, σκοπός της προκατεργασίας είναι να απελευθερώνει την κυτταρίνη και την ημικυτταρίνη από τη μήτρα της λιγνοκυτταρίνης και να επιτυγχάνει μια υψηλή επιδεκτικότητα της κυτταρίνης σε υδρόλυση, με απόδοση υψηλότερη από 90% σε κατά προτίμηση λιγότερο από 3 μέρες. Πρέπει όμως η κυτταρίνη και η ημικυτταρίνη να υφίστανται την ελάχιστη τροποποίηση υπό τις συνθήκες της προκατεργασίας και να ανακτώνται στον μεγαλύτερο κατά το δυνατόν βαθμό, όπως επίσης και η λιγνίνη που μπορεί να αξιοποιηθεί για την παραγωγή άλλων χρήσιμων δευτερευόντων προϊόντων. Επιπλέον, είναι σημαντικό να μη πραγματοποιείται υψηλή αποικοδόμηση των σακχάρων και υψηλή χημική κατανάλωση κατά τη διάρκεια της επεξεργασίας, ενώ είναι επιθυμητή η υψηλή ευελιξία στην πρώτη ύλη και η χρήση πρώτων υλών με υψηλή περιεκτικότητα σε ξηρά ύλη, δηλαδή με χαμηλό περιεχόμενο σε υγρασία, ώστε να μειώνεται η κατανάλωση ενέργειας κατά τη διάρκεια της προκατεργασίας. Ακόμα, θα πρέπει να χαρακτηρίζεται από ασφάλεια στη λειτουργία και χαμηλό κόστος κατασκευής των υλικών και να συμβάλει σε μια οικονομικά αποδοτική καθοδική (downstream) επεξεργασία. Τέλος, λόγω των έντονων συνθηκών κατά τη διάρκεια της προκατεργασίας, η ημικυτταρίνη μπορεί μερικώς να αποδομηθεί, γεγονός που οδηγεί στην παραγωγή τοξικών ενώσεων. Γι' αυτό ένας ακόμη σημαντικός στόχος της προκατεργασίας πρέπει να είναι η ελάχιστη παραγωγή παρεμποδιστικών προϊόντων, όπως φουρανικά παράγωγα, καρβοξυλικά οξέα και φαινολικές ενώσεις, που αποτελούν προϊόντα αποδόμησης των σακχάρων. Φουρανικά παράγωγα θεωρούνται η φουρφοουράλη και η 5-υδροξυμεθυλοφουρφοουράλη, τα οποία δεν θεωρούνται ανεπιθύμητα προϊόντα σε ένα βιοδιυλιστήριο για την παραγωγή φουρανίων, μπορούν όμως να επηρεάσουν την απόδοση των κυτταρινασών, των ημικυτταρινασών και των ισομερασών, μειώνοντας

την απόδοση παραγωγής των σακχάρων. Καρβοξυλικά οξέα που θεωρούνται τοξικά για την ενζυμική υδρόλυση είναι το φορμικό, το οξικό και το λεβουλινικό οξύ, που είναι πιθανό να επηρεάσουν το στάδιο της αφυδάτωσης προς την παραγωγή των φουρανίων, ενώ φαινολικές ενώσεις που επίσης μπορούν να σχηματιστούν είναι αλκοόλες, αλδεΐδες, κετόνες και οξέα [1,4,10,11].

Ο τύπος της προκατεργασίας μπορεί να ποικίλει και εξαρτάται είτε από την προέλευση της βιομάζας είτε από τις καθοδικές (downstream) διεργασίες και το κλάσμα της βιομάζας που ενδιαφέρει κάθε φορά. Γενικά, οι περισσότερες προκατεργασίες στοχεύουν στην καταστροφή των δεσμών μεταξύ των διαφορετικών συστατικών της βιομάζας και αυτό επιτυγχάνεται μέσω υψηλών θερμοκρασιών και πιέσεων ή/και χημικών καταλυτών [1].

2.2.1 Χημικές προκατεργασίες

Η χημική προκατεργασία είναι η πιο γνωστή διεργασία μεταξύ των προκατεργασιών και μπορεί να χωριστεί σε διαφορετικές κατηγορίες ανάλογα με το χημικό αντιδραστήριο που χρησιμοποιείται, το οποίο μπορεί να είναι όξινο, αλκαλικό, οργανικός διαλύτης ή ιοντικό υγρό [1,6].

2.2.1.1 Όξινη προκατεργασία

Ο κύριος στόχος της όξινης προκατεργασίας είναι η διαλυτοποίηση της ημικυτταρίνης και η αποδόμησή της σε πεντόζες (ξυλόζη και αραβινόζη) «ανοίγοντας» την αλυσίδα των δεσμών των ινών της λιγνινοκυτταρίνης με τη χρήση πυκνών ή αραιωμένων διαλυμάτων οξέων. Στην περίπτωση των πυκνών διαλυμάτων οξέων εξαιτίας της διαβρωτικής τους φύσης οι υπερβολικά υψηλές θερμοκρασίες συνεπάγονται υψηλές απαιτήσεις για τον εξοπλισμό της αντίδρασης και η συνακόλουθη δυσκολία για την ανάκτηση των οξέων αυξάνει το κόστος της προκατεργασίας. Για να μειωθεί η ένταση των λειτουργικών συνθηκών και να ακολουθηθεί μια οικονομικά πιο συμφέρουσα προσέγγιση, συνήθως επιλέγεται μια υψηλή συγκέντρωση οξέος σε χαμηλή θερμοκρασία. Από την άλλη, η χρήση αραιωμένων όξινων διαλυμάτων προτιμάται στη βιομηχανία με την εφαρμογή είτε υψηλής θερμοκρασίας (π.χ. 180 °C) για μικρότερο χρονικό διάστημα είτε μικρότερης θερμοκρασίας (π.χ. 120 °C) για υψηλότερο χρόνο παραμονής (30-90 min). Το κύριο πλεονέκτημα της χρήσης αραιωμένων όξινων διαλυμάτων είναι ότι όχι μόνο διαλυτοποιούν την ημικυτταρίνη και κυρίως τη ξυλόζη, αλλά επίσης την υδρολύουν στα μονομερή της σάκχαρα. Παρόλο που η όξινη προκατεργασία οδηγεί σε υψηλές αποδόσεις στην ενζυμική υδρόλυση, η εφαρμογή υψηλών θερμοκρασιών μπορεί να επιφέρει περαιτέρω αποδόμηση των μονοσακχαριτών σε άλλα παρεμποδιστικά παραπροϊόντα, όπως φουράνια, φαινόμενο που παρουσιάζεται πιο έντονα στην περίπτωση της χρήσης πυκνών διαλυμάτων οξέων. Το πιο γνωστό και ευρέως χρησιμοποιούμενο όξινο αντιδραστήριο είναι το διάλυμα θειικού οξέος με θερμοκρασία να κυμαίνεται μεταξύ 100-180 °C και συγκέντρωση του οξέος μεταξύ 0.5-10%. Επίσης, χρησιμοποιούνται το φωσφορικό, το νιτρικό και το υδροχλωρικό οξύ, ενώ ως εναλλακτικές λύσεις παρουσιάζονται και τα οργανικά οξέα μαλαϊκό και φουμαρικό με τα οποία μάλιστα σχηματίζεται λιγότερη ποσότητα φουρφοϋράλης συγκριτικά με το θειικό οξύ [1,4,6].

2.2.1.2 Αλκαλική προκατεργασία

Μέσω της αλκαλικής προκατεργασίας της βιομάζας απομακρύνονται οι ακετυλοσάκχαρες, διαλυτοποιείται η λιγνίνη ή καταστρέφεται η δομή της, ενώ η κυτταρίνη και η ημικυτταρίνη διαλυτοποιούνται ελάχιστα. Έτσι, βελτιώνεται η προσβασιμότητα στην κυτταρίνη και αυξάνεται η αντιδραστικότητα των πολυσακχαριτών. Σε σχέση με την όξινη προκατεργασία η αλκαλική έχει μεγαλύτερη επίδραση στην ενζυμική υδρόλυση, καθώς απομακρύνει το μεγαλύτερο ποσοστό της λιγνίνης από το υπόστρωμα, που αποτελεί τον βασικό παρεμποδιστή στην υδρόλυση και προκαλεί λιγότερη αποικοδόμηση των σακχάρων. Παρ' όλα αυτά ο χρόνος της αντίδρασης είναι σχετικά υψηλός και μετά την ολοκλήρωση της αντίδρασης απαιτείται μια διεργασία εξουδετέρωσης. Ένα κοινό χημικό αντιδραστήριο που χρησιμοποιείται γι' αυτόν τον τύπο προκατεργασίας είναι το NaOH που προκαλεί διόγκωση της κυτταρίνης και μειώνει τον βαθμό πολυμερισμού και κρυσταλλικότητας της κυτταρίνης, γεγονός που οδηγεί σε αποσταθεροποίηση και διαλυτοποίηση της δομής της λιγνίνης. Επίσης, χρησιμοποιείται επιτυχώς το Ca(OH)₂ που καταλύει την απομάκρυνση της λιγνίνης σε συνδυασμό με τη αποακετυλίωση της ημικυτταρίνης και μπορεί εύκολα να ανακτηθεί με μια μεταγενέστερη επεξεργασία με CO₂. Με την απομάκρυνση της άμορφης λιγνίνης αυξάνεται ο δείκτης κρυσταλλικότητας και η αποδοτικότητα των ενζύμων μειώνοντας τα μη ενεργά κέντρα προσρόφησης και αυξάνοντας την προσβασιμότητα στην κυτταρίνη, ενώ με την απομάκρυνση των ακετυλομάδων της ημικυτταρίνης μειώνεται η στερική παρεμπόδιση των ενζύμων και αυξάνεται η επιδεκτικότητα της κυτταρίνης σε υδρόλυση. Ενδιαφέρον παρουσιάζει και η χρήση του H₂O₂ καθώς επιτυγχάνει υψηλή διαλυτοποίηση της λιγνίνης σε θερμοκρασία και πίεση περιβάλλοντος, ενώ επίσης χρησιμοποιούνται Na₂CO₃, NH₃, KOH κ.α. Ακόμα, η χρήση αλκαλικών ενώσεων σε χαμηλές συγκεντρώσεις χρησιμοποιείται συχνά σε φυσικοχημικές προκατεργασίες. Μελέτες που πραγματοποιούνται πάνω στην αλκαλική προκατεργασία αφορούν τη βελτιστοποίηση της απαιτούμενης ποσότητας του αλκαλικού αντιδραστήριου, της θερμοκρασίας και του χρόνου της προκατεργασίας [1,4,6].

2.2.1.3 Προκατεργασία με χρήση οργανικών διαλυτών

Η προκατεργασία που χρησιμοποιεί οργανικούς διαλύτες ή τα υδατικά διαλύματα αυτών έχει στόχο να μεγιστοποιήσει τον διαχωρισμό του δικτύου της κυτταρίνης, της ημικυτταρίνης και της λιγνίνης, να διαλυτοποιήσει τη λιγνίνη και να την απομακρύνει με το υγρό κλάσμα, προκειμένου η κυτταρίνη να καταστεί περισσότερο κατάλληλη για ενζυμική υδρόλυση. Το κύριο πλεονέκτημα αυτής της μεθόδου είναι ότι κατά την εξάτμιση του διαλύτη στο υγρό, η αδιάλυτη στο νερό λιγνίνη ανακτάται σε μια σχετικά καθαρή μορφή ως παραπροϊόν. Επίσης, με τη χρήση οργανικών διαλυτών επιτυγχάνεται η διόγκωση της κυτταρίνης και αυξάνεται η ικανότητα αποδόμησής της. Κοινοί οργανικοί διαλύτες ή τα υδατικά διαλύματα αυτών που χρησιμοποιούνται είναι μεθανόλη, αιθανόλη, ακετόνη, γλυκερίνη, αιθυλενογλυκόλη και τετραϋδροφουράνιο. Για αποδοτικότερο διαχωρισμό της βιομάζας στα συστατικά της η προκατεργασία με τη χρήση οργανικών διαλυτών συχνά συνδυάζεται με άλλους τύπους προκατεργασίας. Με τη χρήση ενός μείγματος νερού και οργανικού διαλύτη είναι δυνατόν να συλλέγεται τόσο ημικυτταρίνη όσο και λιγνίνη σε κάθε διαλύτη αντίστοιχα, καθώς η ημικυτταρίνη είναι διαλυτή στο νερό και η λιγνίνη είναι διαλυτή σε οργανικούς διαλύτες. Ακόμα, αυτά τα μείγματα μπορούν να συνδυαστούν με όξινους καταλύτες (HCl, H₂SO₄, οξαλικό ή σαλικυλικό οξύ), ώστε να διασπαστούν οι

δεσμοί της ημικυτταρίνης, γεγονός που επιφέρει υψηλή απόδοση ξυλόζης ή εναλλακτικά μπορεί να εφαρμοστεί υψηλή θερμοκρασία για μια ικανοποιητική απολιγνινοποίηση. Σύμφωνα με μια μελέτη η μέθοδος κλασμάτωσης της λιγνινοκυτταρίνης ενισχυμένη με συνδιαλύτη, όπου γίνεται χρήση υδατικού διαλύματος τετραϋδροφουρανίου παρουσιάζει σημαντικές βελτιώσεις σε σχέση με την παραδοσιακή προκατεργασία με το διάλυμα θειικού οξέος, ενώ μια άλλη μελέτη χρησιμοποιεί έναν πράσινο διαλύτη του ιμιδαζολίου και ένα ιοντικό υγρό με σκοπό τη βελτιστοποίηση της ενζυμικής υδρόλυσης επιτυγχάνοντας απολιγνινοποίηση 45% (w/v) και αλλαγή στην κρυσταλλικότητα της βιομάζας. Παρόλο που ο συγκεκριμένος τύπος προκατεργασίας παρουσιάζει χαμηλή τοξικότητα και είναι φιλικός προς το περιβάλλον, έχει υψηλό κόστος και απαιτεί την ανάκτηση του οργανικού διαλύτη, προκειμένου να μην δρα παρεμποδιστικά στην ακόλουθη ενζυμική υδρόλυση και να μειωθούν τα λειτουργικά κόστη. Γενικώς, προτιμώνται διαλύτες που μπορούν εύκολα να διαχωριστούν με χαμηλό μοριακό βάρος και σημείο βρασμού, όπως η αιθανόλη και η μεθανόλη. Σε ένα βιοδιυλιστήριο παραγωγής φουρανίων η προκατεργασία με τη χρήση οργανικών διαλυτών είναι μια πολλά υποσχόμενη διεργασία, καθώς προκύπτουν κλάσματα ελεύθερα λιγνίνης και ειδικότερα ένα στερεό κλάσμα πλούσιο σε κυτταρίνη και ένα υγρό κλάσμα πλούσιο σε ημικυτταρίνη, που χρησιμοποιούνται για την παραγωγή υδροξυμεθυλοφουρφουράλης και φουρφουράλης αντίστοιχα [1,4,6].

2.2.1.4 Οζονόλυση

Το όζον αποτελεί ένα ισχυρό οξειδωτικό που παρουσιάζει υψηλή αποτελεσματικότητα απολιγνινοποίησης, με αποτέλεσμα της αύξηση της απόδοσης. Η προκατεργασία αυτή πραγματοποιείται συνήθως σε θερμοκρασία δωματίου και κανονική πίεση και δεν οδηγεί στον σχηματισμό παρεμποδιστικών ενώσεων που μπορούν να επηρεάσουν την επακόλουθη υδρόλυση. Ένα σημαντικό μειονέκτημα όμως είναι οι μεγάλες απαιτούμενες ποσότητες όζοντος, οι οποίες μπορούν να καταστήσουν τη μέθοδο οικονομικά μη βιώσιμη [4].

2.2.1.5 Προκατεργασία με χρήση ιοντικών υγρών

Η χρήση ιοντικών υγρών ως διαλυτών για την προκατεργασία της λιγνινοκυτταρινούχου βιομάζας έχει προσελκύσει πρόσφατα το επιστημονικό ενδιαφέρον. Τα ιοντικά υγρά είναι άλατα, τα οποία κατά κύριο λόγο αποτελούνται από μεγάλα οργανικά κατιόντα και μικρά ανόργανα ανιόντα, τα οποία βρίσκονται σε υγρή μορφή σε σχετικά χαμηλές θερμοκρασίες, συνήθως σε θερμοκρασία δωματίου. Οι ιδιότητές τους ως διαλύτες μπορούν να μεταβληθούν προσαρμόζοντας το ανιόν και τα αλκυλο συστατικά του κατιόντος. Κάποιες από τις ενδιαφέρουσες ιδιότητες αυτής της προκατεργασίας είναι η χημική και θερμική σταθερότητα, η μηδενική αναφλεξιμότητα, οι χαμηλές πιέσεις των ατμών και η ικανότητα διατήρησης της υγρής φάσης σε ένα ευρύ πεδίο θερμοκρασιών, ενώ δεδομένου ότι δεν σχηματίζονται τοξικά ή εκρηκτικά αέρια, τα ιοντικά υγρά θεωρούνται «πράσινοι» διαλύτες. Για την περίπτωση της λιγνινοκυτταρινούχου βιομάζας, οι υδατάνθρακες και η λιγνίνη μπορούν να διαλυθούν ταυτόχρονα σε ιοντικά υγρά με δράση ανιόντων, αφού δημιουργούνται δεσμοί υδρογόνου μεταξύ των άνυδρων χλωριούχων ιόντων των ιοντικών υγρών και των πρωτονίων υδροξυλίου των σακχάρων σε στοιχειομετρική αναλογία 1:1. Έτσι, διαταράσσεται με αποτελεσματικό τρόπο το περίπλοκο δίκτυο μη

ομοιοπολικών αλληλεπιδράσεων μεταξύ της κυτταρίνης, της ημικυτταρίνης και της λιγνίνης, ενώ ελαχιστοποιείται ο σχηματισμός παραπροϊόντων. Για την μεγάλης κλίμακας εφαρμογή αυτού του είδους προκατεργασίας είναι σημαντική η ανάπτυξη ενεργειακά αποδοτικών μεθόδων ανακύκλωσης των ιοντικών υγρών και η απομάκρυνση των υπολειμμάτων τους, καθώς διαφορετικά μπορεί να επηρεαστεί αρνητικά η δραστηριότητα των κυτταρινασών και κατ' επέκταση να παρατηρηθεί μείωση των τελικών συγκεντρώσεων των σακχάρων. Επίσης, απαιτείται επιπλέον έρευνα για τη βελτίωση των οικονομικών της προκατεργασίας με χρήση ιοντικών υγρών προτού εφαρμοστούν σε βιομηχανική κλίμακα, καθώς η τεχνολογία είναι ακόμη ακριβή και οι εμπορικές μέθοδοι ανάκτησης των ιοντικών υγρών δεν έχουν αναπτυχθεί πλήρως. Πάντως παρά τους περιορισμούς που εμφανίζει η μέθοδος αυτή, με περαιτέρω μελέτη τα ιοντικά υγρά φαίνεται να προσφέρουν μεγάλες δυνατότητες στην προκατεργασία της λιγνινοκυτταρινούχου βιομάζας [4].

2.2.2 Φυσικές προκατεργασίες

2.2.2.1 Μηχανική προκατεργασία

Συγκριτικά με τις μεθόδους χημικής προκατεργασίας οι φυσικές προκατεργασίες αποτελούν απλούστερες διεργασίες και δεν παράγουν υγρά χημικά απόβλητα, γεγονός που τις καθιστά φιλικότερες προς το περιβάλλον. Μέσω της μηχανικής προκατεργασίας αυξάνεται η διαθέσιμη προς ενζυμική υδρόλυση επιφάνεια των μορίων και ο όγκος των πόρων, ενώ μειώνεται η κρυσταλλικότητα και ο βαθμός πολυμερισμού της κυτταρίνης. Η μηχανική άλεση που πραγματοποιείται έχει σκοπό τη μείωση του μεγέθους των μορίων στην κλίμακα των φυτών (>1 mm) ή στην κλίμακα των ιστών (100-500 μm) που συνεπάγεται αύξηση της διαθέσιμης ειδικής επιφάνειας και ενίσχυση της προσβασιμότητας των υδρολυτικών ενζύμων. Συγκεκριμένα, έχει μελετηθεί ότι η διαφορά στο μέγεθος των κόκκων επιδρά στις δομικές ιδιότητες του υποστρώματος και στις αποδόσεις της ενζυμικής υδρόλυσης με υψηλότερη αποδοτικότητα της υδρόλυσης και απόδοση γλυκόζης για μικρότερο μέγεθος μορίων της βιομάζας, ειδικά αν συνδυαστεί με αποτελεσματικές τεχνικές ανάδευσης. Παρ' όλα αυτά η μηχανική κατεργασία παρουσιάζει υψηλές ενεργειακές απαιτήσεις, ειδικά στην περίπτωση που το ζητούμενο μέγεθος μορίων είναι ιδιαίτερα μικρό και μεμονωμένα δεν επηρεάζει σημαντικά την ενζυμική πέψη, γι' αυτό και χρησιμοποιείται σε συνδυασμό με άλλες χημικές προκατεργασίες ώστε να επιτευχθεί μια ικανοποιητική παραγωγή [1,4,6,8,11].

2.2.2.2 Προκατεργασία μέσω εξώθησης (extrusion)

Στην περίπτωση της εξώθησης τα υλικά εκτίθενται σε θέρμανση, ανάδευση και άλεση, που επιφέρουν φυσικές και χημικές αλλαγές καθώς αυτά διαπερνούν από τον εξωθητή [4].

2.2.2.3 Εναλλακτικές φυσικές προκατεργασίες

Φυσικές προκατεργασίες όπως η χρήση μικροκυμάτων, υπερήχων και ακτινοβολίας του φωτός αποτελούν εναλλακτικές μεθόδους έναντι της συμβατικής άλεσης και εφαρμόζονται για να βελτιώσουν την αποδοτικότητα της υδρόλυσης. Αυτές οι μέθοδοι χρησιμοποιούν κατά κύριο λόγο τις φυσικές δυνάμεις των μικροκυμάτων, της τυρβώδους ροής και των υπερηχητικών κυμάτων και έχουν σκοπό να διαταράξουν την δομή της βιομάζας ώστε τελικά να διαλυθεί η λιγνίνη και να απελευθερωθεί η κυτταρίνη.

2.2.2.3.1 Προκατεργασία με χρήση μικροκυμάτων

Η προκατεργασία της βιομάζας μέσω ακτινοβολίας με μικροκύματα ή μέσω φυσικοχημικών μεθόδων που χρησιμοποιούν μικροκύματα έχει προσελκύσει ιδιαίτερο ενδιαφέρον τα τελευταία χρόνια λόγω της υψηλής αποδοτικότητας στη θέρμανση και της εύκολης λειτουργίας. Επιπλέον, παρουσιάζει μικρό χρόνο προκατεργασίας, προσφέρει εκλεκτική αλληλεπίδραση με τις ενεργές ομάδες, στιγμιαίο και ακριβή έλεγχο και επιταχύνει τον ρυθμό της αντίδρασης. Επίσης, η προκατεργασία με μικροκύματα επιτυγχάνει υψηλές θερμοκρασίες σε ατμοσφαιρική πίεση σε αντίθεση με την έκρηξη ατμού, η οποία απαιτεί υψηλές πιέσεις που ακολουθούνται από απότομη πτώση πίεσης. Ωστόσο, παρουσιάζει και κάποιες αδυναμίες, όπως άνιση κατανομή της ενέργειας των μικροκυμάτων, υπερθέρμανση, μη ομοιόμορφη θέρμανση ή απώλεια θερμότητας και ανάγκη για ηλεκτρική ενέργεια. Ακόμα, απαιτείται υψηλή επένδυση κεφαλαίου για τον εξοπλισμό των μικροκυμάτων, αν και τα λειτουργικά κόστη είναι χαμηλά συγκριτικά με τις συμβατικές μεθόδους θέρμανσης.

Ειδικότερα, τα μικροκύματα είναι ηλεκτρομαγνητικά κύματα που κυμαίνονται σε ένα εύρος συχνοτήτων από 300 MHz (3×10^8 κύκλοι/s) έως 300 GHz (3×10^{11} κύκλοι/s), τα οποία αλληλεπιδρούν με τα πολικά μόρια και τα ιόντα στο υλικό και έχουν ως αποτέλεσμα τόσο θερμικές όσο και μη θερμικές επιδράσεις που προκαλούν φυσικές, χημικές ή βιολογικές αντιδράσεις. Οι επιδράσεις αυτές μπορούν να προκαλέσουν κλασμάτωση και διόγκωση, καθώς η θέρμανση με μικροκύματα έχει την ικανότητα να προκαλεί εκρήξεις μεταξύ των σωματιδίων και ως εκ τούτου να ενισχύει την αποδόμηση των άκαμπτων δομών. Επειδή στην περίπτωση των μικροκυμάτων η θερμότητα παράγεται εσωτερικά μέσω της άμεσης αλληλεπίδρασης μεταξύ του ηλεκτρομαγνητικού πεδίου και των συστατικών του θερμαινόμενου υλικού, δηλαδή τα μικροκύματα συνδέονται απευθείας με τα μόρια ολόκληρου του μείγματος της αντίδρασης, η θέρμανση είναι γρήγορη και η ενεργειακή μετατροπή της ακτινοβολίας των μικροκυμάτων σε παραγωγή θερμότητας γίνεται μέσω του συνολικού όγκου του υλικού στόχου παρά μέσω της επιφάνειας του υλικού, όπως συμβαίνει με τη συμβατική θέρμανση που αποτελεί μια αργή και αναποτελεσματική μέθοδο μεταφοράς ενέργειας στο σύστημα της αντίδρασης.

Η προκατεργασία με τη χρήση μικροκυμάτων μπορεί να συνδυαστεί με μηχανική προκατεργασία, με έκρηξη ατμού και με χημική προκατεργασία τόσο αλκαλική όσο και όξινη. Σχετικά με τη χημική προκατεργασία η βιομάζα προστίθεται σε αραιωμένα χημικά αντιδραστήρια και ο πολτός εκτίθεται σε ακτινοβολία μικροκυμάτων για χρόνους παραμονής που κυμαίνονται από 5 έως 20 min. Τα αλκαλικά διαλύματα απομακρύνουν τη λιγνίνη και τα όξινα την ημικυτταρίνη, με αποτέλεσμα στην πρώτη περίπτωση να λαμβάνεται ένα στερεό υπόλειμμα το οποίο κατά την ενζυμική υδρόλυση δίνει τόσο εξόζες

όσο και πεντόζες, ενώ στη δεύτερη περίπτωση να παρεμποδίζεται η ενζυμική υδρόλυση από τη λιγνίνη που βρίσκεται στο στερεό κλάσμα, μειώνοντας την απόδοσή της. Σύμφωνα με μελέτες τα αλκαλικά θεωρούνται τα κατάλληλα χημικά αντιδραστήρια για την προκατεργασία με βάση τα μικροκύματα με πιο αποτελεσματικό το NaOH. Επίσης, μπορεί να εφαρμοστεί χημική προκατεργασία σε συνδυασμό με μικροκύματα όχι ενός αλλά δύο σταδίων, όπου θα χρησιμοποιούνται μαζί με τα μικροκύματα τόσο αλκαλικά όσο και όξινα διαλύματα.

Είναι σημαντικό να χρησιμοποιούνται ελεγχόμενες συνθήκες κατά την προκατεργασία με μικροκύματα, ώστε να μειώνεται η ενεργειακή κατανάλωση και να επιτυγχάνεται υψηλότερη παραγωγή προϊόντος. Οι βασικότερες λειτουργικές παράμετροι που επηρεάζουν την απόδοση της ενζυμικής υδρόλυσης μετά από προκατεργασία με μικροκύματα είναι η ποσότητα της βιομάζας που κατεργάζεται, η ισχύς της ακτινοβολίας των μικροκυμάτων, ο χρόνος έκθεσης στην ακτινοβολία και ο σχηματισμός παραπροϊόντων. Η συγκέντρωση της βιομάζας στην προκατεργασία είναι ένας πολύ σημαντικός παράγοντας, γι' αυτό και η επιλογή της κατάλληλης συγκέντρωσης υποστρώματος μπορεί να ενισχύσει τη δράση της προκατεργασίας διευκολύνοντας τη διάλυση της βιομάζας. Έχει μελετηθεί ότι η υδρόλυση της κυτταρίνης και της ημικυτταρίνης βελτιώνεται με μια αύξηση στη συγκέντρωση του υποστρώματος στις μεσαίες τιμές, ενώ μια περαιτέρω αύξηση στη συγκέντρωση του υποστρώματος μπορεί να επιφέρει σταδιακή μείωση στην απόδοση της υδρόλυσης. Αυτό συμβαίνει γιατί όταν χρησιμοποιείται υψηλή συγκέντρωση βιομάζας, επομένως σχετικά χαμηλότερη συγκέντρωση νερού, η βιομάζα θα λάβει λιγότερη από την ενέργεια που απορροφάται από τα μόρια νερού λόγω των ταλαντώσεών τους, γεγονός που δυσχεραίνει την καταστροφή της δομής της βιομάζας. Έτσι, η επιδεκτικότητα της βιομάζας σε υδρόλυση αυξάνεται όταν επιλέγονται χαμηλότερες αρχικές ποσότητες βιομάζας και υπάρχει η απαιτούμενη υγρασία στην πρώτη ύλη. Ένας επιπλέον βασικός παράγοντας που επηρεάζει την αποτελεσματικότητα της προκατεργασίας με μικροκύματα είναι η ισχύς της ακτινοβολίας που εφαρμόζεται. Αντίθετα με τη συμβατική θέρμανση οι πυκνότητες ισχύος στην ακτινοβολία με μικροκύματα είναι υψηλότερες, γεγονός που επιδρά θετικά στην προκατεργασία. Επίσης, με κάποιους περιορισμούς, αυξάνοντας το επίπεδο ισχύος των μικροκυμάτων μπορεί να μειωθεί ο απαιτούμενος χρόνος προκατεργασίας. Καθώς η θερμοκρασία αυξάνεται, ο βαθμός πολυμερισμού της κυτταρίνης μειώνεται και οι μακρές αλυσίδες της κυτταρίνης διασπώνται σε μικρότερες ομάδες μορίων, ενώ επίσης απελευθερώνεται γλυκόζη που αποδομείται σε υδροξυμεθυλοφουρφουράλη. Γι' αυτό είναι απαραίτητο να βρεθεί η κατάλληλη ισχύς ακτινοβολίας, προκειμένου να αποφευχθεί η περιττή κατανάλωση ενέργειας ή η αποικοδόμηση χρήσιμων συστατικών. Όπως προκύπτει από τα παραπάνω και ο χρόνος προκατεργασίας είναι μια ακόμη κρίσιμη παράμετρος που επηρεάζει την επιδεκτικότητα της βιομάζας σε υδρόλυση. Μάλιστα, μια εκτεταμένη διάρκεια έκθεσης στην ακτινοβολία σε συνδυασμό με μια υψηλή ισχύ μικροκυμάτων μπορεί να οδηγήσει σε αποδόμηση των σακχάρων που απελευθερώνονται λόγω των υψηλών θερμοκρασιών που δημιουργούνται. Τέλος, λόγω του σχηματισμού παρεμποδιστών, όπως φουρφουράλης, υδροξυμεθυλοφουρφουράλης, ασθενών οξέων και φαινολικών μορίων, απαιτείται καθαρισμός της πρώτης ύλης μετά την προκατεργασία [4,8,9,10].

2.2.2.3.2 Προκατεργασία με χρήση υπερήχων

Η προκατεργασία της λιγνινοκυτταρινούχου βιομάζας με χρήση υπερήχων εφαρμόζεται για την εξαγωγή της κυτταρίνης, της ημικυτταρίνης και της λιγνίνης και έχει ως αποτέλεσμα υψηλές αποδόσεις ενζυμικής υδρόλυσης. Αυτό μπορεί να αιτιολογηθεί καθώς λόγω της σπηλαίωσης που προκαλείται από την εισαγωγή των υπερήχων στο διάλυμα των ενζύμων, ενισχύεται σημαντικά η μεταφορά των μακρομορίων των ενζύμων στην επιφάνεια του υποστρώματος. Ακόμα, οι μηχανικές επιδράσεις εξαιτίας της κατάρρευσης των φυσαλίδων σπηλαίωσης συμβάλλουν στο «άνοιγμα» της επιφάνειας των στερεών υποστρωμάτων στη δράση των ενζύμων. Πάντως, τα καλύτερα αποτελέσματα από την σπηλαίωση παρατηρούνται στους 50°C, που αποτελεί και βέλτιστη θερμοκρασία για πολλά ένζυμα [4].

2.2.3 Φυσικοχημικές προκατεργασίες

Οι φυσικοχημικές προκατεργασίες στοχεύουν στην αλλαγή της σύστασης και της δομής του υποστρώματος μέσω της διπλής δράσης φυσικών και χημικών μεθόδων, καθώς η βιομάζα κατεργάζεται ταυτόχρονα υπό υψηλές θερμοκρασίες και πιέσεις και με τη χρήση χημικών ενώσεων ως καταλύτες. Οι πιο γνωστές κατεργασίες αυτής της κατηγορίας είναι η υδροθερμική, η έκρηξη ατμού και η έκρηξη αμμωνίας [1,6].

2.2.3.1 Υδροθερμική προκατεργασία

Η υδροθερμική προκατεργασία είναι μια πράσινη κατεργασία που αναπτύχθηκε ραγδαία τα τελευταία χρόνια και περιλαμβάνει την προκατεργασία της λιγνινοκυτταρινούχου βιομάζας με νερό υψηλής θερμοκρασίας. Παρόλο όμως που οι απαιτήσεις σε εξοπλισμό είναι μικρές και το κόστος χαμηλό, η απαιτούμενη θερμοκρασία της αντίδρασης είναι σχετικά υψηλή (περίπου 120-250°C) και για τον λόγο αυτό παρατηρείται παραγωγή περισσότερων παραπροϊόντων. Έτσι, η μείωση της απαιτούμενης θερμοκρασίας και του χρόνου της αντίδρασης είναι αντικείμενα έρευνας για την συγκεκριμένη προκατεργασία. Ακόμα, δεδομένου ότι η περιεκτικότητα σε νερό είναι υψηλή, το διάλυμα των σακχάρων που προκύπτει από την προκατεργασία είναι αραιωμένο, καθιστώντας τη διεργασία περισσότερο ενεργοβόρα [6,7].

2.2.3.1.1 Προκατεργασία με έκρηξη ατμού

Η προκατεργασία με έκρηξη ατμού αποτελεί μια υδροθερμική κατεργασία, όπου η βιομάζα εκτίθεται σε ατμό υψηλής πίεσης (14-60 atm) και θερμοκρασίας (160-270°C) για συγκεκριμένο χρονικό διάστημα (20s-10min) που ακολουθείται από μια απότομη αποσυμπίεση. Αυτή η εκτονωτική αποσυμπίεση σε συνδυασμό με την αυτοϋδρόλυση των ακετυλομάδων της ημικυτταρίνης λόγω της υψηλής θερμοκρασίας που οδηγεί στον σχηματισμό οξικών οξέων, επιφέρει τη μηχανική ρήξη των πολυμερών

του φυτικού κυτταρικού τοιχώματος που έχει ως αποτέλεσμα την απομάκρυνση της ημικυτταρίνης στον υδατικό διαλύτη, την μερική απομάκρυνση ή/και ανακατανομή της λιγνίνης και την ταυτόχρονη βελτίωση του δυναμικού αποικοδόμησης της κυτταρίνης. Μάλιστα, ο ατμός σε θερμοκρασία άνω των 170 °C μπορεί να μαλακώσει την ημικυτταρίνη και τη λιγνίνη, ενώ η ξαφνική πτώση των υψηλών πιέσεων στην ατμοσφαιρική πίεση μπορεί να διαχωρίσει τις ίνες του υλικού, αυξάνοντας την προσβασιμότητα των ενζύμων στην κυτταρίνη στο μεταγενέστερο βήμα της υδρόλυσης. Συγκριτικά με την προκατεργασία με ατμό, η έκρηξη ατμού χαρακτηρίζεται από γρήγορη ελάττωση της πίεσης και ψύξη της βιομάζας στο τέλος της προκατεργασίας που αναγκάζει το νερό που περιέχεται στη βιομάζα να εκραγεί. Γενικώς, η προκατεργασία με έκρηξη ατμού είναι μια διεργασία φιλική προς το περιβάλλον με χαμηλό κόστος επένδυσης κεφαλαίου και διαχείρισης αποβλήτων, αλλά έχει υψηλές απαιτήσεις σε θερμοκρασία και πίεση που συνεπάγεται υψηλή ενεργειακή κατανάλωση, κρυσταλλικότητα κυτταρίνης και αποικοδόμηση των σακχάρων, ενώ επίσης παρουσιάζει και μεγάλο χρόνο κατεργασίας. Έτσι, μελέτες επικεντρώνονται στη μείωση του χρόνου παραμονής και στη βελτιστοποίηση των θερμοκρασιακών συνθηκών ώστε να αντιμετωπίσουν τα μειονεκτήματα που παρουσιάζει μέχρι τώρα η προκατεργασία με έκρηξη ατμού. Επίσης, λόγω του συχνού σχηματισμού οξικού οξέος εξαιτίας της έκθεσης των ακετυλομάδων της ημικυτταρίνης σε υψηλές θερμοκρασίες, προτείνεται η χρήση οξέος σε χαμηλές συγκεντρώσεις προκειμένου να αυξηθεί η αποδόμηση της ημικυτταρίνης. Τοξικές ενώσεις επίσης που παρεμποδίζουν είναι τα φουράνια, όπως φουρφουράλη και υδροξυμεθυλοφουρφουράλη, οι οποίες με περαιτέρω αποικοδόμηση σχηματίζουν φορμικό και λεβουλικό οξύ[1,4,6,7,9].

Επιπλέον, η έκρηξη ατμού μπορεί να συνδυάζεται με την προσθήκη όξινου καταλύτη, ώστε να αυξηθεί η επιδεκτικότητα της κυτταρίνης σε υδρόλυση, να βελτιωθεί η υδρόλυση της ημικυτταρίνης και ανάλογα με τη θερμοκρασία να μειωθεί και ο σχηματισμός παρεμποδιστικών ενώσεων. Αν και η προσθήκη όξινου καταλύτη συνδέεται με αυξημένο κόστος εξοπλισμού, η εξωτερική προσθήκη όξινου καταλύτη όπως η περίπτωση της έκρηξης με SO₂ έχει αποδειχθεί ιδιαίτερα αποτελεσματική. Συγκεκριμένα, το λιγνινοκυτταρινούχο υλικό πριν την προκατεργασία με εκτόνωση ατμού εμποτίζεται με 0.5-6% (w/w) H₂SO₄ ή SO₂ σε θερμοκρασία ατμού 175-215°C για 2-10 min. Κατά τη διάρκεια της παροχής ατμού το SO₂ μετατρέπεται σε H₂SO₄ που αποτελεί και τον όξινο καταλύτη. Μάλιστα, η χρήση του SO₂ πλεονεκτεί σε σύγκριση με αυτή του H₂SO₄, καθώς εμποτίζει καλύτερα και γρηγορότερα το υλικό [4,7].

Για την αποφυγή του σχηματισμού παρεμποδιστών και για τη ταυτόχρονη μεγιστοποίηση της ανάκτησης των σακχάρων μπορούν να εφαρμοστούν διεργασίες δύο σταδίων. Στο πρώτο στάδιο σε σχετικά ήπιες συνθήκες (θερμοκρασία χαμηλότερη των 180°C) διαλυτοποιείται το κλάσμα της ημικυτταρίνης, ενώ στο δεύτερο στάδιο εφαρμόζεται εκτόνωση ατμού σε υψηλότερη θερμοκρασία (μεγαλύτερη των 210°C) στο κλάσμα της κυτταρίνης. Για την εφαρμογή της προκατεργασίας με ατμό/έκρηξη ατμού είναι σημαντικό οι πόροι της λιγνινοκυτταρινούχου πρώτης ύλης να μην περιέχουν υπερβολικό ποσό υγρασίας, καθώς διαφορετικά ο ατμός δεν θα μπορεί να διεισδύσει και η μεταφορά θερμότητας θα γίνεται μέσω αγωγής, γεγονός που καθυστερεί την έναρξη της αυτοϋδρόλυσης [7].

2.2.3.1.2 Προκατεργασία με υγρό καυτό νερό

Η προκατεργασία με υγρό καυτό νερό είναι μια ακόμη υδροθερμική κατεργασία κατά την οποία η βιομάζα εκτίθεται σε υψηλές θερμοκρασίας (160-240°C) χωρίς όμως το στάδιο της απότομης αποσυμπίεσης και χωρίς τη χρήση καταλυτών ή χημικών. Η πίεση εφαρμόζεται προκειμένου να διατηρήσει το νερό στην υγρή κατάσταση στις υψηλές θερμοκρασίες και να προκαλέσει αλλαγές στη δομή της λιγνινοκυτταρινούχου βιομάζας. Ο κύριος στόχος αυτής της μεθόδου είναι η διαλυτοποίηση και απομάκρυνση της ημικυτταρίνης και η αποφυγή σχηματισμού παρεμποδιστών. Η πούλπα που προκύπτει από την προκατεργασία μπορεί να διαχωριστεί σε δύο κλάσματα, ένα στερεό πλούσιο σε κυτταρίνη και ένα υγρό πλούσιο σε σάκχαρα που προέρχονται από την ημικυτταρίνη. Προκειμένου να αποφευχθεί ο σχηματισμός παρεμποδιστών, είναι σημαντικό το pH να παραμένει μεταξύ 4 και 7 κατά την προκατεργασία, καθώς σε αυτά τα pH τα σάκχαρα που προέρχονται από την ημικυτταρίνη διατηρούν την ολιγομερική μορφή τους και περιορίζεται ο σχηματισμός μονομερών. Μέσω της συγκεκριμένης προκατεργασίας έχει αποδειχθεί ότι απομακρύνεται το 80% της ημικυτταρίνης, καθώς επίσης αποπολυμερίζεται μερικώς και διαλυτοποιείται η λιγνίνη, χωρίς όμως να μπορεί να επιτευχθεί πλήρης απολιγνινοποίηση εξαιτίας της επανασυμπύκνωσης των διαλυτών συστατικών που προέρχονται από τη λιγνίνη. Βασικό πλεονέκτημα της μεθόδου είναι το χαμηλό κόστος, μιας και δεν απαιτείται η χρήση καταλυτών και το κόστος κατασκευής των αντιδραστήρων δεν είναι υψηλό λόγω του χαμηλού κινδύνου διάβρωσης. Επίσης, εφόσον η ποσότητα του νερού είναι μεγάλη, η συγκέντρωση των διαλυτοποιημένων προϊόντων της ημικυτταρίνης και της λιγνίνης είναι χαμηλή, άρα και η συγκέντρωση παρεμποδιστών είναι μικρότερη. Ωστόσο, οι υψηλές ενεργειακές απαιτήσεις και οι απαιτήσεις σε νερό αποθαρρύνουν την εφαρμογή της προκατεργασίας με υγρό καυτό νερό σε βιομηχανική κλίμακα [1,4].

2.2.3.2 Προκατεργασία με έκρηξη αμμωνίας (Ammonia Fiber Expansion, AFEX)

Η προκατεργασία με έκρηξη αμμωνίας ακολουθεί την ίδια φιλοσοφία με την έκρηξη ατμού, χρησιμοποιώντας υγρή άνυδρη αμμωνία σε ήπιες θερμοκρασίες που κυμαίνονται μεταξύ 60-100°C και σε υψηλές πιέσεις (πάνω από 3 MPa) που ακολουθούνται από ραγδαία αποσυμπίεση. Η απότομη εκτόνωση της αμμωνίας οδηγεί σε ένα συμπαγή πολτό που οι ίνες της κυτταρίνης έχουν διογκωθεί και είναι λιγότερο κρυσταλλικές. Παρόλο που αυτή η διεργασία απομακρύνει μόνο μια μικρή ποσότητα από το κλάσμα της ημικυτταρίνης και της λιγνίνης, φαίνεται ότι διασπάει τους δεσμούς της λιγνίνης και αυξάνει την επιδεκτικότητα του υλικού σε ενζυμική υδρόλυση, γι' αυτό και είναι αποτελεσματική για υλικά που περιέχουν μικρό ποσοστό λιγνίνης. Επίσης, με τη συγκεκριμένη μέθοδο η ενζυμική υδρόλυση με την προσθήκη μικρών ποσοτήτων ενζύμων παρουσιάζει καλύτερα αποτελέσματα συγκριτικά με άλλα είδη προκατεργασιών. Αυτό μπορεί να συμβαίνει γιατί η αμμωνία επηρεάζει τη λιγνίνη και πιθανόν και την ημικυτταρίνη με διαφορετικό τρόπο από άλλες χημικές ουσίες, μειώνοντας την ικανότητα της λιγνίνης να απορροφά τα ένζυμα και να καθιστά πιο δύσκολη την πρόσβασή τους στην κυτταρίνη. Ένα σημαντικό πλεονέκτημα της μεθόδου είναι ο περιορισμένος σχηματισμός παραπροϊόντων, όπως φαινολικά τμήματα της λιγνίνης, που μπορούν να παρεμποδίσουν τις καθοδικές βιολογικές διεργασίες, αλλά και ο εφικτός διαχωρισμός της αμμωνίας παρά την υψηλή της πτητικότητα. Παρά τις πολλές προοπτικές που φαίνεται να έχει η προκατεργασία με έκρηξη αμμωνίας, το υψηλό λειτουργικό κόστος

και το κόστος του υγρού αζώτου, οι αρνητικές επιπτώσεις της αμμωνίας στο περιβάλλον, καθώς το κόστος της ανακύκλωσης και ανάκτησής της παραμένουν ακόμα σημαντικές προκλήσεις [1,4,6].

2.2.3.3 Υγρή προκατεργασία οξείδωσης

Κατά την υγρή προκατεργασία οξείδωσης η λιγνινοκυτταρινούχος βιομάζα εκτίθεται σε υψηλές θερμοκρασίες (170-200°C) και πιέσεις (10-12 bar O₂) για 10-15 min, χρησιμοποιώντας καυτό νερό και κάποια αλκαλική ένωση και οξυγόνο ή αέρα ως οξειδωτικό μέσο. Η προσθήκη οξυγόνου σε θερμοκρασίες άνω των 170°C καθιστά τη διεργασία εξώθερμη, γεγονός που μειώνει τις ενεργειακές απαιτήσεις. Οι κύριες αντιδράσεις που πραγματοποιούνται είναι ο σχηματισμός οξέων μέσω υδρολύσεων και οξειδωτικές αντιδράσεις. Οι φαινολικές ενώσεις αποδομούνται περαιτέρω σε καρβοξυλικά οξέα, ενώ η συγκέντρωση της υδροξυμεθυλοφουρφουράλης και της φουρφουράλης είναι χαμηλότερη σε σχέση με άλλες υδροθερμικές μεθόδους. Η συγκεκριμένη προκατεργασία παρουσιάζει αποδοτική κλασμάτωση της βιομάζας, διαλυτοποίηση της ημικυτταρίνης και της λιγνίνης και αποτελεσματική απομάκρυνση της λιγνίνης, αλλά το κόστος του οξυγόνου και των χημικών καταλυτών μπορεί να αποτελέσει σοβαρό εμπόδιο για την ανάπτυξη και την εισαγωγή αυτής της τεχνολογίας στη βιομηχανία [1,4,14].

Μια κατηγορία υγρής προκατεργασίας οξείδωσης είναι αυτή της οξείδωσης με ακετόνη/νερό στην οποία γίνεται χρήση μίγματος καυτής ακετόνης/νερού και οξυγόνου, χωρίς την προσθήκη κάποιας αλκαλικής ένωσης. Παρόλο που δεν έχει μελετηθεί εκτενώς η συγκεκριμένη μέθοδος, φαίνεται να παρουσιάζει παρόμοια πλεονεκτήματα με την υγρή προκατεργασία οξείδωσης, όπως χαμηλή παραγωγή παρεμποδιστικών προϊόντων, αλλά παράλληλα επιτυγχάνει καλύτερη απολιγνινοποίηση της βιομάζας. Η λιγνίνη που παράγεται είναι υψηλής ποιότητας και δεν περιέχει θειικές ή ανόργανες ενώσεις που θα μπορούσαν με τη σειρά τους να σχηματίσουν επιβλαβή προϊόντα για το περιβάλλον, ενώ παρουσιάζει χαμηλό περιεχόμενο σε υδατάνθρακες, που την καθιστά κατάλληλη για την παραγωγή φαινολών, θερμοπλαστικών και ινών άνθρακα. Η χρήση ακετόνης και νερού, δύο μη τοξικών, εύκολα διαχωρίσιμων και ανακυκλώσιμων διαλυτών, επιτρέπει την ανάπτυξη μιας διεργασίας που έχει χαμηλές ενεργειακές απαιτήσεις, χαμηλό κόστος και θεωρείται πιο «πράσινη». Ένα επίσης βασικό πλεονέκτημα αυτής τη μεθόδου είναι η χρήση οξυγόνου μέσης πίεσης αντί ανόργανων οξέων που είναι διαβρωτικά και δύσκολα στον χειρισμό κατά τις καθοδικές διεργασίες. Η συνεργιστική επίδραση της ακετόνης και του νερού έχει ως αποτέλεσμα τη μείωση της λιγνίνης και της ημικυτταρίνης και την ταυτόχρονη αύξηση της κυτταρίνης στην προκατεργασμένη βιομάζα. Το νερό από τη μία είναι υπεύθυνο για την υδρόλυση της ημικυτταρίνης και για τη διάσπαση των δεσμών λιγνίνης και ημικυτταρίνης επιτυγχάνοντας τον μερικό αποπολυμερισμό της λιγνίνης και από την άλλη η ακετόνη διαλυτοποιεί την μερικώς αποπολυμερισμένη λιγνίνη που έχει ελευθερωθεί, την απομακρύνει από τη στερεή βιομάζα και κατ'επέκταση διευκολύνει την περαιτέρω καταστροφή των δεσμών λιγνίνης-ημικυτταρίνης. Η λιγνίνη αποτελεί ένα ιδιαίτερα δραστικό μόριο σε συνθήκες υγρής προκατεργασίας οξείδωσης, καθώς οι αιθερικοί δεσμοί διασπώνται πιο εύκολα και η λιγνίνη αποπολυμερίζεται σε oligομερή χαμηλότερων μοριακών βαρών, που μπορούν να διαλυτοποιηθούν πιο εύκολα από διαλύτες όπως η ακετόνη [14,15].

2.2.3.4 Προκατεργασία με έκρηξη CO₂

Η προκατεργασία με έκρηξη CO₂ χρησιμοποιεί το CO₂ ως υπερκρίσιμο ρευστό, δηλαδή ως ένα ρευστό που βρίσκεται στην αέρια κατάσταση, αλλά είναι συμπιεσμένο σε θερμοκρασίες πάνω από το κρίσιμο σημείο και παρουσιάζει πυκνότητα παρόμοια με αυτή των υγρών. Αυτές οι υπερκρίσιμες συνθήκες επιτρέπουν την απομάκρυνση της λιγνίνης, αυξάνοντας την επιδεκτικότητα του υποστρώματος σε υδρόλυση. Μάλιστα, η προσθήκη συνδιαλυτών όπως η αιθανόλη μπορεί να βελτιώσει την απολιγνινοποίηση. Τα μόρια του CO₂ είναι συγκρίσιμα στο μέγεθος με αυτά του νερού και της αμμωνίας και μπορούν να εισχωρήσουν στους πόρους της λιγνινοκυτταρινούχου βιομάζας, γεγονός που διευκολύνεται υπό την εφαρμογή υψηλής πίεσης. Μετά από την εκτονωτική απελευθέρωση της πίεσης του CO₂, καταστρέφεται η δομή της κυτταρίνης και της ημικυτταρίνης και κατά συνέπεια αυξάνεται η διαθέσιμη επιφάνεια του υποστρώματος απέναντι στη δράση των ενζύμων. Συγκριτικά με την έκρηξη ατμού και αμμωνίας η απόδοση των σακχάρων που παράγονται είναι μικρότερη στην περίπτωση της έκρηξης CO₂, αλλά η σχέση κόστους-οφέλους είναι καλύτερη σε σχέση με την έκρηξη ατμού και ο σχηματισμός παρεμποδιστών είναι μικρότερος, παρόλο που η έκρηξη ατμού παρουσιάζει και άλλα πλεονεκτήματα, όπως μηδενική τοξικότητα, μηδενική αναφλεξιμότητα και εύκολη ανάκτηση μετά τον διαχωρισμό [4].

2.2.4 Βιολογική προκατεργασία

Μέσω της βιολογικής προκατεργασίας αποδομούνται τα συστατικά της λιγνίνης και της ημικυτταρίνης με τη βοήθεια αερόβιων βακτηρίων και μυκήτων. Οι πιο αποτελεσματικοί από αυτούς τους μικροοργανισμούς είναι οι μύκητες λευκής σήψης που δρουν μέσω ενζύμων που αποδομούν τη λιγνίνη, όπως περοξειδάσες και λακκάσες. Συγκριτικά με όλες τις προαναφερθείσες προκατεργασίες, η βιολογική προκατεργασία παρουσιάζει σημαντικά πλεονεκτήματα όπως χαμηλή ενεργειακή κατανάλωση, χαμηλό κόστος κεφαλαίου, μηδενική απόρριψη τοξικών ουσιών στο περιβάλλον, χαμηλή παραγωγή παρεμποδιστών και ήπιες συνθήκες αντίδρασης. Ωστόσο, η τελική συγκέντρωση γλυκόζης από τη συγκεκριμένη προκατεργασία είναι σχετικά χαμηλή, καθώς οι περισσότεροι μικροοργανισμοί καταναλώνουν μια ποσότητα της κυτταρίνης κατά την ανάπτυξή τους, που συνεπάγεται απώλεια σακχάρων. Επίσης, η μεγάλη διάρκεια της αντίδρασης (30-60 ημέρες) σε συνδυασμό με την μικροβιακή αστάθεια περιορίζουν την ευρεία εφαρμογή της μεθόδου. Σκοπός των σύγχρονων μελετών για τη βιολογική προκατεργασία είναι η βελτίωση της αποδοτικότητας της αντίδρασης, η μείωση του χρόνου της αντίδρασης και η καλλιέργεια νέων αποδοτικών στελεχών [4,6].

2.2.5 Συνδυασμός προκατεργασιών

Σχετικά με τις μεθόδους προκατεργασίας βασικοί παράγοντες που λαμβάνονται υπόψη για βιομηχανικές εφαρμογές είναι το κόστος των χημικών αντιδραστηρίων, η απόδοση των μονοσακχαριτών, το κόστος κατασκευής του εξοπλισμού, το λειτουργικό κόστος και η διάρκεια της προκατεργασίας. Μεμονωμένα τα διάφορα είδη προκατεργασίας, όπως αναφέρθηκε, παρουσιάζουν μειονεκτήματα, όμως η

συνεργιστική τους δράση μπορεί να επιφέρει θετικά αποτελέσματα, όπως βελτίωση της αποδοτικότητας της ενζυμικής υδρόλυσης, μείωση του χρόνου προκατεργασίας, βελτίωση των συνθηκών της αντίδρασης, μείωση της παραγωγής παρεμποδιστών και βελτίωση της οικονομικής σκοπιμότητας. Παρά τις προοπτικές στην παραγωγή και στην οικονομική πλευρά των διεργασιών με τη χρήση συνδυασμού προκατεργασιών, πρέπει να αξιολογείται και η αύξηση της περιπλοκότητας σε αυτή την περίπτωση, ώστε να μελετάται η δυνατότητα απλούστευσης της λειτουργικής διαδικασίας [6].

2.3 Ενζυμική υδρόλυση κυτταρίνης, ημικυτταρίνης και λιγνίνης

Η χημική ή ενζυμική υδρόλυση της κυτταρίνης και της ημικυτταρίνης έχει σκοπό την απελευθέρωση των μονομερών σακχάρων κάθε κλάσματος που προέρχεται από την προκατεργασία. Τα μονομερή σάκχαρα μπορούν στη συνέχεια να χρησιμοποιηθούν ως πηγές άνθρακα σε διεργασίες ζύμωσης για τη παραγωγή βιοκαυσίμων, όπως αιθανόλη και μεθάνιο ή για την παραγωγή ενός συνόλου διαφορετικών πολύτιμων ενώσεων, όπως γαλακτικό οξύ, ηλεκτρικό οξύ και ωμέγα-3 λιπαρά οξέα ή να χρησιμεύσουν ως πρώτη ύλη σε χημικές ή ενζυμικές διεργασίες μετατροπής προς τη σύνθεση προηγμένων χημικών ενώσεων με διαφορετικές εφαρμογές στη βιομηχανία πολυμερών, στη σύνθεση φαρμάκων ή ως διατροφικά φαρμακευτικά προϊόντα. Μεταξύ αυτών η πιο ενδιαφέρουσα κατηγορία χημικής σύνθεσης περιλαμβάνει τα χημικά-πλατφόρμες, τα οποία με τη σειρά τους μπορούν να οδηγήσουν σε βιομονομερή και βιοπλαστικά. Η συγκεκριμένη κατηγορία αποτελεί μια εναλλακτική λύση σε παραδοσιακά πετροχημικά συνθετικά πολυμερή, με στόχο την παραγωγή φουρανίων ως δομικών στοιχείων για περαιτέρω αξιοποίηση, τα οποία είναι κατά τα άλλα ανεπιθύμητα προϊόντα στη μικροβιακή ζύμωση [1].

Παρόλο που η χημική υδρόλυση της λιγνινοκυτταρινούχου βιομάζας μέσω οξέων ή ιοντικών υγρών ήταν η κοινή μέθοδος στο παρελθόν, η ενζυμική προσέγγιση προσφέρει έναν πιο στοχευμένο, αποτελεσματικό και φιλικό προς το περιβάλλον τρόπο παραγωγής γλυκόζης και ξυλόζης. Η ενζυμική υδρόλυση γίνεται συνήθως χρησιμοποιώντας ένζυμα είτε που παράγονται από μικροοργανισμούς που τα εκκρίνουν κατά τη διάρκεια της ανάπτυξής τους στα μέσα είτε που υπάρχουν διαθέσιμα στο εμπόριο, διαδικασία που χρησιμοποιείται ευρέως. Η ενζυμική υδρόλυση έχει θεωρηθεί η πιο ελπιδοφόρα και αποτελεσματική διεργασία λόγω της εξειδίκευσης του ενζύμου για το υπόστρωμα, της απαίτησης σχετικά χαμηλότερων θερμοκρασιών και της παραγωγής ελάχιστων αναστολέων. Βέβαια, το κόστος των ενζύμων αποτελεί μια σημαντική πρόκληση για την συγκεκριμένη μέθοδο, ενώ η απόδοση είναι χαμηλότερη από τη θεωρητική. Τα βασικά συστήματα ενζύμων που χρησιμοποιούνται για την υδρόλυση της λιγνινοκυτταρινούχου βιομάζας είναι οι κυτταρινάσες, οι ημικυτταρινάσες (ξυλανάσες) και λιγνινάσες [1,2,11].

2.3.1 Κυτταρινάσες

Η έρευνα πάνω στην υδρόλυση της κυτταρίνης με τη χρήση βιοκαταλυτών ξεκίνησε κατά τον Δεύτερο Παγκόσμιο Πόλεμο όταν η Αμερικανική Στρατιωτική Υπηρεσία αναζητούσε τις αιτίες αποσύνθεσης του στρατιωτικού ρουχισμού και εξοπλισμού στις ζούγκλες του Νότιου Ειρηνικού και μετά από βασική έρευνα ταυτοποιήθηκε ο μικροοργανισμός *Trichoderma reesei* που προκαλούσε την φθορά στα

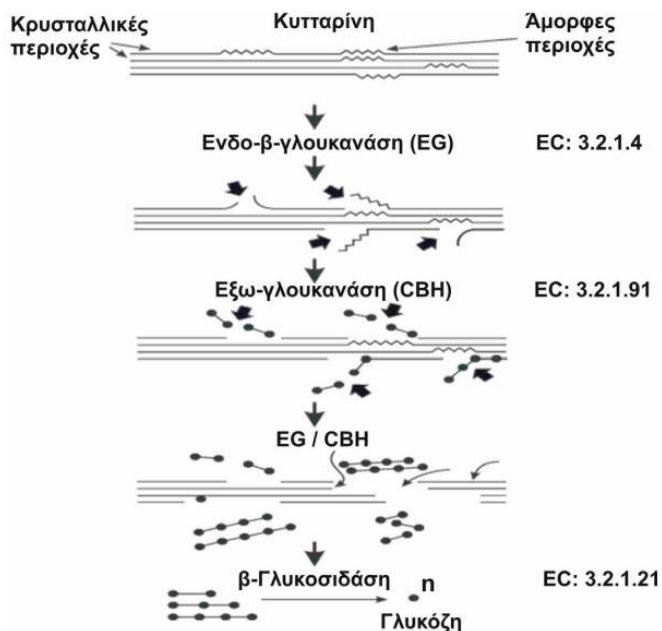
κυτταρινικής σύστασης ρούχα βαμβακερής προέλευσης, ο οποίος αποτέλεσε τον σημαντικότερο μικροοργανισμό για την παραγωγή και εφαρμογή των κυτταρινασών. Έτσι, ενώ αρχικά η έρευνα για τις κυτταρινάσες ξεκίνησε με στόχο να αποφευχθεί η «επιθετική τους δραστηριότητα», σήμερα στρέφεται στην αύξηση της υδρολυτικής τους ενεργότητας με εφαρμογές πέρα από την υδρόλυση της βιομάζας, στον τομέα της υφαντουργίας για το πετροπλύσιμο των τζιν παντελονιών (ύφασμα τύπου ντένιμ) και στη βιομηχανία τροφίμων για την παραγωγή και διάλυση χυμών φρούτων και λαχανικών (ως ενζυμικό κοκτέιλ από κυτταρινάσες, ξυλανάσες, πηκτινάσες), καθώς και για την παραγωγή ελαιόλαδου.

Ειδικότερα, η υδρόλυση της κυτταρίνης απαιτεί κυτταρινάσες που παράγονται συνήθως από διάφορους μικροοργανισμούς, συμπεριλαμβανομένων βακτηρίων και μυκήτων υπό αερόβιες ή αναερόβιες, μεσοφιλικές ή θερμοφιλικές συνθήκες. Γένη βακτηρίων που χρησιμοποιούνται περιλαμβάνουν τα εξής: *Clostridium*, *Cellulomonas*, *Bacillus*, *Thermomonospora*, *Ruminococcus*, *Bacteriodes*, *Erwinia*, *Acetovibrio*, *Microbispora* και *Streptomyces*, ενώ αντίστοιχα γένη μυκήτων περιλαμβάνουν *Trichoderma*, *Aspergillus*, *Schizophyllum*, *Sclerotium*, *Fusarium*, *Phanerochaete*, *Humicola*, *Schizophyllum* και *Penicillium*. Ο *Trichoderma reesei* είναι ένας από τους πιο αποτελεσματικούς και παραγωγικούς μύκητες που χρησιμοποιούνται για την παραγωγή κυτταρινολυτικών ενζύμων βιομηχανικής κλίμακας, με πιο γνωστά αυτά που διασπούν τους β-1,4-γλυκοζιδικούς δεσμούς, όπως η β-γλυκοζιδάση, οι ενδογλουκανάσες και οι εξωγλουκανάσες, οι οποίες περιγράφονται παρακάτω [11,13].

Γενικώς, η πλήρης αποδόμηση της κυτταρίνης και η βιομετατροπή της σε γλυκόζη είναι μια δύσκολη διαδικασία που απαιτεί τη συνεργιστική δράση ενός μείγματος τουλάχιστον τριών κυτταρινασών. Συγκεκριμένα, οι κυτταρινάσες χωρίζονται σε τρεις τάξεις, στις εξω-1,4-β-D-γλουκανάσες, ενδο-1,4-β-D-γλουκανάσες και β-γλυκοζιδάσες. Οι ενδο-1,4-β-D-γλουκανάσες ή καρβοξυμεθυλοκυτταρινάσες υδρολύουν εσωτερικούς β-(1,4)-γλυκοζιδικούς δεσμούς τυχαία εντός της αλυσίδας της κυτταρίνης και είναι κυρίως υπεύθυνες για τη μείωση του βαθμού πολυμερισμού της κυτταρίνης. Συγκεκριμένα, δρουν στις άμορφες περιοχές της κυτταρίνης ή στην επιφάνεια των μικροϊνιδίων απελευθερώνοντας μικρότερες αλυσίδες που αποτελούνται από αναγωγικά και μη αναγωγικά άκρα και αυτά τα νέα «ελεύθερα άκρα» εκτίθενται στη δράση των κελλοβιοϋδρολασών. Όταν δρουν στα διαλυτά παράγωγα της κυτταρίνης, η τυχαία διάσπασή τους προκαλεί ταχεία μείωση του μήκους της αλυσίδας και ως εκ τούτου αλλαγές στο ιξώδες σε σχέση με την απελευθέρωση των αναγωγικών τελικών άκρων. Όταν δρουν σε κυτταροδεξτρίνες, ο ρυθμός υδρόλυσης αυξάνεται με τον βαθμό πολυμερισμού εντός των ορίων της διαλυτότητας του υποστρώματος, με την κελλοβιοζή και την κελλοτριόζη να είναι τα κύρια τελικά προϊόντα. Οι εξω-1,4-β-D-γλουκανάσες ή κελλοβιοϋδρολάσες προσκολλούνται στα άκρα των αλυσίδων της κυτταρίνης και κινούνται παράλληλα με την ίνα απελευθερώνοντας μονάδες γλυκόζης, κελλοβιοζής και κελλοολιγοσακχαριτών. Οι εξω-γλουκανάσες αποκόπτουν (υδρολύουν) τις μονάδες της κελλοβιοζής από τα μη αναγωγικά άκρα των μορίων της κυτταρίνης. Οι β-γλυκοζιδάσες παράγουν γλυκόζη είτε μέσω της υδρόλυσης της κελλοβιοζής είτε μέσω της διάσπασης των μονάδων γλυκόζης από κελλοολιγοσακχαρίτες. Συγκεκριμένα, υδρολύουν πολύ βραχείας αλυσίδας β-1,4-ολιγογλυκοζίτες έως την κελλοεξαζόζη για να σχηματιστεί γλυκόζη. Σε αντίθεση με τις εξωγλυκοζιδάσες¹, ο ρυθμός της υδρόλυσης της κελλοβιοζής μειώνεται σημαντικά καθώς ο βαθμός πολυμερισμού του υποστρώματος αυξάνεται. Πάντως αυτά τα τρία ένζυμα δρώντας συνεργιστικά, με τις ενδογλουκανάσες να κόβουν εσωτερικά την αλυσίδα της κυτταρίνης και έτσι παρέχονται νέα προσβάσιμα άκρα αλυσίδας για να

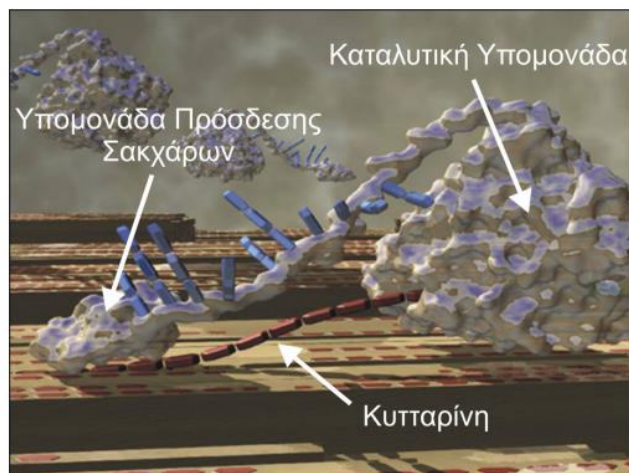
¹ Οι εξω-β-(1,4)-γλυκοζιδάση (ή 1,4-β-D-γλυκοϋδρολάσες γλουκάνης) διασπούν τις μονάδες γλυκόζης διαδοχικά από το μη αναγωγικό άκρο της γλουκάνης. Διακρίνονται από τις β-γλυκοζιδάσες από την προτίμησή τους για υποστρώματα μεγαλύτερου μήκους αλυσίδας και από την αντιστροφή των προϊόντων τους [5].

λειτουργούν οι κελλοβιοϋδρολάσες και οι β-γλυκοζιδάσες, επιταχύνουν το καθένα τη δράση του άλλου οπότε τελικά προκύπτει αύξηση της απόδοσης της υδρόλυσης. Μάλιστα, η δράση της β-γλυκοζιδάσης είναι πολύ σημαντική, καθώς η κελλοβιόζη είναι ισχυρός παρεμποδιστής της εξωγλουκανάσης με αποτέλεσμα η συσσώρευση κελλοβιόζης να μπορεί να επηρεάσει αρνητικά τη συνολική υδρολυτική απόδοση του συστήματος των κυτταρινασών.



Σχήμα 6: Συνεργιστική δράση κυτταρινασών για την πλήρη υδρόλυση της κυτταρίνης σε γλυκόζη [7].

Η μοριακή διαμόρφωση των ενδογλουκανασών και εξωγλουκανασών είναι σημαντική για την καταλυτική τους ενεργότητα και εξειδίκευση. Κατά κύριο λόγο τα ένζυμα αυτά είναι δομικά οργανωμένα σε δύο υπομονάδες, από τις οποίες η μεγαλύτερη είναι η καταλυτική υπομονάδα που υδρολύει τους γλυκοζιδικούς δεσμούς της αλυσίδας της κυτταρίνης, ενώ η μικρή υπομονάδα δεν έχει κάποιο καταλυτικό ρόλο, αλλά προσδέεται στη κυτταρίνη και διατηρώντας προσδεμένη την καταλυτική υπομονάδα, αυξάνει τον χρόνο επαφής της με το αδιάλυτο κυτταρινούχο υπόστρωμα. Η μικρή υπομονάδα είναι γνωστή ως υπομονάδα πρόσδεσης σακχάρων (carbohydrate binding domain, CBD) και συνδέεται με την καταλυτική υπομονάδα μέσω μιας πεπτιδικής αλυσίδας, που αποτελείται συνήθως από 50-60 αμινοξέα. Το ενεργό κέντρο της ενδογλουκανάσης έχει μια ανοικτή διαμόρφωση, που επιτρέπει την προσέγγιση των αλυσίδων της κυτταρίνης χωρίς κάποια παρεμπόδιση και έτσι το ένζυμο καταλύει την υδρόλυση των γλυκοζιδικών δεσμών σε τυχαίες θέσεις του πολυσακχαρίτη. Αντίθετα, το ενεργό κέντρο των εξωγλουκανασών βρίσκεται στο εσωτερικό ενός τούνελ όπου υπάρχουν τουλάχιστον 6 θέσεις πρόσδεσης σακχάρων. Το τούνελ είναι υπεύθυνο για τη σωστή τοποθέτηση της αλυσίδας της κυτταρίνης στο ενεργό κέντρο του ενζύμου και τα σημεία πρόσδεσης εξασφαλίζουν την παραμονή της κυτταρίνης στο τούνελ μετά από κάθε καταλυτική δράση του ενζύμου, το οποίο συνεχίζει την υδρόλυση της κυτταρινικής αλυσίδας με έναν παραγωγικό τρόπο δράσης χωρίς την απευλευθέρωση του υποστρώματος από το τούνελ.



Σχήμα 7: Απεικόνιση μορίου κυτταρινάσης [7].

Οι λυτικές μονοξυγενάσες των πολυσακχαριτών (LPMOs) είναι μια άλλη κατηγορία μεταλλοενζύμων με οξειδωτική δραστηριότητα (οξειδάσες) που έχει αποδειχθεί ότι δρουν συνεργιστικά με υδρολυτικά ένζυμα με την παραγωγή περισσότερων ελεύθερων άκρων για υδρόλυση, ενισχύοντας την αποδόμηση των υποστρωμάτων πολυσακχαριτών και αυξάνοντας την απόδοση των σακχάρων. Το ενεργό κέντρο των LPMOs είναι επίπεδο σε αντίθεση με των άλλων κυτταρινασών και για τη δράση τους απαιτείται ένας αναγωγικός συμπαράγοντας, ο οποίος μπορεί να είναι η λιγνίνη. Υπάρχει μια μεγάλη ποικιλία εμπορικά διαθέσιμων κυτταρινολυτικών κοκτέιλ για την αποτελεσματική υδρόλυση βιομάζας σε μονοσακχαρίτες, που παράγονται κυρίως από θερμοφίλους νηματοειδείς μύκητες. Επιπλέον, πολλά μονοένζυμα έχουν κλωνοποιηθεί και εκφράζονται ετερόλογα σε ευκαρυωτικούς ξενιστές, διευκολύνοντας έτσι όχι μόνο τη μελέτη του τρόπου δράσης συγκεκριμένων ενζυμικών δραστηριοτήτων, αλλά και τη κατασκευή εξατομικευμένων κοκτέιλ που στοχεύουν σε συγκεκριμένα υποστρώματα. Πάντως ένα αποτελεσματικό σύστημα κυτταρινασών πρέπει να μπορεί να αποδομεί αποτελεσματικά την κυτταρίνη και να αντέχει το όξινο pH (4-5) και τις συνθήκες καταπόνησης που εφαρμόζονται [1,2,3,4,5,7,11,43].

2.3.2 Ημικυτταρινάσες

Σε αντίθεση με την κυτταρίνη η ημικυτταρίνη είναι ένα ετερογενές πολυμερές με μια ποικιλία υποκαταστάσεων που απαιτεί πολλά και πιο εξειδικευμένα ένζυμα για την αποδόμησή του σε πεντόζες, εξόζες και ουρονικά οξέα, τα οποία παράγονται από μια μεγάλη ποικιλία μυκήτων και βακτηρίων, όπως τα είδη *Trichodrema*, *Penicillium*, *Talaromyces*, *Aspergillus* και *Bacillus*. Κατά την αποδόμηση της ξυλάνης, οι εξω- και οι ενδο-ξυλανάσες (ενδο-1,4-β-ξυλανάσες) διασπούν την αλυσίδα της ξυλάνης παράγοντας ξυλοολιγοσακχαρίτες, ενώ οι β-ξυλοζιδάσες παράγουν ξυλόζη από τους ξυλοολιγοσακχαρίτες που έχουν διαχωριστεί. Αντίστοιχα, κατά την αποδόμηση της γλυκομαννάνης, οι μαννανάσες και οι β-μαννοζιδάσες λειτουργούν παρόμοια στη μαννάνη. Οι πλευρικές ομάδες της ημικυτταρίνης μπορούν να αφαιρεθούν από μια ποικιλία διαφορετικών ενζύμων που περιλαμβάνει α-L-αραβινοφουρανοζιδάσες και α-γλυκουρονοζιδάσες, που δρουν στην αλυσίδα της ξυλάνης απομακρύνοντας αραβινόζη και 4-O-μεθυλογλυκουρονικό οξύ αντίστοιχα, α-γαλακτοζιδάσες, ακετυλοεστεράσες που δρουν στις ακετυλο υποκαταστάσεις σε τμήματα της ξυλόζης, εστεράσες του φερουλικού οξέος, που υδρολύουν τους

εστερικούς δεσμούς μεταξύ υποκαταστάσεων της αραβινόζης και φερουλικού οξέος και απελευθερώνουν την ημικυτταρίνη από τη λιγνίνη και εστεράσες του p-κουμαρλικού οξέος [1,2,5,11].

Η υδρόλυση της ημικυτταρίνης έχει ως αποτέλεσμα την αύξηση του μεγέθους των πόρων και της ειδικής επιφάνειας του υποστρώματος, γεγονός που διευκολύνει την πρόσβαση των κυτταρινάσων στη δομή της κυτταρίνης. Επίσης, έχει παρατηρηθεί ότι η απομάκρυνση των ακετυλομάδων της αλυσίδας της ημικυτταρίνης μπορεί να ενισχύσει την απόδοση της ενζυμικής υδρόλυσης. Κατά τη διάρκεια της υδρόλυσης της ημικυτταρίνης σε μονοσακχαρίτες συμβαίνει μια ταυτόχρονη διάσπαση των β-O-4 συνδέσεων και των β-αιθερικών δεσμών της λιγνίνης και των δεσμών λιγνίνης-ημικυτταρίνης που οδηγεί στην απελευθέρωση φαινολικών ενώσεων και oligομερών της λιγνίνης που παρεμποδίζουν τις καθοδικές ενζυμικές διεργασίες, γι' αυτό και πρέπει να απομακρύνονται παράλληλα με την λιγνίνη [14].

2.3.3 Λιγνινάσες

Εξαιτίας της δομικής πολυπλοκότητας της λιγνίνης απαιτείται επίσης ένα κοκτέιλ οξειδωτικών ενζύμων που λειτουργούν συνεργιστικά με τα υδρολυτικά ένζυμα (κυτταρινάσες και ημικυτταρινάσες) για τη διάσπαση του φυσικού φράγματος γύρω από τους πολυσακχαρίτες, ώστε να επιτραπεί η πρόσβαση των υδρολυτικών ενζύμων στην κυτταρίνη και την ημικυτταρίνη. Τα κύρια ένζυμα που εμπλέκονται στη βιοαποδόμηση της λιγνίνης είναι οι υπεροξειδάσες της λιγνίνης, οι υπεροξειδάσες του μαγγανίου και οι λακάσες [2,11].

2.3.4 Παράγοντες που επηρεάζουν την ενζυμική υδρόλυση της κυτταρίνης

Η αποδόμηση της κυτταρίνης είναι μια απαιτητική διαδικασία που μπορεί να ανασταλεί σε πολλά επίπεδα και η απόδοση των σακχάρων κατά την ενζυμική υδρόλυση μπορεί να επηρεαστεί από έναν μεγάλο αριθμό παραγόντων, οι οποίοι χωρίζονται σε δύο κατηγορίες: στους παράγοντες που σχετίζονται με το ένζυμο και τη διαδικασία και στους παράγοντες που σχετίζονται με το υπόστρωμα, οι οποίοι βέβαια μπορεί να συνδέονται μεταξύ τους.

Η πρώτη κατηγορία σχετίζεται με το είδος και τη φύση των μεθόδων της προκατεργασίας που εφαρμόζονται στα πρώτα στάδια επεξεργασίας της βιομάζας, με τον τύπο, τις πηγές, την αποτελεσματικότητα και την απαιτούμενη ποσότητα των ενζύμων κατά την υδρόλυση. Η σύσταση του υγρού κλάσματος και των στερεών ροών της διεργασίας που προκύπτουν από διαφορετικές προκατεργασίες μπορεί να διαφέρει σημαντικά, γεγονός που επηρεάζει τις απαιτήσεις για αποτελεσματική ενζυμική σακχαροποίηση σε επόμενα στάδια της διεργασίας. Επίσης, το ενζυμικό φορτίο που απαιτείται για την ενζυμική υδρόλυση εξαρτάται άμεσα από την διεργασία υδρόλυσης, καθώς και την πεπτικότητα του υποστρώματος με συνηθισμένες ενζυμικές δραστηριότητες μεταξύ 10 και 33 FPU (Filter Paper Unit, ενζυμική δραστηριότητα που απαιτείται για την υδρόλυση ορισμένης ποσότητας χαρτιού φιλτραρίσματος) ανά g κυτταρίνης. Η πλέον συνηθισμένη ενζυμική δραστηριότητα που χρησιμοποιείται στις βιομηχανικές διεργασίες είναι εκείνη των 15 FPU ανά g κυτταρίνης. Επίσης, ιδιαίτερα κρίσιμη θεωρείται η τεχνική ανάδευσης στην απόδοση της υδρόλυσης, συγκρίνοντας ένα παραδοσιακό σύστημα ανάδευσης με φιάλες με έναν εναλλακτικό αναμικτήρα ελευθέρως πτώσης. Η

απότομη αύξηση της μετατροπής της κυτταρίνης και η υψηλή απελευθέρωση της γλυκόζης που παρατηρείται στον αναμικτήρα ελευθέρως υπό υψηλή αρχική περιεκτικότητα σε στερεά, επιβεβαιώνει τα πλεονεκτήματα της αποτελεσματικής ανάμιξης. Γενικώς, κατά την υδρόλυση η ένταση της ανάδευσης παίζει πολύ σημαντικό ρόλο, καθώς επηρεάζει τα φαινόμενα μεταφοράς μάζας του ενζύμου με το υπόστρωμα.

Σχετικά με τη δεύτερη κατηγορία που σχετίζεται με το υπόστρωμα ένας από τους κύριους παράγοντες είναι η προαναφερθείσα σύνθετη δομή του φυτικού κυτταρικού τοιχώματος. Η μήτρα που σχηματίζεται από τα αλληλένδετα πολυμερή της λιγνίνης και της ημικυτταρίνης γύρω από την κυτταρίνη, εμποδίζει την πρόσβαση των κυτταρινασών στο κλάσμα της κυτταρίνης. Ένας ακόμη βασικός παράγοντας είναι η κρυσταλλικότητα της κυτταρίνης, αλλά μέσω της προκατεργασίας της βιομάζας μπορεί να επιτευχθεί μείωση του μεγέθους των μορίων και αύξηση της διαθέσιμης επιφάνειας που συνεπάγεται μείωση της κρυσταλλικότητας. Βέβαια, υπάρχουν και μέθοδοι όπως η έκρηξη ατμού που αυξάνουν την κρυσταλλικότητα καθώς απομακρύνουν και μέρος της άμορφης κυτταρίνης. Ένας άλλος παράγοντας που συνδέεται με την κρυσταλλικότητα είναι ο βαθμός πολυμερισμού της κυτταρίνης (αριθμός των υπολειμμάτων γλυκοζυλίου ανά αλυσίδα κυτταρίνης) και ο αποπολυμερισμός εξαρτάται από τη φύση του υποστρώματος κυτταρίνης. Οι ενδογλουκανάσες, που κόβουν εσωτερικές και κατά προτίμηση λιγότερο διατεταγμένες περιοχές της αλυσίδας της κυτταρίνης, είναι κυρίως υπεύθυνες για τη μείωση του βαθμού πολυμερισμού. Επιπλέον, με τη χρήση επιφανειοδραστικών ουσιών (surfactants), οι οποίες τροποποιούν τις ιδιότητες της επιφάνειας της κυτταρίνης, μπορεί να αντιμετωπιστεί το φαινόμενο της δέσμωσης των ενζύμων από την κυτταρίνη.

Επίσης, η παρουσία λιγνίνης περιορίζει τον ρυθμό της ενζυμικής υδρόλυσης καθώς λειτουργεί ως ένα φυσικό εμπόδιο στην υδρόλυση περιοχών του υποστρώματος από τις κυτταρινάσες. Γενικώς είναι γνωστό ότι πολλές κυτταρινάσες και ημικυτταρινάσες προσκολλούνται στις ίνες της κυτταρίνης μέσω ενός από τους υποδοχείς τους, δηλαδή της μονάδας δέσμωσης υδατανθράκων (CBM) που προάγει τη σταθεροποίηση του ενζύμου στο υπόστρωμα των υδατανθράκων και συντονίζει την υδρόλυση, αλλά μπορεί να παρατηρηθεί μια αναντιστρέψιμη και μη παραγωγική απορρόφηση των ενζύμων αυτών στη μήτρα της λιγνίνης, γεγονός που συντελεί στον περιορισμό της απόδοσης της υδρόλυσης. Η ανάπτυξη αποτελεσματικών στρατηγικών προκατεργασίας που ελαχιστοποιούν την περιεκτικότητα της λιγνίνης στα κλάσματα κυτταρίνης και ημικυτταρίνης είναι καθοριστικής σημασίας για την εξάλειψη των ανεπιθύμητων ενεργειών της υπολειπόμενης λιγνίνης. Ακόμα, σημαντικό ρόλο παίζει και η περιεκτικότητα σε ημικυτταρίνη, καθώς με την απομάκρυνσή της αυξάνεται το μέσο μέγεθος των πόρων του υποστρώματος και κατ'επέκταση αυξάνεται η προσβασιμότητα και η πιθανότητα υδρόλυσης της κυτταρίνης. Ο βαθμός ακετυλίωσης στην ημικυτταρίνη είναι ένας ακόμα παράγοντας, επειδή οι ακετυλομάδες με τη λιγνίνη είναι προσκολλημένες στη μήτρα της ημικυτταρίνης και μπορεί να εμποδίσουν τη διάσπαση του πολυσακχαρίτη. Πάντως, είναι σημαντική η ανάκτηση της ημικυτταρίνης στα προκατεργασμένα στερεά προκειμένου να αξιοποιηθεί μεγαλύτερο ποσοστό σακχάρων.

Η συγκέντρωση του υποστρώματος επηρεάζει επίσης τον συνολικό ρυθμό σακχαροποίησης, καθώς αν και είναι σημαντική η λειτουργία σε συνθήκες υψηλής συγκέντρωσης στερεών (πάνω από 12% κ.β.) προκειμένου να μειωθούν οι ενεργειακές απαιτήσεις, με περαιτέρω αύξηση της συγκέντρωσης έχει παρατηρηθεί μείωση της μετατροπής της κυτταρίνης ακολουθώντας μια γραμμική συσχέτιση. Η παρεμπόδιση αυτή οφείλεται από τη μία σε περιορισμούς λόγω φαινομένων μεταφοράς μάζας, καθώς η λανθασμένη ανάδευση αποτρέπει την αποτελεσματική δράση των ενζύμων στο υπόστρωμα, ενώ από την άλλη παίζει ρόλο και η αυξημένη παρεμπόδιση από τα σάκχαρα που απελευθερώνονται κατά την

ενζυμική υδρόλυση και το υψηλό ιξώδες του μείγματος, το οποίο βέβαια με την πάροδο του χρόνου μειώνεται μέχρι την πλήρη ρευστοποίηση και σακχαροποίηση του λιγνινοκυτταρινούχου υλικού. Έτσι, η υδρόλυση των λιγνινοκυτταρινούχων υλικών πραγματοποιείται με συγκεντρώσεις υποστρωμάτων χαμηλότερες του 10-15% (w/v), λόγω των προβλημάτων ανάμιξης που δημιουργούνται σε υψηλές συγκεντρώσεις στερεών, αλλά χρησιμοποιούνται με επιτυχία αναμικτήρες ελευθέρως πτώσεως (free fall mixer) με υψηλότερες συγκεντρώσεις υποστρωμάτων έως 28%-30% (w/v).

Ακόμα, το μέγεθος των σωματιδίων της πρώτης ύλης είναι καθοριστικής σημασίας, αφού με τη μείωση του μεγέθους των σωματιδίων αυξάνεται η ειδική διαθέσιμη επιφάνεια και κατ' επέκταση η προσβασιμότητα της κυτταρίνης στα ενζύμα. Επιπλέον, το μέγεθος του πόρου (πορώδες) του υποστρώματος σε συνδυασμό με το μέγεθος των ενζύμων αποτελούν κύριους περιοριστικούς παράγοντες στην ενζυμική υδρόλυση της λιγνινοκυτταρινούχου βιομάζας, καθώς οι κυτταρινάσες μπορεί να παγιδευτούν στους πόρους εάν η εσωτερική περιοχή είναι πολύ μεγαλύτερη από την εξωτερική περιοχή, γεγονός που συμβαίνει σε πολλά λιγνινοκυτταρινούχα υλικά. Γι' αυτό η αύξηση του πορώδους μέσω των προκατεργασιών μπορεί να βελτιώσει σημαντικά την υδρόλυση. Τέλος, σημαντικό ρόλο παίζει και το πάχος του κυτταρικού τοιχώματος (τραχύτητα) που περιορίζει τη διείσδυση υγρού.

Επιπρόσθετα, παρόλο που ο αρχικός ρυθμός της υδρόλυσης είναι υψηλός, η παραγωγή ανασταλτικών ενδιάμεσων προϊόντων αποικοδόμησης από την προκατεργασία (φαινολικές ενώσεις, φουράνια, καρβοξυλικά οξέα) και τελικών προϊόντων, καθώς και η μειούμενη δραστηριότητα των ενζύμων που σχετίζεται με το χρόνο της αντίδρασης, έχει σαν αποτέλεσμα τη μείωση του αρχικού ρυθμού. Στη διάρκεια της ενζυμικής αποδόμησης της κυτταρίνης, η γλυκόζη που απελευθερώνεται παρεμποδίζει τη δράση της β-γλυκοζιδάσης, με αποτέλεσμα τη συσσώρευση κελλοβιόζης στο υδρόλυμα. Η κελλοβιόζη, με τη σειρά της, είναι επίσης ένας ισχυρός παρεμποδιστής των κελλοβιοϋδρολασών, εμποδίζοντας τη λειτουργία τους. Σε διεργασίες διαλείποντος έργου (batch) προστίθεται επιπλέον ποσότητα β-γλυκοζιδάσης ώστε να μετατραπεί η κελλοβιόζη στη λιγότερο ανασταλτική γλυκόζη, ενώ σε διεργασίες ημιδιαλείποντος έργου (fed-batch) χρησιμοποιείται η μέθοδος της υπερδιήθησης για την αφαίρεση των ανασταλτικών σακχάρων. Λαμβάνοντας υπόψη όλους τους προαναφερθέντες παράγοντες, καθώς και την πιθανότητα διακυμάνσεων στο pH ή στη βέλτιστη θερμοκρασία των ενζύμων ή των μικροοργανισμών και την παραγωγή άλλων αναστολέων, όπως το μυρμηκικό οξύ, είναι προφανές ότι η υδρόλυση της κυτταρίνης είναι θέμα εκτεταμένης έρευνας [1,4,7,11,15].

2.4 Ενζυμική ισομερείωση γλυκόζης προς παραγωγή φρουκτόζης

Για την μετατροπή της γλυκόζης και της ξυλόζης που παράγονται από την ενζυμική υδρόλυση σε 5-υδροξυμεθυλοφουρφουράλη και φουρφουράλη έχουν προταθεί διάφορα χημικά μονοπάτια μέσω αλκαλικών στερεών καταλυτών, όπως ζεόλιθοι και υδροταλκίτες, οξέων κατά Lewis και βάσεων κατά Bronsted, βρωμιούχου λιθίου, οξειδίου του μαγνησίου, φωσφορικών, ιοντικών υγρών, μη τοξικών βασικών αμινοξέων, όπως αργινίνη, λυσίνη, ιστιδίνη και άλλων, που όμως παρουσιάζουν μειονεκτήματα όπως υψηλό κόστος υλικών και ανάγκη για διαχωρισμό μετά το τέλος της διεργασίας. Επίσης, η γλυκόζη και η ξυλόζη μπορούν να μετατραπούν αποτελεσματικά στα αντίστοιχα φουράνια με τη χρήση ακραίων συνθηκών, όπως υψηλή πίεση και θερμοκρασία. Προκειμένου όμως να αποφευχθούν οι έντονες συνθήκες αντίδρασης που έχουν σοβαρές περιβαλλοντικές επιπτώσεις και τα παράγωγα του φουρανίου

να παραχθούν με φιλικότερο προς το περιβάλλον τρόπο, μπορεί να πραγματοποιηθεί ένα στάδιο ισομερείωσης της γλυκόζης και της ξυλόζης σε φρουκτόζη και ξυλουλόζη αντίστοιχα, δεδομένου ότι οι τελευταίες ως κετόζες μπορούν να μετατραπούν άμεσα στα αντίστοιχα φουράνια υπό ηπιότερες συνθήκες μέσω μιας απλής χημικής αφυδάτωσης.

Από τα μονομερή σάκχαρα, γλυκόζη και ξυλόζη, ενδιαφέρει περισσότερο η γλυκόζη σε πρώτη φάση, για την παραγωγή της 5-υδροξυμεθυλοφουρφουράλης. Ειδικότερα, η ενζυμική ισομερείωση της γλυκόζης σε φρουκτόζη πραγματοποιείται με τη δράση μιας ισομεράσης της γλυκόζης, που τυπικά χρησιμοποιείται για την παρασκευή σιροπιών υψηλής περιεκτικότητας σε φρουκτόζη από αμυλούχα υλικά και για τον σκοπό αυτό χρησιμοποιείται το εμπορικά διαθέσιμο ένζυμο Sweetzyme IT (Novozymes) που προέρχεται από τον *Streptomyces murinus*. Παρόλο που η ενζυμική αντίδραση της ισομερείωσης της γλυκόζης παρουσιάζει υψηλή εκλεκτικότητα, περιορίζεται θερμοδυναμικά στο 50% γεγονός που αποτρέπει τις υψηλές αποδόσεις. Προκειμένου να αντιμετωπιστεί αυτός ο περιορισμός, μπορεί να προστεθεί τετραβορικό νάτριο, καθώς σε υδατικά διαλύματα τα ιόντα βορίου ενώνονται στο δεύτερο άνθρακα του δακτυλίου της γλυκόζης και της φρουκτόζης σχηματίζοντας ιονισμένους εστέρες. Αυτά τα σύμπλοκα μεταξύ σακχάρων και ιόντων βορίου δε συμμετέχουν στην αντίδραση, καθώς δεν αναγνωρίζονται από την ισομέραση και η ισοροπία μετατοπίζεται προς τη φρουκτόζη επειδή τα ιόντα βορίου παρουσιάζουν μεγαλύτερη συγγένεια με τις κετόζες, όπως η φρουκτόζη από ότι με τις αλδόζες, όπως η γλυκόζη. Με αυτόν τον τρόπο η μετατροπή της γλυκόζης μπορεί να αυξηθεί στο 80%, το οποίο από μελέτες έχει αποδειχθεί ότι επιτυγχάνεται προσθέτοντας το τετραβορικό νάτριο σε αναλογία 50% σε σχέση με την ποσότητα της γλυκόζης, ενώ σε μεγαλύτερη αναλογία παρατηρείται μείωση στην απόδοση της μετατροπής. Επίσης, εξαιτίας της διαφοράς στις βέλτιστες τιμές του pH για τα υδρολυτικά ένζυμα και για την ισομεράση της γλυκόζης καθίσταται αδύνατη η πραγματοποίηση της αντίδρασης σε ένα στάδιο (one-pot process) για την παραγωγή φρουκτόζης από το πλούσιο σε κυτταρίνη προκατεργασμένο στερεό κλάσμα. Τέλος, αξίζει να σημειωθεί ότι η ισομερείωση του υδρολύματος που προκύπτει από την ενζυμική υδρόλυση ενός λιγνινοκυτταρινούχου υλικού διαφέρει από αυτή της καθαρής γλυκόζης, καθώς ένα τέτοιο υδρόλυμα περιέχει πολλές ακόμα ενώσεις που μπορούν δυνητικά να επηρεάσουν την αντίδραση της ισομερείωσης [1,7,12,16,17,18,19,20,21].

2.5 Χημική αφυδάτωση φρουκτόζης προς σχηματισμό 5-υδροξυμεθυλοφουρφουράλης (HMF)

Για την χημική αφυδάτωση της φρουκτόζης προς την παραγωγή 5-υδροξυμεθυλοφουρφουράλης (HMF) χρησιμοποιούνται διάφορα χημικά μέσα και ομοιογενείς ή ετερογενείς στερεοί καταλύτες. Όξινοι ετερογενείς στερεοί καταλύτες που χρησιμοποιούνται είναι η αλούμινα, ο ζεόλιθος, φωσφορικά άλατα μετάλλων μετάπτωσης (Nb,Zr,V,Cu,Ti), η ρητίνη ιοντοανταλλαγής Amberlyst-15, το οξείδιο του γραφενίου, στερεοί σουλφονικοί καταλύτες από τιτάνιο, με μερικούς από αυτούς να οδηγούν σε μεγαλύτερες εκλεκτικότητες με την προσθήκη οργανικής φάσης. Από την άλλη, μπορούν να αφυδατώσουν την φρουκτόζη και ομοιογενείς καταλύτες όπως φωσφορικό, θειικό, υδροχλωρικό, νιτρικό, κιτρικό, γλυκολικό και οξικό οξύ. Μέσω των ετερογενών καταλυτών μπορούν να αποφευχθούν προβλήματα διάβρωσης και να διευκολυνθεί η ανάκτηση του καταλύτη, αλλά απαιτείται μηχανική ανάδευση προκειμένου να εξασφαλιστεί η επαφή του με όλο το μέσο της αντίδρασης. Από την άλλη, με

τη χρήση ομογενών καταλυτών, εφόσον αυτοί διαλύονται στο μέσο, επιτυγχάνεται η ομοιογενής κατανομή τους, που συνεπάγεται καλύτερες καταλυτικές αποδόσεις. Επίσης, οι όξινοι ομοιογενείς καταλύτες έχουν χαμηλότερο κόστος από τους ετερογενείς, αλλά η ανάκτησή τους είναι πιο δύσκολη. Ως μέσα αντίδρασης μπορούν να χρησιμοποιηθούν ιοντικά υγρά, οργανικοί διαλύτες ή διφασικά συστήματα, τα οποία προσελκύουν όλο και περισσότερο ερευνητικό ενδιαφέρον και μπορούν επίσης να κορεστούν με ανόργανα άλατα, όπως το NaCl [42,45,50-54].

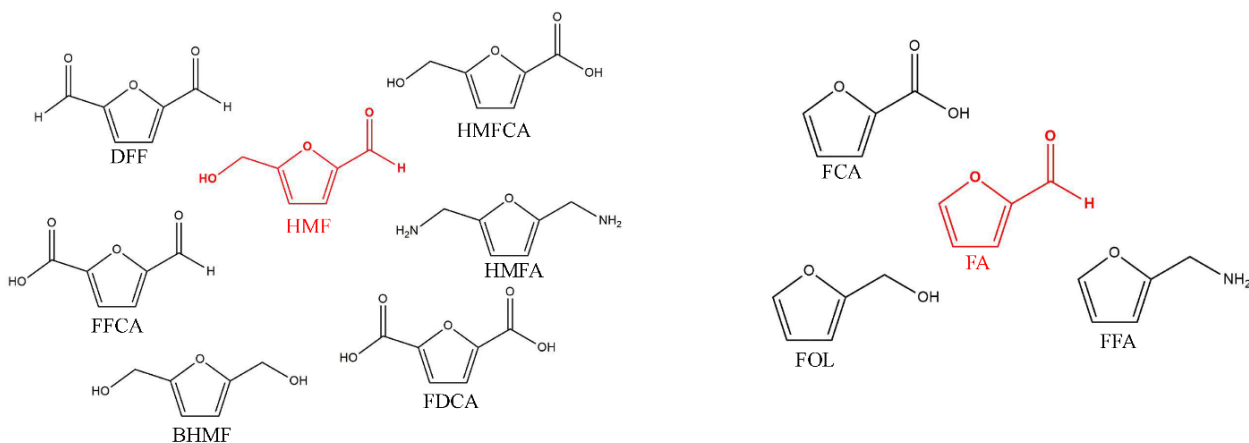
2.6 Ενζυμική μετατροπή των φουρανίων σε δομικές ενώσεις (building blocks) για τη σύνθεση πολυμερών

Όπως προαναφέρθηκε τα φουράνια, 5-υδροξυμεθυλοφουρφουράλη (HMF) και φουρφουράλη (FA), που παράγονται από την αφυδάτωση της φρουκτόζης και της ξυλουλόζης, αντίστοιχα (εφόσον ληφθεί υπόψη και η ποσότητα της ξυλόζης που προκύπτει από την υδρόλυση της ημικυτταρίνης), βρίσκονται στο προσκήνιο της βιοτεχνολογικής έρευνας καθώς μπορούν να λειτουργήσουν ως πρόδρομες ενώσεις για διαλύτες, βιοκαύσιμα και διάφορα σημαντικά μονομερή που χρησιμοποιούνται για τη σύνθεση πολυμερών και ρητινών. Προκειμένου αυτό να καταστεί εφικτό απαιτείται η εκλεκτική τους οξείδωση προς έναν αριθμό ιδιαίτερα λειτουργικών ενώσεων, όπως καρβοξυλικά οξέα, διαλδεΐδες και υδροξυοξέα μεταξύ άλλων, που κατά κύριο λόγο παράγονται βιομηχανικά μέσω χημικής σύνθεσης. Ωστόσο, η χρήση μεταλλικών και οργανικών καταλυτών και οι υψηλές θερμοκρασίες και πιέσεις καθιστούν τις χημικές μεθόδους μη φιλικές προς το περιβάλλον και ενδεχομένως μη οικονομικά συμφέρουσες, καθώς για να εξασφαλιστεί η καλύτερη δυνατή επιλεκτικότητα και κατ' επέκταση η μεγαλύτερη καθαρότητα στο προϊόν είναι απαραίτητα κάποια βήματα καθαρισμού, τα οποία όσο περισσότερα είναι, τόσο χαμηλότερη είναι η τελική απόδοση και τόσο υψηλότερο το κόστος της αντίδρασης. Η επιστημονική έρευνα έχει επικεντρωθεί στην ανάπτυξη περισσότερο περιβαλλοντικά φιλικών διαδικασιών παραγωγής που βασίζονται σε ένζυμα ή σε ολόκληρους μικροοργανισμούς. Αυτές οι βιοκαταλυτικές προσεγγίσεις, πέρα από τη σημαντική μείωση των παραπροϊόντων και των αποβλήτων, χρησιμοποιούν ηπιότερες συνθήκες αντίδρασης και χαρακτηρίζονται από εξαιρετική επιλεκτικότητα. Ωστόσο, οι βιοτεχνολογικές διαδικασίες είναι γενικά πιο αργές με χρόνους αντίδρασης της τάξης των ημερών συγκριτικά με τις χημικές διεργασίες που είναι της τάξης των ωρών. Ακόμα, η ποικιλία των υποστρωμάτων που γίνονται αποδεκτά από τα ένζυμα είναι πολύ περιορισμένη σε σύγκριση με έναν χημικό καταλύτη, ενώ όσο πιο πολύπλοκο είναι το υπόστρωμα, τόσο λιγότερο πιθανό να είναι ενεργό το ένζυμο. Ακόμα, το HMF είναι τοξικό μόριο για τους ζωντανούς οργανισμούς με τις φουρανικές αλδεΐδες να προκαλούν βλάβη στα νουκλεϊκά οξέα, στις πρωτεΐνες και στα κυτταρικά οργανίδια των μικροοργανισμών μέσω του σχηματισμού των δραστικών μορφών οξυγόνου (ROS, reactive oxygen species). Έτσι, αναστέλλεται η δραστηριότητα των πρωτογενών μεταβολικών ενζύμων των μικροοργανισμών οι οποίοι αντιμετωπίζουν αργά τη φάση του θανάτου χωρίς περαιτέρω πολλαπλασιασμό. Παρ' όλα αυτά μερικοί μικροοργανισμοί όπως βακτήρια, μύκητες (λευκή σήψη και μυκήλια) και φύκια έχουν φυσικούς μηχανισμούς αποτοξίνωσης σε ξενοβιοτικά, αλδεΐδες και αλκοόλες, γι' αυτό και για την παραγωγή ενώσεων από HMF χρησιμοποιούνται βακτήρια και μύκητες με χαμηλές συγκεντρώσεις υποστρώματος. Οι μηχανισμοί που χρησιμοποιούν αρκετοί μικροοργανισμοί προκειμένου να μεταβολίζουν τα φουράνια είναι περίπλοκοι και η μετατροπή επιτυγχάνεται με την δράση πολλών διαφορετικών ενζύμων, όπως αλδεΐδικές αφυδρογονάσες ή οξειδάσες που μετατρέπουν

τις φουρανικές αλδεΐδες στις αντίστοιχες αλκοόλες ή οξέα, που είναι λιγότερο τοξικά. Επιπλέον, τα ένζυμα και τα κύτταρα των μικροοργανισμών είναι συχνά ασταθή συστήματα, ευαίσθητα σε διακυμάνσεις του pH και της θερμοκρασίας, καθώς και σε παρεμποδίσεις που προκαλούνται από το προϊόν ή από την περίσσεια υποστρώματος. Η αρχή των βιοαντιδραστήρων ημι-διαλείποντος έργου επιτρέπει την προσθήκη του υποστρώματος, HMF, σε χαμηλές ποσότητες συνεχώς αντί της προσθήκης όλου του υποστρώματος από την αρχή. Αυτή η στρατηγική καθιστά δυνατή την αποφυγή της τοξικότητας και αναστολής ολόκληρων κυττάρων από τη μεγάλη ποσότητα HMF, καθώς επίσης τα καθιστά ικανά να συσσωρεύουν υψηλές συγκεντρώσεις προϊόντος, με αποτέλεσμα η παραγωγικότητα της διαδικασίας να βελτιώνεται και να διευκολύνεται ο καθαρισμός. Πάντως μέχρι στιγμής οι αποδοτικότητες βιομετασχηματισμού δεν είναι ικανοποιητικές, ειδικά σε υψηλές συγκεντρώσεις υποστρώματος, που είναι οι επιθυμητές για την παραγωγή μεγάλης κλίμακας, οπότε από τεχνική άποψη παραμένουν σημαντικές προκλήσεις για τη βιοκαταλυτική αναβάθμιση των βιο-φουρανίων [1,25,27,28,39].

2.6.1 Παράγωγα των φουρανίων

Το HMF, που προκύπτει από την αφυδάτωση της φρουκτόζης, αποτελείται από έναν ετεροκυκλικό φουρανικό δακτύλιο που φέρει τόσο αλδεϋδικές όσο και αλκοολικές λειτουργικές ομάδες και στις δύο πλευρές και γι' αυτό είναι μια ευέλικτη χημική πλατφόρμα από την οποία μπορεί να παραχθεί φουρανο-2,5-δικαρβαλδεΐδη (DFF), 5-υδροξυμεθυλ-2-φουρανοδικαρβοξυλικό οξύ (HMFCFA), 2,5-φορμυλοφουρανοκαρβοξυλικό οξύ (FFCA), 2,5-φουρανοδικαρβοξυλικό οξύ (FDCA), 5-(υδροξυμεθυλ)φουρφοουριλαμίνη (HMFA) και 2,5-δις(υδροξυμεθυλ)φουράνιο (BHMF). Επίσης, το αδιπικό οξύ, η 1,6-εξανοδιόλη, το λεβουλικό οξύ, η καπρολακτάμη και η καπρολακτόνη είναι οι μη φουμαρικές ενώσεις που παράγονται από το HMF. Παρόμοια, η FA εμφανίζει επίσης μια πιθανότητα οξειδωτικής μετατροπής, οδηγώντας στον σχηματισμό 2-φουρανοκαρβοξυλικού οξέος (φουροϊκό οξύ, FCA), 2-φουρφοουριλαμίνης (FFA) και 2-(υδροξυμεθυλ)φουρανίου (FOL). Οι πιο συχνές από τις αντιδράσεις βιομετατροπής των φουρανίων περιλαμβάνουν οξείδωση, αναγωγική αμίνωση (reductive amination) και αναγωγή των αλδεϋδών των φουρανίων σε αλκοόλες [1,27].



Σχήμα 8: Επισκόπηση των διαφορετικών μονομερών ενώσεων που παράγονται από HMF και FA [1].

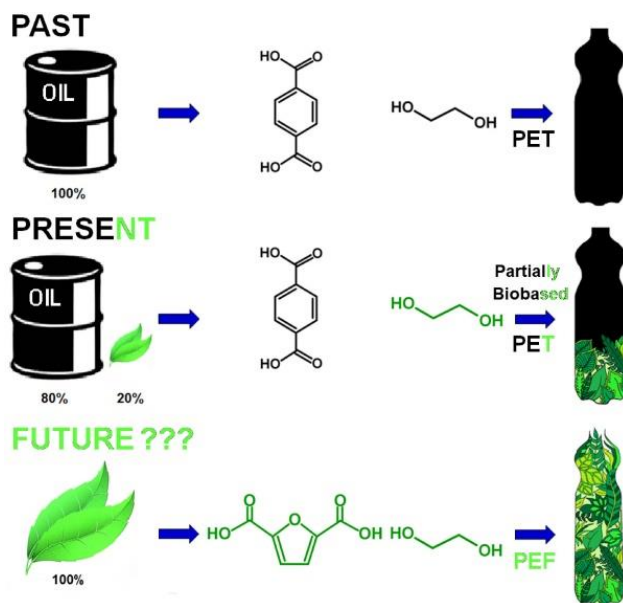
2.6.1.1 Τρόποι σύνθεσης του 2,5-φουρανοδικαρβοξυλικού οξέος (FDCA) και εφαρμογές του

Το FDCA, που αποτελεί μια οξειδωμένη και πιο σταθερή μορφή του HMF, έχει ξεχωρίσει μεταξύ αυτών των βασικών χημικών ενώσεων και αναφέρεται ως «*sleeping giant*» καθώς δυνητικά αποτελεί μια πηγή μεγάλης ποικιλίας χημικών και υλικών. Θεωρείται μία από τις πιο ενδιαφέρουσες και πολλά υποσχόμενες ενώσεις που προέρχονται από φουράνια και συγκαταλέγεται ανάμεσα στα δώδεκα πιο σημαντικά χημικά-πλατφόρμες ενδιαφέροντος που προέρχονται από σάκχαρα σύμφωνα με το Υπουργείο Ενέργειας των ΗΠΑ (DOE). Αν και το FDCA έχει συντεθεί εδώ και περισσότερο από ενάμισι αιώνες, πρόσφατα παρατηρείται μια έντονη ερευνητική δραστηριότητα σχετικά με τις συνθετικές οδούς του και τη βιομηχανική του παραγωγή. Οι Fittig and Heinzelman δημοσίευσαν την πρώτη μελέτη σχετικά με τη σύνθεση του FDCA το 1876 μέσω αφυδάτωσης του γαλακταρικού οξέος (galactaric acid) με υδροβρωμικό οξύ και λίγα χρόνια αργότερα, το 1888, οι Sohst και Tollens χρησιμοποίησαν το ισομερές σακχαρικό οξύ για τη σύνθεσή του. Η οξείδωση του HMF και των παραγώγων του αναφέρθηκε αρχικά το 1899, ακολουθούμενη το 1936 από τη συμπύκνωση της γλυοξάλης με διγλυκολικό διμεθυλεστέρα παρουσία μεθοξειδίου του νατρίου ως εναλλακτική προσέγγιση για τη σύνθεση του FDCA. Ωστόσο, η ανάπτυξη της συνθετικής διαδικασίας του FDCA και των σχετικών πολυμερών διακόπηκε μετά από αυτές τις πρώτες μελέτες και συνεχίστηκε μόνο τα τελευταία 10 χρόνια. Έχουν προταθεί διάφορα χημικά μονοπάτια για την οξείδωση του HMF σε FDCA, που περιλαμβάνουν τη χρήση στοιχειομετρικών οξειδωτικών, ομοιογενών μεταλλικών αλάτων (ή μεταλλικών καταλυτών) όπως Co/Mn/Br, μεταλλικών καταλυτών και νανοσωματιδίων όπως Pd/Au/Pt/Ru και θειοπορφυραζίνη κοβαλτίου, οργανικών καταλυτών όπως DMSO ή πορώδων οργανικών πολυμερών με βάση την πορφυρίνη που φέρουν και Fe^{III}. Παρ' όλα αυτά αυτές οι χημικές μέθοδοι είναι μη φιλικές προς το περιβάλλον και ακριβές, καθώς πραγματοποιούνται σε υψηλές θερμοκρασίες και πιέσεις και παράγουν ένα μείγμα FDCA, ενδιάμεσων οξειδωτικών προϊόντων και παραπροϊόντων, όπως χουμικό, λεβουλικό και μυρμηκικό οξύ. Επιπλέον, υπό τις συνθήκες που πραγματοποιείται η οξείδωση του FDCA, το HMF τείνει να πολυμερίζεται, με αποτέλεσμα οι αποδόσεις του FDCA από τις εξόζες να είναι γενικά χαμηλές. Από την άλλη, οι βιοχημικές μέθοδοι αν και λιγότερο εδραιωμένες αποτελούν αποτελεσματικές και φιλικές προς το περιβάλλον διαδικασίες για τη σύνθεση FDCA λόγω των ηπιότερων συνθηκών αντίδρασης και της υψηλής εκλεκτικότητας των ενζύμων. Επί του παρόντος, αυτός ο βιομετασχηματισμός πραγματοποιείται χρησιμοποιώντας ανασυνδυασμένα και μη ένζυμα και παρόλο που η παραγωγή του HMF από βιομάζα με χαμηλό κόστος ακόμα δεν έχει υλοποιηθεί, είναι μια προσέγγιση που θα επιτρέψει τον προσανατολισμό προς μια πράσινη παραγωγή πολυμερών [1,22,24,25,26,27].

Το FDCA είναι μια βιοχημική δομική ένωση που χρησιμοποιείται για την παραγωγή πολυμερών (πολυεστέρων και πολυαμιδίων) με πιο γνωστή εφαρμογή τη λειτουργία του ως υποκατάστατο του τереφθαλικού οξέος (TPA) που παρασκευάζεται από το πετρέλαιο συνθέτοντας έτσι το νέας γενιάς βιο-πολυμερές 2,5-φουρανοδικαρβοξυλικό πολυαιθυλένιο (PEF), το οποίο μπορεί να είναι μια πράσινη εναλλακτική λύση για το μη αποικοδομήσιμο και ευρέως χρησιμοποιούμενο τереφθαλικό πολυαιθυλένιο (PET) στην παραγωγή πλαστικών μπουκαλιών και στη βιομηχανία συσκευασίας τροφίμων και ποτών. Η δομική ομοιότητα του FDCA με το TPA αποδίδεται κυρίως στον αρωματικό φουρανικό δακτύλιο με τις δύο καρβοξυλικές ομάδες σε αντίθετες θέσεις. Βέβαια, η υποκατάσταση του φαινυλικού δακτυλίου του TPA με τον φουρανικό δακτύλιο του FDCA, μειώνει την αρωματικότητα και τον προσανατολισμό κατά μήκος της αλυσίδας του πολυμερούς, ελαττώνοντας έτσι την ομοιοπολική ισχύ κατά μήκος του άξονα της αλυσίδας. Ωστόσο, αυξάνεται η πολικότητα του πολυμερούς λόγω της

παρουσίας ατόμου οξυγόνου με δύο μονήρη ζεύγη ηλεκτρονίων, αυξάνοντας τις αλληλεπιδράσεις μεταξύ διαφορετικών αλυσίδων, με αναπόφευκτη επίδραση στις ιδιότητες των επακόλουθων υλικών. Σε σύγκριση με το PET, το PEF έχει καλύτερες ιδιότητες φραγμού του CO₂ και O₂, αφού παρουσιάζει 10 φορές χαμηλότερη διαπερατότητα O₂ και 20 φορές χαμηλότερη διαπερατότητα CO₂ από το τερεφθαλικό ομόλογό του. Επιπλέον, το PEF έχει ανώτερες θερμικές και μηχανικές ιδιότητες για διάφορες εφαρμογές όπως τρόφιμα, συσκευασίες, μπουκάλια και ρούχα. Το χαμηλό T_m (210 - 215°C) του επιτρέπει να μπορεί να επεξεργάζεται σε χαμηλές θερμοκρασίες, ενώ το υψηλό T_g (82 - 89°C) του προσδίδει αντοχή σε υψηλές θερμοκρασίες. Ακόμα, κατά την παραγωγή του PEF η απαιτούμενη ενέργεια και οι εκπομπές των αερίων του θερμοκηπίου μπορούν να μειωθούν κατά περίπου 40% - 45% και 45% - 50%, αντίστοιχα, σε σύγκριση με την παραγωγή του PET.

Το PEF λόγω των θερμοχημικών και μηχανικών ιδιοτήτων του, των ιδιοτήτων φράγματος αερίου και των ιδιοτήτων ανακυκλωσιμότητας του μπορεί επίσης να χρησιμοποιηθεί ως εναλλακτική λύση για το τερεφθαλικό πολυβουτυλένιο (PBT) πέρα από το PET για την παραγωγή φιλμ, ίνων, υλικών συσκευασίας και μπουκαλιών αναψυκτικών. Προκειμένου να συντεθεί το PEF και το PBF (φουρανοϊκό πολυβουτυλένιο), το FDCA πρέπει να συνδυαστεί με αιθυλενογλυκόλη. Η διαθέσιμη στρατηγική σήμερα, η οποία έχει υιοθετηθεί από ορισμένες εταιρείες, βασίζεται στη χρήση βιοαιθυλενογλυκόλης (EG) και μη ανανεώσιμου TPA, με χαρακτηριστικό παράδειγμα χρήσης αυτής της μεθόδου την εταιρεία Coca Cola που παρήγαγε 30% ανανεώσιμο PET με την εμπορική ονομασία PlantBottle. Το PEF συντίθεται αποτελεσματικά μέσω πολυμερισμού μεταξύ του FDCA και της βιοαιθυλενογλυκόλης (EG) με απόδοση μεγαλύτερη από 90% με το συγκριτικό πλεονέκτημα ότι βασίζεται εξ ολοκλήρου σε ανανεώσιμους πόρους. Παρόλο που δεν υπήρξε μεγάλη βιομηχανική παραγωγή του PEF εξαιτίας της μικρότερης καθαρότητάς του και των δυσκολιών στη διεργασία παραγωγής του FDCA, αναμένεται να διεισδύσει πλήρως στις υπάρχουσες αγορές ως ένα εντελώς νέο πολυμερές με υψηλές ιδιότητες απόδοσης. Πράγματι, καταβάλλεται μεγάλη προσπάθεια για την ταχεία βιομηχανική ανάπτυξη του FDCA, γι' αυτό η Avantium έχει συνάψει συνεργασίες με την Swire Pacific, The Coca-Cola Company, Danone και Alpla, μεταξύ άλλων, με χρηματοδότηση κοντά στα 36 εκατομμύρια ευρώ με στόχο την εμπορευσιμότητα του PEF, ενώ με βάση την τεχνολογία YXY της Avantium, το PEF παράγεται πλέον βιομηχανικά για τυπικές εφαρμογές όπως μεμβράνες, ίνες, και ιδίως για συσκευασίες αναψυκτικών, νερού και αλκοολούχων ποτών μεταξύ άλλων. Έτσι, διερευνάται μια πραγματικά πράσινη προσέγγιση παραγωγής του PEF με χρήση ανανεώσιμων πηγών, ιδίως λιγνινοκυτταρινούχου βιομάζας, που θα επιφέρει μείωση έως και 40-50% της χρήσης μη ανανεώσιμων πηγών ενέργειας και θα ενισχύσει την ιδέα της ανακύκλωσης και επαναχρησιμοποίησης [25,26,27,38].



Σχήμα 9: Το παρελθόν, το παρόν και το μέλλον των πλαστικών μπουκαλιών αναφορικά με το πολυμερές που παρασκευάζονται [25].

Επίσης, το FDCA έχει δύο ομάδες δικαρβοξυλικού οξέος, που μπορούν να χρησιμοποιηθούν σε αντιδράσεις πολυσυμπύκνωσης, ενώ με εστεροποίηση μπορεί να σχηματίσει 2,5-φουρανοδικαρβοξυλικό διμεθύλιο (DMFDCA) ή 2,5-φουρανοδικαρβοξυλικό διαιθύλιο, τα οποία χρησιμοποιούνται γενικά σε πολυμερισμούς λόγω της καλύτερης αντιδραστικότητας και διαλυτότητας τους και του χαμηλότερου σημείου τήξεως σε σύγκριση με το FDCA [23,25].



Σχήμα 10: Η χημική δομή του FDCA και της εστεροποιημένης μορφής του DMFDCA [23].

Επιπλέον, το FDCA είναι ένα αρωματικό μονομερές που μπορεί να χρησιμοποιηθεί για τη σύνθεση άλλων πολυεστέρων, πολυαμιδίων και σημαντικών φουρανικών χημικών ενώσεων. Μπορεί να αξιοποιηθεί για την παραγωγή βιοχημικών όπως το ηλεκτρικό οξύ, το ισοδεκυλοφουραν-2,5-δικαρβοξυλικό, το ισονουλοφουραν-2,5-δικαρβοξυλικό, το διπεντύλοφουραν-2,5-δικαρβοξυλικό, το διεπτύλοφουραν-2,5-δικαρβοξυλικό και το πολυ (αιθυλένο δωδεκανοδιοϊκό-2,5-φουρανοδικαρβοξυλικό) (PEDF). Το FDCA είναι ακόμα ένα σημαντικό συστατικό στην παρασκευή εξανοϊκού οξέος, μακροκυκλικών υποκαταστατών, μυκητοκτόνων, αναστολέων διάβρωσης και φιλμ θειολενίου. Παράγωγα του FDCA όπως το 2,5-διυδροξυμεθυλοφουράνιο και το 2,5-δισ (υδροξυμεθυλο) τετραυδροφουράνιο θα μπορούσαν να χρησιμοποιηθούν στην παραγωγή νέων πολυεστέρων ως συστατικά αλκοόλης, ενώ το FDCA μπορεί να αποτελέσει μονομερές στην παραγωγή διχλωριδίου-(FDCDCl), διμεθυλο-(DMFDC) και δισ (υδροξυαιθυλ)-(BHEFDC) παραγώγων για την παραγωγή πλαστικοποιητών, πολυαμιδίων και πολυεστέρων. Τέλος, το FDCA έχει χηλικές ιδιότητες με ιόντα (Ca^{2+} , Cu^{2+} και Pb^{2+}) και εφαρμόζεται ως

φάρμακο για την αφαίρεση της πέτρας από τα νεφρά, ενώ οι διαιθυλεστέρες του έχουν αναισθητικές ιδιότητες παρόμοιες με αυτές της κοκαΐνης [24,27].

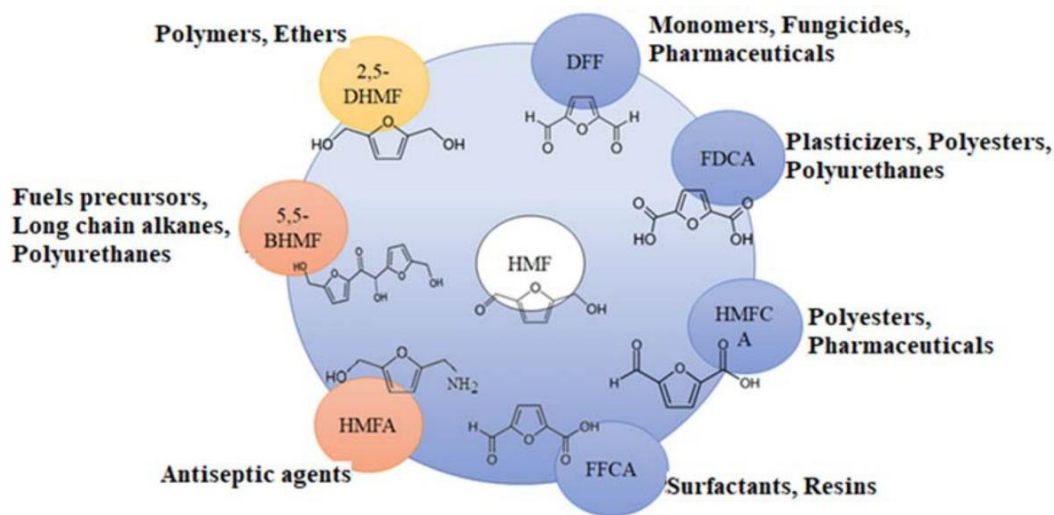
2.6.1.2 Εφαρμογές άλλων παραγώγων ενώσεων του HMF

Το 2,5-δι(υδροξυμεθυλ)φουράνιο (BHMF) είναι μια διόλη η οποία λαμβάνεται με αναγωγή του αλδεϋδικών ομάδων του HMF και χρησιμοποιείται για την παραγωγή πολυμερών, καυσίμων και μακροκυκλικού πολυαιθέρα.

Η φουρανο-2,5-δικαρβαλδεΐδη (DFF) είναι μια διαλδεΐδη που λαμβάνεται με άμεση οξείδωση του HMF. Το DFF χρησιμοποιείται κυρίως ως πρόδρομη ένωση για τη σύνθεση φαρμάκων, πολυμερών, μυκητοκτόνων και υλικών.

Το 5-υδροξυμεθυλ-2-φουρανοδικαρβοξυλικό οξύ (HMFA) είναι μια ένωση φουρανίου που χρησιμοποιείται για την παραγωγή αναστολέων ιντερλευκίνης, ινών, πλαστικών και φαρμακευτικών προϊόντων. Λαμβάνεται με οξείδωση της αλδεϋδικής ομάδας του HMF μέσω πρωτονίωσης που ακολουθείται από πυρηνόφιλη υποκατάσταση.

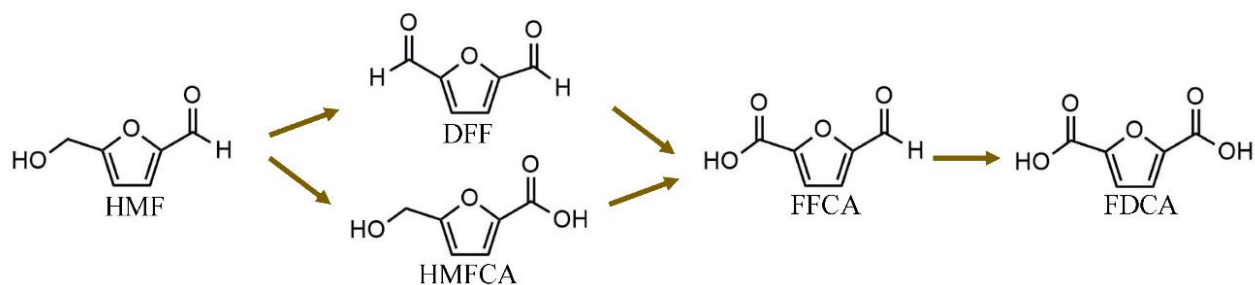
Το 2,5-φορμυλοφουρανοκαρβοξυλικό οξύ (FFCA) είναι το προϊόν δύο διαδοχικών οξειδώσεων του HMF μέσω DFF ή μέσω HMFA και αποτελεί μια ενδιαφέρουσα ενδιάμεση ένωση για τη σύνθεση τασιενεργών, βιοκαυσίμων και ρητινών [25].



Σχήμα 11: Βιομετατροπή του HMF σε διαφορετικά παράγωγα προστιθέμενης αξίας (FDCA, DFF, HMFA, FFCA, DHMF, BHMF, HMFA) και βιομηχανικές εφαρμογές αυτών [41].

2.6.2 Οξειδωτικές αντιδράσεις του HMF για την παραγωγή FDCA

Για να παραχθεί το FDCA μπορούν να ακολουθηθούν δύο μονοπάτια καθένα από τα οποία αποτελείται από τρεις διαδοχικές οξειδώσεις. Σύμφωνα με το πρώτο μονοπάτι οι αλδεϋδικές ομάδες του HMF οξειδώνεται στο αντίστοιχο καρβοξυλικό οξύ, δηλαδή στο 5-υδροξυμεθυλ-2-φουρανοκαρβοξυλικό οξύ (HMFCFA), ενώ σύμφωνα με το δεύτερο οι αλκοολικές ομάδες οξειδώνονται στην αντίστοιχη αλδεϋδη, δηλαδή σε φουραν-2,5-δικαρβοαλδεϋδη (DFF). Στη συνέχεια, τα μονοπάτια ακολουθούν την ίδια πορεία με την εκάστοτε χημική ένωση να μετατρέπεται σε 2,5-φορμυλφουρανοκαρβοξυλικό οξύ (FFCA) που με τη σειρά του οδηγεί στην παραγωγή FDCA [1].



Σχήμα 12: Σχηματική αναπαράσταση των οξειδωτικών αντιδράσεων των παραγώγων του HMF [1].

2.6.3 Βιβλιογραφική επισκόπηση βιοκαταλυτικών μεθόδων για την πραγματοποίηση των οξειδωτικών αντιδράσεων του HMF

Σχετικά με το δίλημμα της χρήσης απομονωμένων ενζύμων ή ολόκληρων μικροοργανισμών για την πραγματοποίηση των οξειδωτικών αντιδράσεων του HMF για τη βιοκαταλυτική παραγωγή του FDCA, η απάντηση είναι πιο περίπλοκη. Ειδικότερα, ο καθαρισμός των απομονωμένων ενζύμων είναι χρονοβόρος και ακριβός, ενώ συχνά απαιτούν ακινητοποίηση για να αυξήσουν τη σταθερότητα ή/και τη δραστηρότητά τους. Ένας τρόπος για να αντιμετωπιστούν αυτά τα μειονεκτήματα είναι η χρήση ολόκληρων των μικροοργανισμών για την κατάλυση διαφόρων χημικών αντιδράσεων. Πράγματι, τα ένζυμα που περιέχονται στα κύτταρα των μικροοργανισμών είναι πιο σταθερά στο φυσικό κυτταρικό τους μέσο συγκριτικά με όταν απομονώνονται, ενώ ορισμένα μπορούν να καταλύουν μόνο σε αυτό, καθώς δεν δύναται να απομονωθούν σε μια ενεργή μορφή. Τα κύτταρα αυτά έχουν το πλεονέκτημα ότι μπορούν να δράσουν σε διάφορα στάδια με τη συνδυασμένη δράση πολλών ενζύμων και συνενζύμων, όπως το ATP και το NADH, χρησιμοποιώντας τους κυτταρικούς μηχανισμούς. Έχουν μελετηθεί μονοπάτια αποικοδόμησης της φουρφοουράλης και του HMF στον *Cupriavidus basilensis* HMF14 με την εξαρτώμενη από FAD HMF/φουρφοουραλική οξειδοοδουκτάση (HmfH) που μετατρέπει το HMF σε HMFCFA. Με μια προσέγγιση βιομετασχηματισμού ολόκληρων κυττάρων (whole-cell biotransformation) με χρήση του *Pseudomonas putida* S12 ως κύτταρο ξενιστή και την HMFO από τον *C. basilensis* HMF14 επιτεύχθηκε παραγωγή FDCA με απόδοση 97% σε διεργασία ημι-διαλείποντος έργου. Επίσης, ως κύτταρο ξενιστής έχει εξεταστεί και ο *Raoultella ornithinolytica* BF60 με δύο εισαγόμενα γονίδια, τα οποία κωδικοποιούν

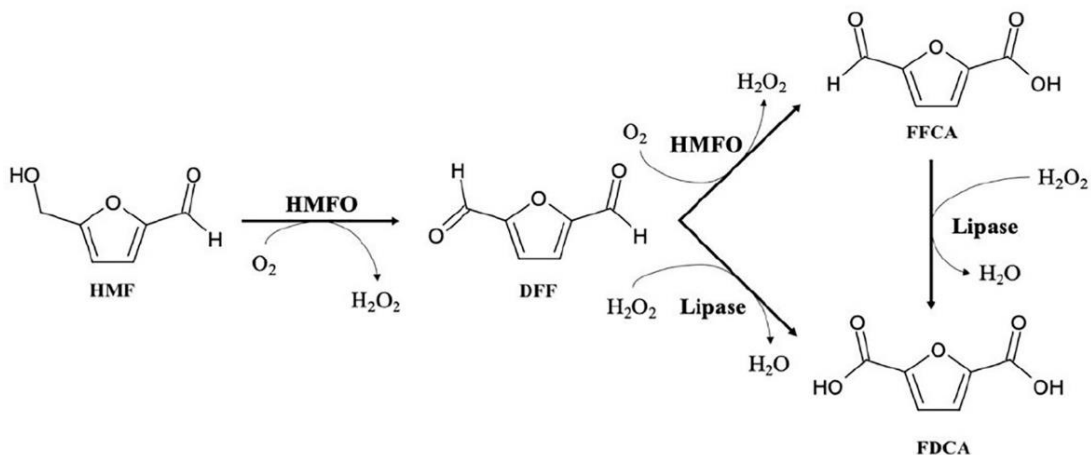
την HMF οξειδάση (HMFO) από τον *Methylovorus sp.* και την HMF/ φουρφουραλική οξειδοοξειδάση (HmfH) από *C. basilensis* HMF14 και η γραμμομοριακή αναλογία μετατροπής του HMF σε FDCA αυξήθηκε από 51.0 σε 93.6%. Ωστόσο αυτές οι προσεγγίσεις παρουσιάζουν προβλήματα όπως η ανάγκη για συνεχή τροφοδοσία άνθρακα, ανεπιθύμητες παρενέργειες λόγω του πλήθους των ενζύμων στον μικροοργανισμό, επιβράδυνση των αντιδράσεων λόγω της χαμηλής συγκέντρωσης ενζύμων, ενώ οι συγκεντρώσεις των υποστρωμάτων και των προϊόντων είναι χαμηλότερες λόγω προβλημάτων τοξικότητας. Έτσι, μελετάται ιδιαίτερα η βιομετατροπή του HMF από απομονωμένα ένζυμα, που χαρακτηρίζονται από υψηλή παραγωγικότητα, χρήση υψηλής συγκέντρωσης ενζύμων και μικρότερο χρόνο αντίδρασης. Αν και θα πλεονεκτούσε η χρήση ενός μόνο ενζύμου σε σύγκριση με πολλών βιοκαταλυτών εφόσον δεν θα απαιτούνταν ο συνδυασμός διαφορετικών συνθηκών λειτουργίας, εντούτοις παρουσιάζει δυσκολίες λόγω της απουσίας μιας HMF οξειδάσης και της πολυπλοκότητας της οξείδωσης. Τα περισσότερα ένζυμα περιορίζονται είτε στην οξείδωση των αλκοολών είτε στην οξείδωση των αλδεϊδών, ενώ η πλήρης οξείδωση του HMF προς FDCA απαιτεί ένα ένζυμο που δρα τόσο στις αλκοολικές όσο και στις αλδεϊδικές ομάδες. Επίσης, δεδομένου ότι πρόκειται για μια συνολική αντίδραση τριών βημάτων, μέχρι στιγμής οι διαδικασίες που χρησιμοποιούν ένα μόνο ένζυμο είναι αρκετά περιορισμένες, καθώς προσφέρουν λίγες επιλογές βελτιστοποίησης των αποδόσεων τους. Γι' αυτό εφαρμόζεται μια στρατηγική δύο βημάτων, χρησιμοποιώντας τον συνδυασμό ενζύμων υψηλής απόδοσης για κάθε στάδιο οξείδωσης που συχνά απαιτούν και την προσθήκη συμπαραγόντων/συνενζύμων όπως καταλάσης, HRP, μεθανόλης, FAD και NAD⁺ [1,22,25,29].

Έτσι, μελετώνται καταλύτες που μπορούν να πραγματοποιήσουν οξειδώσεις σε αλδεΐδες και αλκοόλες, οι κύριοι από τους οποίους είναι αλκοολικές οξειδάσες αλκοόλων, οξειδάσες γαλακτόζης, υδροξυμεθυλοφουρφουραλικές οξειδάσες, λακάσες, καταλάσες και υπεροξυγενάσες. Οι οξειδάσες δρουν στις αλκοολικές ή στις αλδεϊδικές ομάδες αυτών των ενώσεων με την μοναδική απαίτηση του μοριακού οξυγόνου ως συν-υπόστρωμα, ενώ οι αιμο-θειολικές υπεροξειδάσες/υπεροξυγενάσες μπορούν να υδροξυλιώσουν κάποιες από τις ενώσεις με τη χρήση H₂O₂. Έξυπνοι συνδυασμοί των παραπάνω ενζύμων έχουν αναφερθεί για την παραγωγή FDCA από το HMF εκμεταλλευόμενοι το γεγονός ότι το παραπροϊόν των οξειδωσών, το H₂O₂, είναι το συν-υπόστρωμα που χρειάζονται οι υπεροξειδάσες/υπεροξυγενάσες [1,32].

Μία μελέτη που πραγματοποιήθηκε από τους Dijkman et al. εξετάζει την HMF οξειδάση (HMFO) που προέρχεται από τον *Methylovorus sp.* και αποτελεί μια FAD-εξαρτώμενη οξειδάση που ανήκει στην οικογένεια των γλυκοζο-μεθανολο-χολινο οξειδοοξειδάσων (GMC) και έχει οξειδωτική δράση στο HMF για την παραγωγή FDCA χρησιμοποιώντας μοριακό οξυγόνο ως συμπάραγοντα. Παρόλο που είναι το πρώτο ένζυμο που βρέθηκε να εμφανίζει οξειδωτική δράση στο HMF, μπορεί να χρησιμοποιηθεί για ένα ευρύ φάσμα υποστρωμάτων και να δεχθεί πολλές διαφορετικές αρωματικές αλκοόλες και αλδεΐδες που σχετίζονται με το HMF. Επίσης, έχει τη δυνατότητα να παράγει FDCA από HMF ακολουθώντας και τα δύο μονοπάτια που περιλαμβάνουν τα 3 διαδοχικά βήματα οξείδωσης που περιεγράφηκαν, γεγονός ιδιαίτερα αξιοσημείωτο σε σύγκριση με τις περισσότερες οξειδάσες που πραγματοποιούν μόνο μια οξείδωση. Κάθε βήμα οξείδωσης περιλαμβάνει την οξείδωση δύο ηλεκτρονίων κατά την οποία χρησιμοποιείται ένα μόριο O₂ και απελευθερώνεται ένα μόριο H₂O₂ από το ένζυμο. Βέβαια, όπως προκύπτει από τις πειραματικές μελέτες, η συγκεκριμένη οξειδάση φαίνεται να ακολουθεί περισσότερο το πρώτο μονοπάτι με την παραγωγή του ενδιάμεσου DFF, ενώ το δεύτερο μονοπάτι δεν χρησιμοποιείται. Η αλκοολική οξείδωση από τις FAD-εξαρτώμενες οξειδάσες περιλαμβάνει αρχικά την αφαίρεση ενός πρωτονίου από τις αλκοολικές ομάδες και ακολουθείται από τη μεταφορά ενός υδριδίου

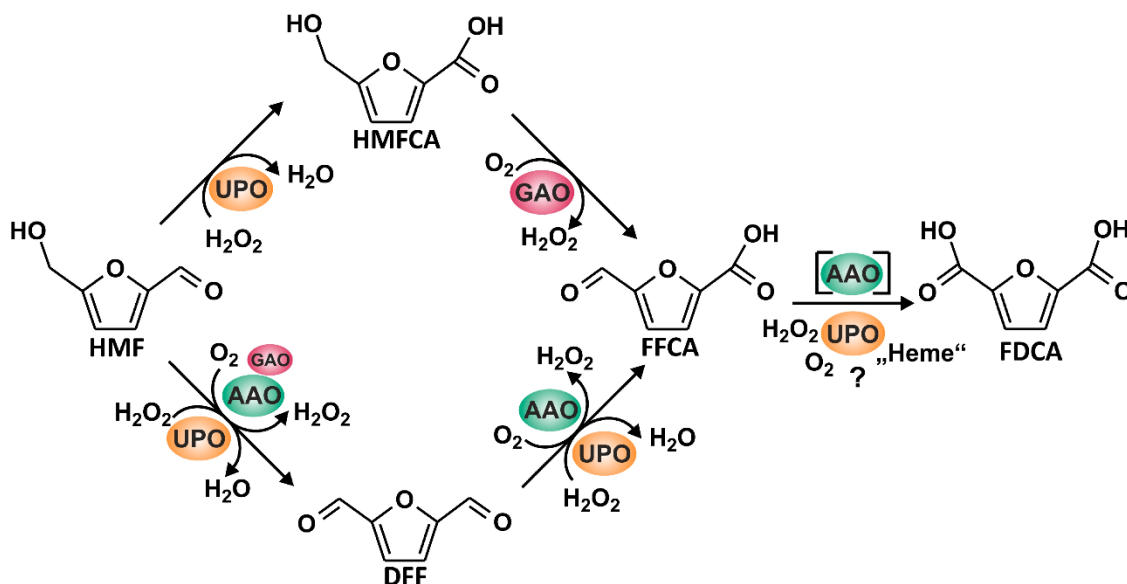
από το άτομο του α-άνθρακα της αλκοόλης στο δινουκλεοτίδιο φλαβίνης αδενίνης ή αλλιώς στο συνένζυμο FAD. Αυτός ο μηχανισμός δεν παρατηρείται στις αλδεΐδες και αυτό μπορεί να εξηγεί την προτίμηση αυτών των οξειδασών στις αλκοολικές ομάδες έναντι των αλδεϋδικών. Προκειμένου να πραγματοποιηθούν αντιδράσεις αλδεϋδικής οξείδωσης, οι αλδεϋδικές ομάδες δεν μπορούν να οξειδωθούν από μόνες τους, αλλά πρέπει να ενυδατωθούν στην αντίστοιχη διολική μορφή (gem diol), η οποία προωθείται από το συνένζυμο FAD και στη συνέχεια να οξειδωθούν από την HMFO. Επιπλέον, εφόσον η HMFO βασίζεται στο μη ομοιοπολικά συνδεδεμένο συνένζυμο FAD για την κατάλυση, εάν αυτό διαχωριστεί από το ένζυμο, καθιστώντας το έτσι ανενεργό, απαιτείται η προσθήκη FAD. Ένα ακόμα μεγάλο πλεονέκτημα των οξειδασών όπως η HMFO είναι η ανεξαρτησία τους από ακριβούς συμπαραγόντες, καθώς χρησιμοποιούν μοριακό οξυγόνο ως τελικό δέκτη ηλεκτρονίων. Έτσι, με τη χρήση της HMFO από 4 mM HMF επιτεύχθηκε απόδοση 95% σε FDCA μετά από 24 h σε θερμοκρασία και πίεση περιβάλλοντος, ενώ η υπολειπόμενη ενεργότητα της οξειδάσης διατηρήθηκε σχεδόν στο 100% μετά από 24 h επώασης, γεγονός που φανερώνει πως παρά τον εκτεταμένο χρόνο της επώασης το ένζυμο παρουσιάζει ιδιαίτερη σταθερότητα και μάλιστα λειτουργεί σε συνθήκες σαφώς ηπιότερες σε σχέση με αυτές των χημικών μεθόδων [1,22].

Δεδομένου ότι η οξείδωση του HMF από την HMFO χρειάζεται οξυγόνο ως οξειδωτικό και παράγει H_2O_2 ως παραπροϊόν, μια άλλη μελέτη των Wu et al. αναφέρει τη χρήση λιπάσης σε συνδυασμό με την HMFO, εφόσον η λιπάση αξιοποιεί το H_2O_2 για τη μετατροπή του DFF σε FDCA. Ειδικότερα, η λιπάση μπορεί να μετατρέψει την αλδεϋδη σε καρβοξυλικό οξύ με την παρουσία του H_2O_2 να δρα ως οξειδωτικός παράγοντας επιτυγχάνοντας υψηλή απόδοση και εξαιρετική επιλεκτικότητα με βάση την αντίδραση Baeyer-Villiger. Σε μια αντίδραση τύπου Baeyer-Villiger η λιπάση καταλύει τη μετεστεροποίηση των αλκυλεστέρων και του H_2O_2 για να σχηματιστούν υπεροξεία in situ ως ισχυρά οξειδωτικά. Η εμπορικά διαθέσιμη ακινητοποιημένη λιπάση από τον *Candida Antarctica* (CALB) οξειδώνει πλήρως το DFF σε FDCA μέσω FFCA με την προσθήκη H_2O_2 . Ωστόσο, λόγω του γεγονότος ότι η HMFO χρειάζεται περιβάλλον υδατικού διαλύματος, ενώ οι αλκυλεστέρες είναι απαραίτητοι για τη δραστηριότητα της λιπάσης, η αλυσιδωτή αντίδραση δεν μπορούσε να ολοκληρωθεί σε ένα στάδιο. Έτσι, πραγματοποιήθηκε αντίδραση δύο βημάτων και μετά από 10 ώρες αντίδρασης στους 25°C, επιτεύχθηκε μετατροπή 6 mM HMF σε FDCA με απόδοση 94% [25,29].



Σχήμα 13: Οι οξειδωτικές αντιδράσεις του HMF προς FDCA με συνδυασμένη χρήση HMFO και λιπάσης [25].

Για την οξείδωση του HMF σε FDCA μέσω αλυσιδωτών αντιδράσεων με πολλαπλά ένζυμα έχει μελετηθεί ο συνδυασμός διαφορετικών μυκητιακών οξειδοοδουκτασών ως καταλυτικό σύστημα, δηλαδή αρυλικών αλκοολικών οξειδάσων, οξειδάσης της γαλακτόζης και υπεροξυγενάσης. Αυτά τα ένζυμα πλεονεκτούν στη χρήση τους γιατί είναι γλυκοζυλιωμένα, δηλαδή εκκρίνονται από τους μύκητες στο μικροπεριβάλλον τους σε αντίθεση με τα βακτηριακά ένζυμα που εκκρίνονται εσωκυτταρικά ή περιπλασματικά. Μεταξύ αυτών των ενζύμων οι αρυλικές αλκοολικές οξειδάσες που ανήκουν στην οικογένεια των γλυκοζο-μεθανολο-χολίνο οξειδάσων/αφυδρογονασών (GMC), τυπικά οξειδώνουν τις πρωτοταγείς βενζυλικές αλκοόλες (π.χ. αυτές που γειτονεύουν με ένα αρωματικό σύστημα) στις αντίστοιχες αλδεΐδες και τις ένυδρες αλδεΐδες (gem-diacols) στο αντίστοιχο οξύ, αν και η τελευταία περίπτωση παρουσιάζει χαμηλότερες αποδοτικότητες. Ειδικότερα, μελετήθηκαν από τους Karich et al. τρεις αρυλικές αλκοολικές οξειδάσες, οι *PeryAAO*, *PostAAO* και *BaduAAO* που προέρχονται από τους μύκητες *Pleurotus eryngii*, *Pleurotus ostreatus* και *Bjerkandera adusta* αντίστοιχα και μια ανασυνδυασμένη οξειδάση της γαλακτόζης (εκφρασμένη σε *Aspergillus oryzae*), οι οποίες διαφέρουν σχετικά με το pH που λειτουργούν και την αποτελεσματικότητά τους απέναντι στα προϊόντα. Από τις τρεις αρυλικές αλκοολικές οξειδάσες επιλέχτηκε ως η καλύτερη η *PeryAAO*, που καταλύει επιλεκτικά παρουσία O₂ την οξείδωση της υδροξυλομάδας του HMF για την παραγωγή DFF και την επακόλουθη οξείδωση μιας από τις αλδεΐδομάδες (της ένυδρης ως gem-διόλη) του DFF για την παραγωγή FFCA, αλλά αδυνατεί να καταλύσει την πλήρη μετατροπή σε FDCA. Επίσης, μελετήθηκε η δράση της οξειδάσης της γαλακτόζης που μπορεί να μετατρέψει την υδροξυλομάδα των πρωτοταγών βενζυλικών αλκοολών στην αντίστοιχη αλδεΐδη, όπως η AAO, δηλαδή μετατρέπει το HMF σε DFF και το HMFCA σε FFCA, αλλά δεν παρουσιάζει καμία δράση στο DFF και στο FFCA. Τέλος, χρησιμοποιήθηκε η υπεροξυγενάση από τον *Agrocybe aegerita* (*AaeUPO*), η οποία καθώς καταναλώνει το H₂O₂ που παράγεται από τις οξειδάσες στα διαδοχικά στάδια οξείδωσης, οξειδώνει το HMF σε FDCA μέσω HMFCA και FFCA με μεταβλητές αποδόσεις μέσω ενός συνδυασμού αντιδράσεων υδροξυλίωσης και αφυδάτωσης, αν και πρόσφατα μελετήθηκε η οξείδωση του HMF σε FFCA και μέσω DFF από την UPO. Σε κάθε περίπτωση, μόνο με τη δράση της UPO λαμβάνονται χαμηλές ποσότητες FDCA, αλλά μετά από την ταυτόχρονη δράση των τριών παραπάνω ενζύμων που μελετήθηκαν, επιτεύχθηκε 80% μετατροπή του HMF στο επιθυμητό προϊόν FDCA μετά από 24 ώρες, με ιδιαίτερα αργό το στάδιο της μετατροπής του FFCA σε FDCA, αλλά χρησιμοποιήθηκε μεγάλη ποσότητα UPO για την πραγματοποίηση μιας σχετικά χαμηλής απόδοσης FDCA σε σύγκριση με άλλες μελέτες [27,32,34].



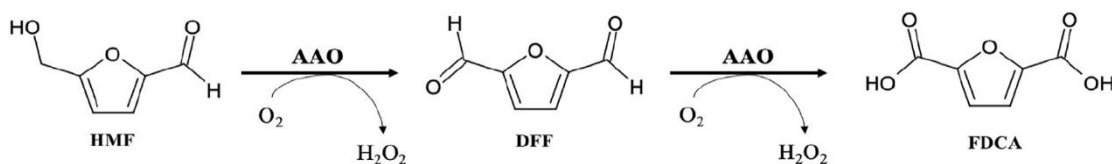
Σχήμα 14: Οι οξειδωτικές αντιδράσεις του HMF προς FDCA με συνδυασμένη χρήση AAO, GAO και AaeUPO [34].

Μια αντίστοιχη μελέτη πραγματοποιήθηκε από τους Carro et al. με την αρυλική αλκοολική οξειδάση (AAO) από τον *Pleurotus eryngii* να χρησιμοποιείται για τη μετατροπή του HMF σε FFCA, το οποίο στη συνέχεια σε ένα δεύτερο πολύ πιο αργό βήμα μετατρέπεται σε FDCA μέσω της υπεροξειγενάσης (UPO) από τον *Agrocybe aegerita*, αξιοποιώντας το H₂O₂ που παράγεται από τις δύο πρώτες οξειδώσεις. Ωστόσο, η UPO πραγματοποιεί παράλληλα οξείδωση του HMF σε HMFCFA, με αποτέλεσμα να υπάρχει διαθέσιμη λιγότερη ποσότητα H₂O₂ για τη δράση της UPO στη μετατροπή του FFCA στο FDCA που επιφέρει κατ' επέκταση μια περιορισμένη απόδοση του FDCA. Προκειμένου να αντιμετωπιστεί αυτό το ζήτημα, προτιμάται η διαδοχική προσθήκη των ενζύμων στην αντίδραση, ώστε με τη δράση της AAO να μετατρέπεται το HMF σε FFCA, ελευθερώνοντας δύο υπεροξειδία του υδρογόνου, τα οποία αξιοποιούνται από την UPO που προστίθεται σε δεύτερο χρόνο για να μετατρέψει το FFCA σε FDCA. Μετά από την αλυσωτή αντίδραση των ενζύμων AAO και UPO από 3mM HMF πραγματοποιήθηκε παραγωγή FDCA με απόδοση 91% μετά από 120 ώρες [24,25,27,31].

Στην ίδια λογική αναφέρεται από τους McKenna et al. μια μεταλλαγμένη οξειδάση γαλακτόζης και μια υπεροξειδάση που μπορούν να χρησιμοποιηθούν διαδοχικά και να δώσουν 46% απόδοση ακάθαρτου FDCA, ενώ έχει αναφερθεί και η χλωροϋπεροξειδάση από τον *Caldariomyces fumago*, η οποία οξειδώνει μερικώς το HMF. Και οι δύο περιπτώσεις χρησιμοποιούν χαμηλές συγκεντρώσεις υποστρώματος (1 mM) και απαιτούν προσθήκη H₂O₂ [24].

Ακόμα, μια μελέτη πραγματοποιήθηκε από τους Serrano et al. για τη μετατροπή του FFCA σε FDCA με τη δράση της αρυλικής αλκοολικής οξειδάσης (AAO) από τον *Pleurotus eryngii*, που σε άλλες μελέτες είχε θεωρηθεί αδύνατη εξαιτίας του χαμηλού βαθμού ενυδάτωσης του FFCA και της απενεργοποιητικής δράσης της καρβοξυλομάδας του FFCA στην αντίδραση μεταφοράς υδριδίου που χαρακτηρίζει την κατάλυση από AAO. Όπως διαπιστώθηκε από τη μελέτη, ενώ η AAO μπορεί να οξειδώσει μεμονωμένα το FFCA σε FDCA, αυτή η οξείδωση καθίσταται αδύνατη όταν προηγείται η οξείδωση του HMF σε DFF. Έτσι, ενώ η AAO είναι σχετικά σταθερή απέναντι στο H₂O₂ κατά τις πρώτες οξειδώσεις, η οξείδωση του

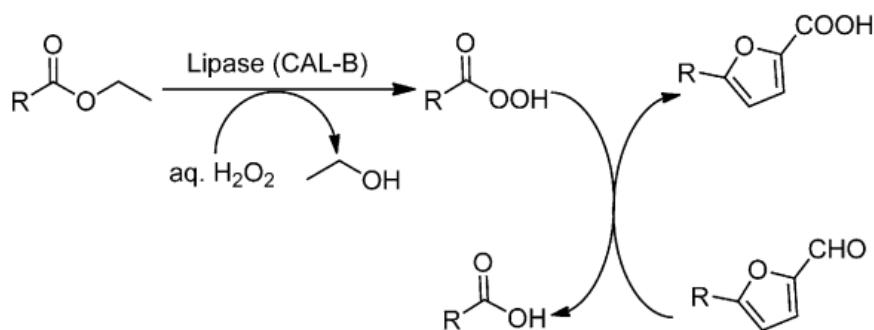
FFCA παρεμποδίζεται εξαιτίας των υψηλών συγκεντρώσεων H_2O_2 που έχουν αναπτυχθεί μέχρι εκείνο το στάδιο (≥ 12.5 mM). Έτσι, προτείνεται ο έλεγχος των επιπέδων H_2O_2 κατά τη διάρκεια της αντίδρασης να γίνεται με την προσθήκη μιας καταλάσης, που αποδομεί το H_2O_2 . Επίσης, υπό αυτές τις συνθήκες, αρκετές μεταλλάξεις στο ενεργό κέντρο της AAO επιτρέπουν την αύξηση του ρυθμού μετατροπής του FFCA σε FDCA, μειώνοντας κατά συνέπεια τους χρόνους της αντίδρασης και επιτυγχάνοντας υψηλότερες αποδόσεις μετατροπής. Με αυτόν τον τρόπο επιτεύχθηκε 100% μετατροπή από 1.5 mM HMF μετά από 12 μέρες στους 28 °C [25,32].



Σχήμα 15: Οι οξειδωτικές αντιδράσεις του HMF προς FDCA με χρήση AAO [25].

Επίσης, στη μελέτη των Mathieu et al. εξετάστηκε μια νέα αρυλική αλκοολική οξειδάση AAO από τον *Colletotrichum graminicola* που είναι σε θέση να καταλύει αποτελεσματικά την οξείδωση των αρυλ αλκοολών, αλλά επιδεικνύει ασθενή δράση προς υδατάνθρακες. Ως εκ τούτου, η AAO (EC 1.1.3.7) αναφέρθηκε ως το πρώτο μέλος της AA5 οικογένειας, των οποίων η δραστηριότητα είναι τυπικά παρόμοια με την οικογένεια (GMC) της οξειδοορεδοκτάσης AA3. Το ένζυμο κατάφερε να οξειδώσει αποτελεσματικά το HMF προς το DFF, αλλά μετέτρεψε μόνο μερικώς το HMFCA σε FFCA με απόδοση 54% [1,36].

Μια ακόμη μελέτη των Krystof et al. αναφέρει ένα σύστημα ενός σταδίου που αποτελείται από τον ακινητοποιημένο σε silica χημικό καταλύτη 2,2,6,6-τετραμεθυλοπιπεριδίνη 1-οξύλιο (TEMPO) και την εμπορικά διαθέσιμη ακινητοποιημένη λιπάση B από τον *Candida antarctica* (Immo-CALB) για τη μετατροπή του HMF σε FDCA. Ο χημικός καταλύτης TEMPO χρησιμοποιείται για την εκλεκτική οξείδωση της υδροξυμεθυλομάδας του HMF σε DFF, ενώ με την χρήση της λιπάσης ως βιοκαταλύτη, αλκυλεστέρων ως δότες ακυλίου και με την προσθήκη ένυδρου H_2O_2 επιτυγχάνεται ο σχηματισμός του υπεροξυ οξέος που καταλύει την περαιτέρω οξείδωση σε FDCA. Στον οξειδωτικό μηχανισμό των υπεροξυ οξέων είναι ευάλωτες μόνο οι αλδεϋδομάδες, ενώ οι υδροξυλομάδες δεν είναι. Με την συγκεκριμένη προσέγγιση επιτεύχθηκε απόδοση 83% σε FDCA [1,30].



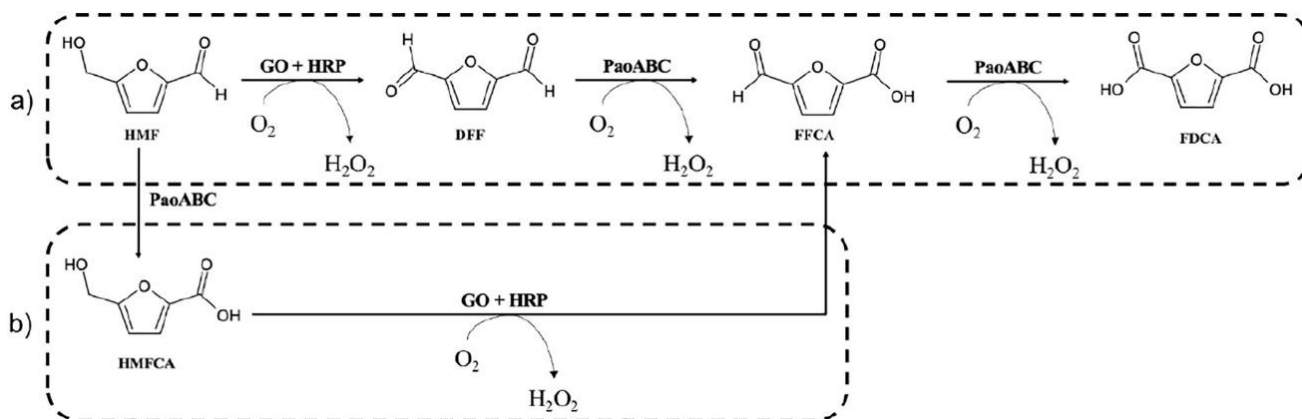
Σχήμα 16: Ο καταλυόμενος από λιπάση σχηματισμός υπεροξέων προκειμένου να πραγματοποιηθεί η χημειοενzymική οξείδωση των φουρανίων που προέρχονται από βιομάζα.

Σε μια ακόμα μελέτη των Daou et al. εξετάζονται τρεις γλυοξυλικές οξειδάσες (GLOX) από τον μύκητα *Rychnoporus cinnabarinus* για την οξείδωση του HMF με την παράλληλη δράση μιας AAO και μιας καταλάσης. Ειδικότερα, οι γλυοξυλικές οξειδάσες είναι μεταλλοένζυμα που περιέχουν ένα ιόν μετάλλου χαλκού και ανήκουν σε μια κατηγορία ενζύμων που ονομάζονται οξειδάσες ιόντων χαλκού. Καταλύουν την οξείδωση των αλδεϋδών στα αντίστοιχα καρβοξυλικά οξέα, παράγοντας ταυτόχρονα H₂O₂, δηλαδή μπορούν να οξειδώσουν αποτελεσματικά τις αλδεϋδικές ομάδες του HMF, σε αντίθεση με την HMFΟ. Από τις γλυοξυλικές οξειδάσες που μελετήθηκαν οι *PciGLOX2* και *PciGLOX3* είναι οι πιο αποτελεσματικές με κύριο προϊόν της αντίδρασης το HMFCA. Με την προσθήκη της καταλάσης αποτρέπεται το φαινόμενο της αυτό-παρεμπόδισης καθώς αξιοποιείται το H₂O₂, με αποτέλεσμα να βελτιώνεται η απόδοση της αντίδρασης, ενώ με την προσθήκη της αρυλικής αλκοολικής οξειδάσης από τον *Ustilago maydis* (*UmaAAO*) «παρακάμπτεται» η συσσώρευση του HMFCA και η αντίδραση κατευθύνεται προς το DFF και την παραγωγή FDCA. Έτσι, με τη χρήση της *UmaAAO* επιτεύχθηκε μετά από 2 h η παραγωγή του FDCA από το HMF και στη συνέχεια η μεγαλύτερη απόδοση που παρατηρήθηκε με 16% FDCA σε 24 h, που αποτελεί ένα μικρό αλλά αξιοσημείωτο ποσό, πραγματοποιήθηκε με τη χρήση του *PciGLOX3* παρουσία της καταλάσης [1,35].

Επιπρόσθετα, στη μελέτη των Qin et al. για τη σύνθεση του DFF από HMF εξετάζονται τέσσερις οξειδάσες συμπεριλαμβανομένων αλκοολικών οξειδάσεων και μιας οξειδάσης της γαλακτόζης από τον *Dactylium dendroides* που χρησιμοποιούν τον αέρα ως οξειδωτικό. Επειδή από τη δράση των οξειδάσεων παράγεται H₂O₂ ως παραπροϊόν, προστίθεται το ένζυμο καταλάση που το μετατρέπει σε νερό και οξυγόνο με το τελευταίο να χρησιμοποιείται και ως υπόστρωμα για τις αλκοολικές οξειδάσες. Σύμφωνα με τα αποτελέσματα της μελέτης η καλύτερη απόδοση σε DFF (92% σε 96 h) επιτυγχάνεται με τη χρήση της οξειδάσης της γαλακτόζης και της καταλάσης, παρουσία επίσης μιας υπεροξειδάσης του χρένου (HRP). Στην ίδια μελέτη για τη σύνθεση του HMFCA από HMF αναφέρεται το ένζυμο οξειδάση της ξανθάνης (XO) από τον *E.coli*, που χρησιμοποιείται για την εκλεκτική οξείδωση της φορμυλομάδας του HMF και επιτυγχάνει απόδοση σε HMFCA 94% σε 7h. Συγκριτικά με την οξείδωση που καταλύονται από λιπάση, οι οξείδωσεις που καταλύονται από την οξειδάση της ξανθάνης χρησιμοποιούν αέρα ως οξειδωτικό αντί του τοξικού H₂O₂, δεν χρησιμοποιούν οργανικούς διαλύτες, έχουν υψηλότερη εκλεκτικότητα και χαμηλότερο χρόνο αντίδρασης χωρίς την παρουσία παραπροϊόντων. Επίσης, για τη σύνθεση του FDCA από HMF μελετώνται 3 λακάσες και ο χημικός καταλύτης 2,2,6,6-τετραμεθυλοπιπεριδίνη 1-οξύλιο (TEMPO) ως mediator. Από τις λακάσες την καλύτερη απόδοση παρουσιάζει αυτή που προέρχεται από τον *Panus conchatus* με 82 % FDCA σε 96 h, ενώ το κύριο ενδιάμεσο DFF φτάνει το 4% και το FDCA 10%. Η χαμηλή αποδοτικότητα οξείδωσης του FDCA σε FDCA πιθανόν οφείλεται στο χαμηλό βαθμό ενυδάτωσης της αλδεϋδης. Τέλος, μελετάται η σύνθεση του FDCA από HMF αρχικά μέσω μιας οξειδάσης της γαλακτόζης που μετατρέπει το HMF σε DFF με απόδοση 75% σε 48h και στη συνέχεια για την οξείδωση του DFF μέσω της δράσης μιας ακινητοποιημένης λιπάσης Β από τον *Candida antarctica* (CAL-B) που επιτυγχάνει απόδοση 88 % μετά από 24 h [33].

Επιπλέον, όπως έχει μελετηθεί από τους McKenna et al. οι in vitro αλυσιδωτές αντιδράσεις που χρησιμοποιούν δύο απομονωμένες οξειδάσες, την οξειδάση της γαλακτόζης M₃₋₅ και την αφυδρογονάση της ξανθίνης (XDH) παράγουν αρωματικά καρβοξυλικά οξέα που προέρχονται από βενζυλικές αλκοόλες μέσω της ενδιάμεσης αλδεϋδης. Αυτή η μεθοδολογία θεωρήθηκε ότι μπορεί να υιοθετηθεί για τη σύνθεση του FDCA από HMF. Έτσι, γίνεται χρήση της οξειδάσης της γαλακτόζης M₃₋₅ σε συνδυασμό με την κατάλληλη οξειδοοδουκτάση της ξανθίνης (XOR) για διαδοχικές οξείδωσεις ιδανικά σε ένα στάδιο. Παραλλαγές της οξειδάσης της γαλακτόζης από τον *Fusarium graminearum* όπως π.χ. η GOase M₃₋₅,

μπορούν να επιδείξουν μια αξιοσημείωτη ικανότητα να οξειδώνουν πρωτοταγείς και δευτεροταγείς βενζυλικές αλκοόλες με το H_2O_2 ως μοναδικό παραπροϊόν. Το HMF αποτελεί ένα καλό υπόστρωμα για την GOase M_{3-5} που παράγει μια διαλδεΐδη, που οξειδώνεται από την XOR σε FFCA, το οποίο επίσης οξειδώνεται από την XOR για να παραχθεί τελικά το FDCA. Μετά από μελέτες σε διάφορα ένζυμα XOR που εξαρτώνται από το μολυβδαίνιο από τη μία αποδείχθηκε η δραστικότητά τους απέναντι και στα τρία υποστρώματα HMF, DFF και FFCA, αλλά από την άλλη παρατηρήθηκε πολύ χαμηλή αντιδραστικότητα με το οξυγόνο του αέρα, με αποτέλεσμα να παρουσιάζεται η ανάγκη για έναν εξωγενή δέκτη ηλεκτρονίων όπως ο DCPIP για υψηλές μετατροπές. Έτσι, η έρευνα στράφηκε προς μια περιπλοασματική αλδεϋδική οξειδάση του *E.coli* (PaoABC), η οποία χρησιμοποιεί οξυγόνο ως τελικό δέκτη ηλεκτρονίων. Η PaoABC είναι ένα ετεροτριμερικό (eterotrimeric) ένζυμο (135 kDa) να περιέχει έναν μεγάλο συμπαραγοντα μολυβδαινίου με την υπομονάδα PaoC (78,1 kDa), έναν μεσαιού μεγέθους FAD με την υπομονάδα PaoB (33,9 kDa) και την μικρή υπομονάδα PaoA (21,0 kDa) που περιλαμβάνει [2Fe – 2S]. Μια ποικιλία ενζύμων έχουν εξελιχθεί να μεταβολίζουν τις αλδεΐδες σε λιγότερο αντιδραστικά ενδιάμεσα και η PaoABC θεωρείται ότι παίζει ρόλο στην αποτοξίνωση των αρωματικών αλδεϋδών, μετατρέποντας τις τοξικές αλδεΐδες σε μη τοξικά ενδιάμεσα. Η οξειδάση PaoABC είναι σε θέση να οξειδώσει και τα τρία υποστρώματα: HMF, DFF και FFCA και συνεπώς αποτελεί έναν υποψήφιο βιοκαταλύτη για το στάδιο της αλδεϋδικής οξείδωσης. Ακόμα, συγκριτικά με άλλες οξειδάσες, όπως η HMF οξειδάση και οι AAO για τις οποίες η ένυδρη μορφή του FFCA είναι το καταλυτικά ενεργό υπόστρωμα, με τη χρήση της PaoABC δεν χρειάζεται η αλδεΐδη να βρίσκεται στην gem-diol μορφή της προκειμένου να πραγματοποιηθεί η οξείδωση, οπότε το ένζυμο αυτό μπορεί να καταλύει τη διπλή οξείδωση του DFF σε FDCA. Τόσο η GOase M_{3-5} όσο και η οξειδάση PaoABC λειτουργούν παρουσία οξυγόνου και αμφότερα παράγουν H_2O_2 ως παραπροϊόν, το οποίο μπορεί να μετατρέψει σε O_2 και νερό παρουσία μιας καταλάσης, με αποτέλεσμα να παρέχονται και επιπλέον μόρια του O_2 για την αντίδραση, προστατεύοντας ταυτόχρονα τα ένζυμα από οξειδωτική βλάβη. Με βάση πειραματικές μελέτες για τη δράση των GOase M_{3-5} και PaoABC με αρχικό υπόστρωμα το HMF παρατηρήθηκε ότι η ενδιάμεση ένωση HMFCΑ που προκύπτει από την οξείδωση του HMF από την PaoABC δεν αποτελεί καλό υπόστρωμα για την GOase M_{3-5} για να πραγματοποιήσει περαιτέρω οξείδωση σε FFCA. Έτσι, προκειμένου να αποφευχθεί η παραγωγή του ενδιάμεσου HMFCΑ και η οξείδωση του HMF να πραγματοποιείται μόνο προς την κατεύθυνση του DFF, προτάθηκε η σταδιακή προσθήκη των δύο αυτών ενζύμων, με αρχική προσθήκη της GOase M_{3-5} και καταλάσης και με μετέπειτα προσθήκη της PaoABC και επιπλέον ποσότητας καταλάσης, η οποία πιθανόν να απενεργοποιήθηκε κατά το πέρας της πρώτης οξείδωσης εξαιτίας της εκτεταμένης χρονικής της διάρκειας. Τα αποτελέσματα που προέκυψαν έδειξαν ότι τα ένζυμα αυτά χωρίς να απαιτείται η προσθήκη διάχυτων συμπαραγόντων επιφέρουν υψηλή μετατροπή (74%) σε θερμοκρασία περιβάλλοντος και σε σχεδόν ουδέτερο pH με υψηλότερη συγκέντρωση υποστρώματος HMF 100 mM. Μεταγενέστερες μελέτες πρότειναν την προσθήκη ενός ακόμα ενζύμου, της υπεροξειδάσης του χρένου (HRP) στο σύστημα των HMF-GO-PaoABC-καταλάσης, που επιτυγχάνει την αύξηση του ρυθμού οξείδωσης του HMF ευνοώντας την οξείδωση του σε DFF το οποίο αποτελεί ένα εξαιρετικό υπόστρωμα για την GO και έτσι περιορίζεται ο σχηματισμός του HMFCΑ. Ακόμα, προκειμένου να μειωθεί η παραγωγή του HMFCΑ, οι ερευνητές μείωσαν την ποσότητα του απαραίτητου PaoABC καθώς αυτό προάγει την οξείδωση του HMF σε HMFCΑ. Χρησιμοποιώντας αυτή τη διαδικασία σε μια one pot αντίδραση, η απόδοση του FDCA βελτιώθηκε και έφτασε το 100% σε 6 ώρες αντίδρασης στους 37°C με την ίδια συγκέντρωση υποστρώματος. Η συγκεκριμένη μέθοδος είναι μέχρι στιγμής η πιο αποτελεσματική με μια εξαιρετική απόδοση, αλλά μετατρέπει μόνο μικρές ποσότητες HMF, γι' αυτό χρειάζονται περαιτέρω μελέτες για τη μετατροπή περισσότερων των 100mM HMF σε FFCA [24,25,27].



Σχήμα 17: Οι οξειδωτικές αντιδράσεις του HMF προς FDCA με συνδυασμένη χρήση GO, PaoABC και HRP (a) και η τροποποίηση του (b) [25].

Τέλος, αναφέρονται από τους Rajesh et al. τα συνδυασμένα σταυρωτά συνδεδεμένα συσσωματώματα ενζύμων (combi-CLEAS) που είναι πολυλειτουργικοί βιοκαταλύτες και χρησιμοποιούνται για τη διαμόρφωση της ακινητοποίησης δύο ή περισσότερων ενζύμων. Επίσης, τα combi-CLEAS εφαρμόζονται ως ευέλικτα ακινητοποιημένα συστήματα χωρίς φορείς, οπότε μπορούν να χρησιμοποιηθούν για τη συγχώνευση πολλαπλών σταδίων ενζυμικών αντιδράσεων ή για μη ενζυμικές αλυσιδωτές αντιδράσεις βιομετατροπών του HMF σε μία αντίδραση ενός σταδίου. Η PaoABC ακινητοποιείται σε PaoABC-Gel και η καταλάση παγιδεύεται στο CLEA με το CAT-CLEA και PaoABC-Gel να ενώνονται για να σχηματίσουν το σύμπλεγμα PaoABC-Gel/CAT-CLEA που είναι ικανό να ανεχτεί υψηλότερη συγκέντρωση υποστρώματος (DFF) έως και 200 mM και μπορεί να ανακυκλωθεί 14 φορές χωρίς απώλεια απόδοσης σε προϊόν (FDCA) [27].

3. Πειραματικό μέρος

3.1 Υλικά

3.1.1 Εμπορικά ένζυμα

Για την υδρόλυση της κυτταρίνης χρησιμοποιείται το ενζυμικό παρασκεύασμα Cellic CTec2 (Novozymes, Δανία) που περιέχει κυτταρινάσες από τον μικροοργανισμό *Trichoderma reesei*, ημικυτταρινάσες και λυτικές μονοοξυγενάσες των πολυσακχαριτών (LPMOs). Οι βέλτιστες συνθήκες θερμοκρασίας για τη λειτουργία του είναι 45-50°C και το βέλτιστο pH είναι 5.0-5.5. Αποθηκεύεται σε χαμηλές θερμοκρασίες προκειμένου να διατηρήσει την ενεργότητα του, η οποία προσδιορίστηκε ότι είναι 168 FPU/mL και το περιεχόμενο σε πρωτεΐνη υπολογίστηκε με τη μέθοδο Bradford 137 mg/ mL.

Για την ισομερείωση της γλυκόζης σε φρουκτόζη χρησιμοποιείται η ακινητοποιημένη ισομεράση της γλυκόζης Sweetzyme (Novozymes, Δανία) που προέρχεται από τον *Streptomyces murinus*. Η βέλτιστη θερμοκρασία για τη λειτουργία της είναι 50°C και το βέλτιστο pH κυμαίνεται μεταξύ 7-7.8. Αποθηκεύεται και αυτή σε χαμηλές θερμοκρασίες για να διατηρεί την ενεργότητά της.

3.1.2 Ρυθμιστικά διαλύματα

Για τις υδρολύσεις των λιγνινοκυτταρινούχων υλικών χρησιμοποιείται ρυθμιστικό διάλυμα φωσφορικών-κιτρικών με pH 5. Αρχικά, παρασκευάζεται διάλυμα όξινου φωσφορικού νατρίου (sodium phosphate dibasic) Na_2HPO_4 , όπου για συγκέντρωση διαλύματος 0.2 M και $M_{\text{r}_{\text{όξινου φωσφορικού νατρίου}}} = 141.96$ g/mol υπολογίζεται ότι στα 200 mL απιονισμένου νερού πρέπει να διαλυθούν 5.67 g όξινου φωσφορικού νατρίου. Επίσης, παρασκευάζεται διάλυμα ένυδρου κιτρικού οξέος (citric acid monohydrate) $\text{C}_6\text{H}_8\text{O}_7 \cdot \text{H}_2\text{O}$, όπου για συγκέντρωση 0.1 M και $M_{\text{κιτρικού οξέος}} = 210.14$ g/mol υπολογίζεται ότι στα 250 mL απιονισμένου νερού πρέπει να διαλυθούν 5.25 g κιτρικού οξέος ή διαφορετικά παρασκευάζεται διάλυμα άνυδρου κιτρικού οξέος (citric acid anhydrous) $\text{C}_6\text{H}_8\text{O}_7$, όπου για συγκέντρωση διαλύματος 0.1 M και $M_{\text{κιτρικού οξέος}} = 192.13$ g/mol υπολογίζεται ότι στα 250 mL απιονισμένου νερού πρέπει να διαλυθούν 4.80 g κιτρικού οξέος. Στη συνέχεια πραγματοποιείται ανάμιξη των 2 διαλυμάτων έως ότου το pH του προκύπτοντος ρυθμιστικού διαλύματος λάβει την τιμή 5, που αποτελεί τη βέλτιστη τιμή pH για το ένζυμο. Σε 200 mL αυτού του διαλύματος προστίθενται 0.04 g αζιδίου του νατρίου (sodium azide) (0.02-0.03 % w/v) που αποτελεί μια ένωση ιδιαίτερα τοξική για μικροοργανισμούς, ώστε να αποτραπούν τυχόν μολύνσεις.

3.1.3 Θρεπτικά μέσα

Για την παρασκευή 1 L από το θρεπτικό μέσο Luria-Bertani (LB) απαιτούνται 10 g τρυπτόνη (tryptone), 5 g yeast extract, 10 g NaCl (ή 5 g NaCl για χαμηλής αλατότητας θρεπτικό μέσο LB) τα οποία αναδεύονται και το pH του προκύπτοντος διαλύματος εξισορροπείται με την προσθήκη πυκνού NaOH και HCl ώστε να λαμβάνει την τιμή 7.4.

3.1.4 Χημικά αντιδραστήρια

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

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

3.1.5 Συσκευές και όργανα

Παρακάτω αναφέρονται οι συσκευές και τα όργανα που χρησιμοποιούνται για την επίτευξη των πειραμάτων:

1. Ηλεκτρονικοί ζυγοί ακριβείας Bell Engineering (Ιταλία), KernABS (Γερμανία)
2. Φωτόμετρο Microplate reader (Spectramax 250, Molecular devices)
3. Συσκευή διήθησης υπό κενό
4. Συσκευή εξάχνωσης υπό κενό (freeze drying) ChristALPHA 1-4, B. BraunBiotec. International, Melsugen (Γερμανία)
5. Φούρνος-πυριαντήριο Muffle Furnace, Size 1, Gallenkamp (Γερμανία)
6. Φυγόκεντρος Beckman Coulter (Η.Π.Α)
7. Μικροφυγόκεντρος πάγκου Eppendorf 3200 (Γερμανία)
8. Επωαστήρας ZHWY-211C, Zhicheng (Κίνα)
9. Επωαστήρας Orbital Incubator S150, Stuart Scientific (Μ. Βρετανία)
10. Θερμαινόμενος επωαστήρας με ανάδευση Eppendorf Thermomixer Comfort, Eppendorf (Γερμανία)
11. Σύστημα παραγωγής υπερκαθαρού νερού DirectQ, Millipore (Η.Π.Α)
12. Αντιδραστήρας μικροκυμάτων Anton Paar Monowave™ 300 (Αυστρία)

3.2 Μέθοδοι

3.2.1 Ήπια οξειδωτική προκατεργασία λιγνινοκυτταρινούχων υλικών με χρήση οργανικών διαλυτών

Η ήπια οξειδωτική προκατεργασία της λιγνινοκυτταρινούχου βιομάζας με τη χρήση οργανικών διαλυτών (oxiorganosolv pretreatment) αποτελεί μια αποτελεσματική μέθοδο απολιγνινοποίησης που δίνει ένα στερεό κλάσμα υψηλής περιεκτικότητας σε κυτταρίνη (υψηλότερη από 85%) και χαμηλής περιεκτικότητας σε λιγνίνη (χαμηλότερη από 2%), το οποίο μπορεί να χρησιμοποιηθεί για την παραγωγή παραγώγων του φουρανίου. Η απομάκρυνση της λιγνίνης είναι ιδιαίτερα σημαντική καθώς με αυτόν τον τρόπο εξαλείφονται τα φαινόμενα της προσρόφησης των ενζύμων στο υπόστρωμα κατά την υδρόλυση και της παρεμπόδισης της αφυδάτωσης των σακχάρων από τις φαινολικές ενώσεις, που μειώνουν τη συνολική απόδοση της διεργασίας.

Έτσι, μέσω αυτής της προκατεργασίας κατεργάζονται διάφορα υλικά λιγνινοκυτταρινούχου βιομάζας υπό διαφορετικές συνθήκες όπως χρήση διαφορετικών οργανικών διαλυτών ή καταλυτών, διαφορετικό χρόνο αντίδρασης και διαφορετική θερμοκρασία σε υδατικά διαλύματα με συγκεκριμένη αναλογία οργανικού διαλύτη/νερού. Συγκεκριμένα, αφού τα υλικά προετοιμαστούν κατάλληλα με την προσθήκη του οργανικού διαλύτη, η διαδικασία ξεκινάει με 100% τροφοδότηση πίεσης O₂ στο αυτόκλειστο δοχείο και θέρμανση μέχρι την εκάστοτε θερμοκρασία προκατεργασίας. Ο πολτός διηθείται υπό κενό και παραλαμβάνεται το στερεό μέρος, το οποίο ξεπλένεται με οργανικό διαλύτη και απιονισμένο νερό, προκειμένου να απομακρυνθούν παραπροϊόντα της προκατεργασίας, που είναι δυνατόν να μειώσουν την ενεργότητα των ενζύμων και τελικά ξηραίνεται. Η ανάλυση της σύστασης της προκατεργασμένης βιομάζας γίνεται σύμφωνα με τα πρωτόκολλα NREL.

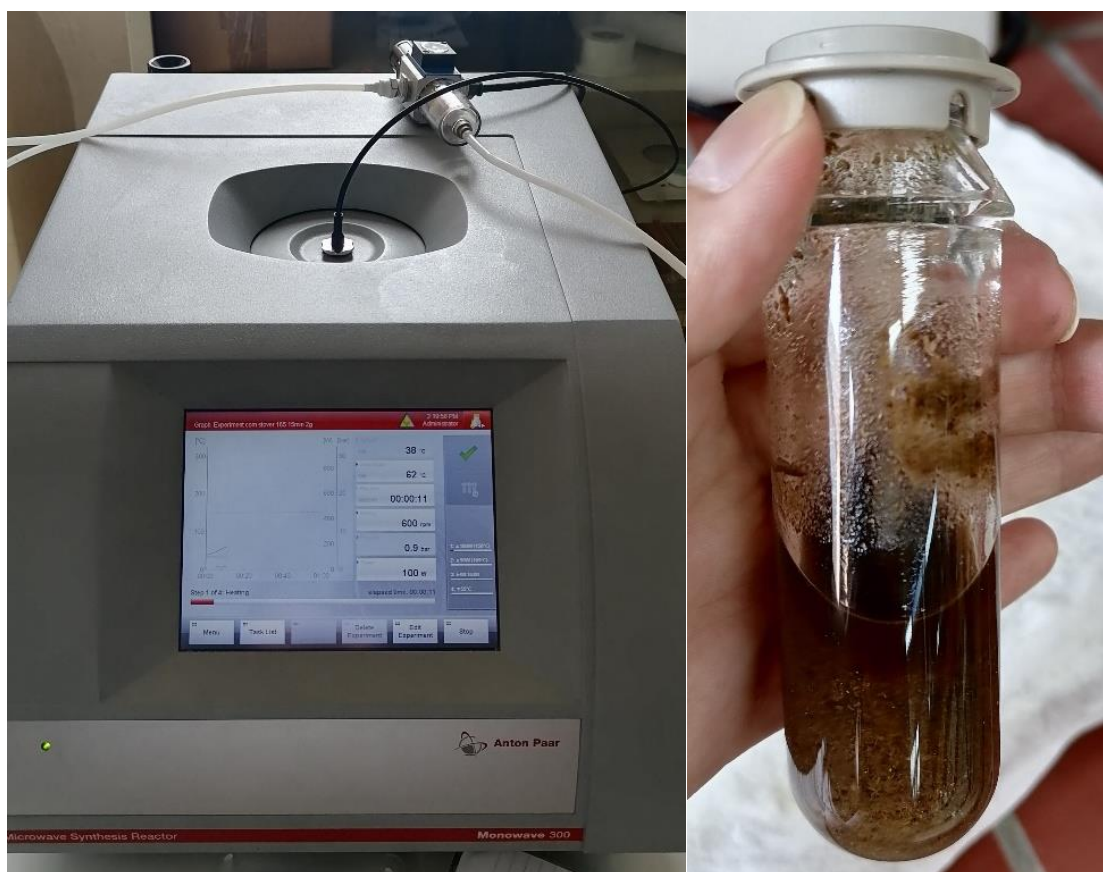
3.2.2 Προκατεργασία λιγνινοκυτταρινούχων υλικών με τη χρήση μικροκυμάτων και οργανικών διαλυτών

Εξετάζεται επίσης η προκατεργασία στελεχών αραβοσίτου (corn stover) με τη χρήση μικροκυμάτων παρουσία οργανικών διαλυτών. Ειδικότερα, τοποθετούνται σε ειδικό φιαλίδιο (vial) 2 g υλικού και 13 mL οργανικού διαλύτη, δεδομένων των προδιαγραφών του μηχανήματος. Ο οργανικός διαλύτης που μελετάται είναι η αιθανόλη, αν και αρχικά δοκιμάστηκε και η χρήση νερού αντί οργανικού διαλύτη. Για την προκατεργασία με μικροκύματα χρησιμοποιείται ο αντιδραστήρας μικροκυμάτων Anton Paar Monowave™ 300 που έχει υψηλά όρια θερμοκρασίας και πίεσης και χρησιμοποιείται για μικρής κλίμακας εφαρμογές, ενώ ο έλεγχος των παραμέτρων της αντίδρασης είναι περισσότερο απλοποιημένος με τη βοήθεια λογισμικού. Το όριο της θερμοκρασίας είναι οι 300°C και προσφέρεται ταυτόχρονη μέτρηση της θερμοκρασίας μέσω ανιχνευτών IR και οπτικών ινών, με τους τελευταίους να περιλαμβάνουν έναν κρύσταλλο Ruby, εξασφαλίζοντας την ακριβή ρύθμιση της αντίδρασης και την ασφάλεια της μεθόδου. Επίσης, το όριο της πίεσης είναι τα 30 bar και η ίδια μετρείται άμεσα και με ακριβή τρόπο μέσω ενός μη επεμβατικού υδραυλικού συστήματος ενσωματωμένου στο περιστρεφόμενο κάλυμμα. Τέλος, διαθέτει ένα ισχυρό μάγνητρο που παρέχει έως 850 W και δημιουργεί ένα ιδιαίτερα υψηλής πυκνότητας πεδίο που διασφαλίζει αναπαραγωγίσιμους και υψηλούς ρυθμούς

θέρμανσης, άρα γρήγορη και αποδοτική θέρμανση οδηγώντας σε σημαντικά μειωμένους χρόνους αντίδρασης και αύξηση των αποδόσεων.

Η προκατεργασία εντός του μηχανήματος λαμβάνει χώρα σε τουλάχιστον τρία στάδια όπου στο πρώτο η θερμοκρασία του μίγματος ανεβαίνει έως ότου φτάσει την επιθυμητή μέσω καθορισμένης τιμής ισχύος, στο δεύτερο η θερμοκρασία διατηρείται σταθερή στην επιθυμητή τελική τιμή της μέσω καθορισμένης τιμής ισχύος και χρόνου παραμονής και στο τελευταίο το μίγμα ψύχεται μέχρι μια ορισμένη θερμοκρασία με τη χρήση αερίου αζώτου.

Δεδομένου ότι οι μόνες παράμετροι που μπορούν να οριστούν και να τροποποιηθούν είναι η θερμοκρασία και ο χρόνος παραμονής, μελετάται η προκατεργασία του υλικού υπό διαφορετικές τιμές θερμοκρασίας και χρόνου, ρυθμίζοντας κατάλληλα και τις τιμές της ισχύος.



Εικόνα 1: Αριστερά, ο αντιδραστήρας μικροκυμάτων Anton Paar Monowave™ 300 και δεξιά, το ειδικό vial που τοποθετείται το λιγνινοκυτταρινούχο υλικό και ο οργανικός διαλύτης.

Στο τέλος, ο πολτός διηθείται υπό κενό και παραλαμβάνεται το στερεό μέρος, το οποίο ξεπλένεται με οργανικό διαλύτη και απιονισμένο νερό και ξηραίνεται.



Εικόνα 2: Αριστερά, η διάταξη διήθησης υπό κενό και δεξιά, το στερεό κλάσμα του προκατεργασμένου υλικού μετά τη διήθηση.

3.2.3 Ενζυμική υδρόλυση προκατεργασμένων λιγνινοκυτταρινούχων υλικών

Σε κωνικές φιάλες των 50 mL τοποθετείται 1 g από κάθε δείγμα λιγνινοκυτταρινούχου βιομάζας σε τελικό όγκο 10 mL, έτσι ώστε η συγκέντρωση των στερεών στο διάλυμα να είναι 10% (w/v).

Σχετικά με την παρασκευή του διαλύματος στο οποίο πραγματοποιείται η υδρόλυση των δειγμάτων, αρχικά υπολογίζεται ο όγκος του ρυθμιστικού διαλύματος που απαιτείται ανάλογα με τον αριθμό των δειγμάτων που χρειάζεται να υδρολυθούν κάθε φορά και στη συνέχεια η ποσότητα (mg) ενζύμου, δεδομένου ότι χρειάζονται 15 mg ενζύμου για 1 g ξηρής μάζας, άρα και για 9 mL διαλύματος. Είναι γνωστό ότι η συγκέντρωση του ενζυμικού κοκτέιλ Cellic CTec 2 είναι 137 mg/mL και έτσι υπολογίζεται ο όγκος (mL) του ενζυμικού παρασκευάσματος που απαιτείται να προστεθεί στο ρυθμιστικό διάλυμα.

Ο όγκος αυτός μπορεί να υπολογιστεί απευθείας και από τον παρακάτω τύπο:

$$V_{cellic\ needed} (mL) = \frac{C_{enzyme} \left(\frac{mg}{g_{DM}} \right) \cdot m_{DM}(g_{DM}) \cdot V_{solution} (mL)}{C_{cellic} \left(\frac{mg}{mL} \right) \cdot V_{added\ to\ each\ flask} (mL)}$$

Εξίσωση 1: Υπολογισμός απαιτούμενου όγκου από το ενζυμικό παρασκεύασμα Cellic CTec 2 για διαφορετικό όγκο ρυθμιστικού διαλύματος.

Η χρήση 10% (w/v) ποσότητας στερεών και 15 mg ενζύμου ανά g στερεών αποτελούν βέλτιστες συνθήκες σακχαροποίησης που έχουν καθοριστεί από προηγούμενες δοκιμές σε καθαρή κυτταρίνη.



Εικόνα 3: Από πάνω προς τα κάτω, το στερεό λιγνινοκυτταρινούχο υλικό στις κωνικές φιάλες, το ομογενοποιημένο μίγμα στερεού λιγνινοκυτταρινούχου υλικού και ενζυμικού διαλύματος πριν την υδρόλυση και το υδρόλυμα που προκύπτει μετά τη δράση του Cellic CTec 2.

Αφού φορτωθούν στις κωνικές φιάλες τα στερεά λιγνινοκυτταρινούχα υλικά και το ενζυμικό διάλυμα, πραγματοποιείται ανάδευση με την σπαθίδα και στη συνέχεια όλες οι κωνικές φιάλες τοποθετούνται στον επωαστήρα στους 50°C, με ανάδευση 180 rpm και λαμβάνονται δείγματα μετά από 2,4,6,8,24,48 και 72 h, ώστε να παρακολουθείται η πορεία της υδρόλυσης για το χρονικό διάστημα των 3 ημερών που διαρκεί.



Εικόνα 4: Επωαστήρας για την υδρόλυση των λιγνινοκυτταρινούχων υλικών.

Η ποσότητα του δείγματος που λαμβάνεται ανά χρονικά διαστήματα από κάθε κωνική φιάλη είναι 300 μL , τα οποία τοποθετούνται σε Eppendorf και φυγοκεντρώνονται για 2.5 min. Στη συνέχεια, υπολογίζεται την αντίστοιχη χρονική στιγμή η συγκέντρωση των αναγωγικών σακχάρων που περιέχει κάθε δείγμα μέσω της μεθόδου DNS και η συγκέντρωση της γλυκόζης μέσω της μεθόδου Glucotest. Πριν πραγματοποιηθούν αυτές οι μετρήσεις, είναι απαραίτητο κάθε δείγμα να αραιωθεί κατάλληλα ώστε οι συγκεντρώσεις αυτές να βρίσκονται στο γραμμικό κομμάτι της καμπύλης αναφοράς της κάθε μεθόδου.

3.2.4 Ενζυμική ισομερείωση γλυκόζης προς παραγωγή φρουκτόζης

Μετά την ολοκλήρωση της επώασης των δειγμάτων μεταφέρεται όλο το υδρόλυμα των κωνικών φιάλων σε αντίστοιχα φάλκον, τα οποία φυγοκεντρώνονται για 10 min στις μέγιστες στροφές. Το υπερκείμενο διάλυμα κάθε φάλκον μεταφέρεται σε νέο φάλκον, όπου μετριέται ο όγκος του και δεδομένης της συγκέντρωσης (g/L) της γλυκόζης που υπολογίστηκε με τη μέθοδο Glucotest στις 72 h, υπολογίζεται η μάζα της γλυκόζης που περιέχεται σε κάθε φάλκον. Ανάλογα με την ποσότητα αυτή σε κάθε φάλκον προστίθεται σε αναλογία 50 % τετραβορικό νάτριο ($\text{Na}_2\text{B}_4\text{O}_7 \cdot 10 \text{H}_2\text{O}$) και το διάλυμα αναδεύεται. Εάν χρειαστεί προστίθεται πυκνό διάλυμα NaOH, προκειμένου το pH του διαλύματος να λάβει την τιμή 7. Ο όγκος του NaOH που προστίθεται είναι πολύ μικρός και δεν επηρεάζει τη συγκέντρωση της γλυκόζης.

Η βέλτιστη συγκέντρωση τετραβορικού νατρίου που οδηγεί σε αυξημένα ποσοστά ισομερείωσης προσδιορίστηκε από προηγούμενες μελέτες, όπου χρησιμοποιήθηκε ποσότητα 5% w/v ισομεράσης της

γλυκόζης και καθαρή γλυκόζη ως αρχικό υπόστρωμα συγκέντρωσης 60 g/L στους 50°C σε κιτρικό - φωσφορικό ρυθμιστικό διάλυμα με pH 5 που ρυθμίστηκε στο 7 με προσθήκη NaOH 1 M. Οι μοριακές αναλογίες τετραβορικού νατρίου προς γλυκόζη που δοκιμάστηκαν βρίσκονταν εντός του εύρους 0.05-0.5.

Στη συνέχεια, τοποθετείται 1 mL από το παραπάνω διάλυμα σε αντίστοιχο Eppendorf μαζί με 50 mg ακινητοποιημένης ισομέρασης Sweetzyme. Τέλος, τα Eppendorf τοποθετούνται στο Thermomixer στους 50 °C για 1 μέρα και έπειτα υπολογίζεται σε καθένα η συγκέντρωση της γλυκόζης με τη μέθοδο Glucotest, αφού πραγματοποιηθεί η κατάλληλη αραιώση. Από τη διαφορά των συγκεντρώσεων της γλυκόζης πριν και μετά την ισομερείωση, υπολογίζεται η συγκέντρωση της φρουκτόζης.



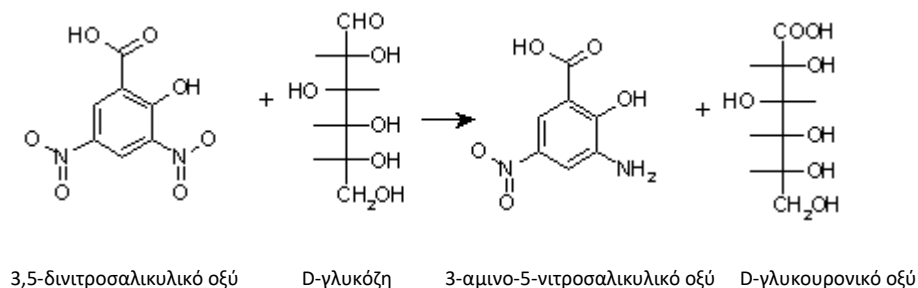
Εικόνα 5: Αριστερά, το Eppendorf με την ακινητοποιημένη ισομεράση Sweetzyme και το διάλυμα που περιέχει γλυκόζη που παράχθηκε από την υδρόλυση και δεξιά, ο θερμαινόμενος επωαστήρας με ανάδευση Thermomixer.

3.2.5 Μέτρηση συγκέντρωσης αναγωγικών σακχάρων και γλυκόζης

Για την εξαγωγή αποτελεσμάτων από την υδρόλυση και ισομερείωση των προκατεργασμένων δειγμάτων λιγνινοκυτταρινούχου βιομάζας που μελετώνται χρησιμοποιούνται η μέθοδος του 3,5-δινιτροσαλικυλικού οξέος (DNS) και η μέθοδος Glucotest, ώστε να μετρηθεί η συγκέντρωση των αναγωγικών σακχάρων και της γλυκόζης, αντίστοιχα.

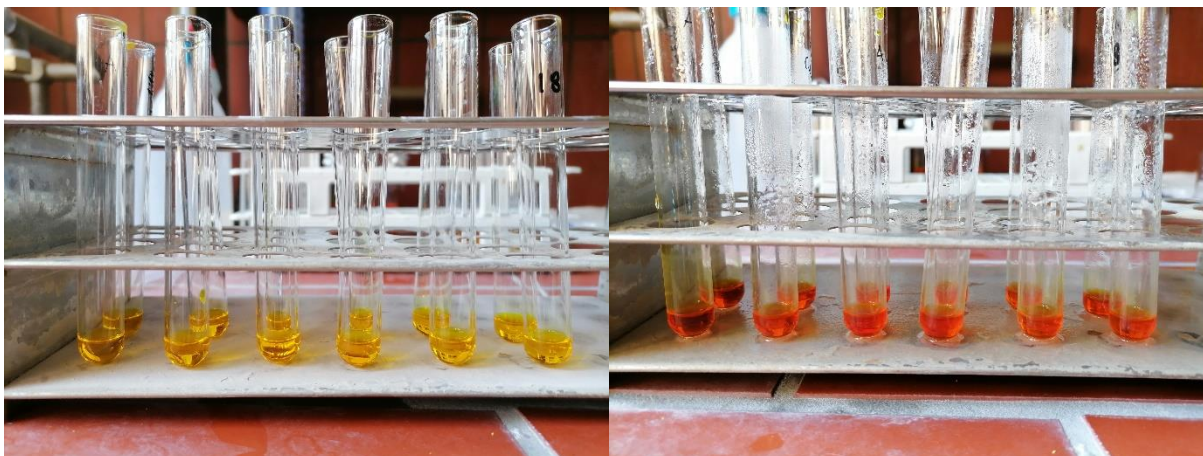
Μέτρηση συγκέντρωσης αναγωγικών σακχάρων με τη μέθοδο DNS

Η συγκέντρωση των αναγωγικών σακχάρων, όπως η γλυκόζη, η ξυλόζη κ.α. μπορεί να μετρηθεί με τη φωτομετρική μέθοδο του 3,5-δινιτροσαλικυλικού οξέος (DNS). Ένα αναγωγικό σάκχαρο έχει ελεύθερο το ημιακεταλικό υδροξύλιο, το οποίο σχηματίζει σύμπλοκο με το 3,5-δινιτροσαλικυλικό οξύ κατά τη θέρμανση σε θερμοκρασία πάνω από τους 70°C. Το 3,5-δινιτροσαλικυλικό οξύ έχει κίτρινο χρώμα, ενώ το σύμπλοκο παρουσιάζει χρώμα καστανέρυθρο και εμφανίζει μέγιστο απορρόφησης στα 540 nm.



Σχήμα 18: Η αντίδραση της γλυκόζης με το 3,5-δινιτροσαλικυλικό οξύ.

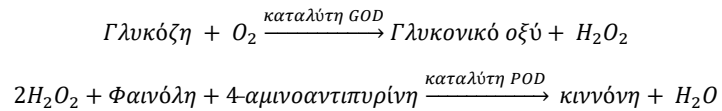
Συγκεκριμένα, λαμβάνονται 250 μL δείγματος και 250 μL από το διάλυμα DNS, τα οποία τοποθετούνται σε δοκιμαστικό σωλήνα. Στη συνέχεια, οι δοκιμαστικοί σωλήνες τοποθετούνται σε υδατόλουτρο υπό βρασμό (στους 95 °C) για 5 min. Έπειτα, προστίθενται 2 mL απιονισμένου νερού σε κάθε δοκιμαστικό σωλήνα, προκειμένου να τερματιστεί η αντίδραση. Από κάθε διάλυμα τοποθετούνται 250 μL σε κατάλληλη θέση στην πλακέτα και ακολουθεί φωτομέτρηση στα 540 nm στο φωτόμετρο Microplate reader. Για κάθε δείγμα η παραπάνω διαδικασία επαναλαμβάνεται εις διπλούν για μεγαλύτερη αξιοπιστία των αποτελεσμάτων.



Εικόνα 6: Αριστερά, το 3,5-δινιτροσαλικυλικό οξύ έχει αρχικά κίτρινο χρώμα, ενώ δεξιά το σύμπλοκο που σχηματίζεται μετά τον βρασμό παρουσιάζει χρώμα καστανέρυθρο.

Μέτρηση συγκέντρωσης γλυκόζης με τη μέθοδο Glucotest

Η μέτρηση της συγκέντρωσης της γλυκόζης με τη μέθοδο Glucotest γίνεται παρουσία του εμπορικού ενζυμικού σκευάσματος GOD/PAP. Η γλυκόζη οξειδώνεται από την οξειδάση της γλυκόζης (GOD) σε γλυκονικό οξύ και υπεροξείδιο του υδρογόνου (H₂O₂), το οποίο με τη δράση της υπεροξειδάσης (POD) αντιδρά με τη χλωρο-4-φαινόλη και την 4-αμινοαντιπυρίνη (PAP) σχηματίζοντας μια κινόννη με χρώμα ερυθρό. Η απορρόφηση του έγχρωμου αυτού συμπλόκου είναι ανάλογη με τη συγκέντρωση της γλυκόζης στο δείγμα και μετριέται στα 510 nm.



Συγκεκριμένα, τοποθετούνται 10 μL δείγματος και 240 μL GOD/PAP σε κατάλληλη θέση στην πλακέτα. Η πλακέτα τοποθετείται για επώαση στον θάλαμο του φωτομέτρου Microplate reader σε θερμοκρασία 37 $^\circ\text{C}$ για 15 min και η φωτομέτρηση πραγματοποιείται στα 510 nm.

Για την κατασκευή της καμπύλης αναφοράς της μεθόδου DNS και της μεθόδου Glucotest παρασκευάζεται διάλυμα γλυκόζης (1 g γλυκόζης σε 1 L νερού) και με βάση το διάλυμα αυτό πραγματοποιούνται αραιώσεις και παρασκευάζονται διαλύματα γνωστών συγκεντρώσεων 0.2, 0.4, 0.6, 0.8 και 1 w/v, των οποίων μετριέται η απορρόφηση στα αντίστοιχα μήκη κύματος της μεθόδου. Παράλληλα, μετριέται και η απορρόφηση του τυφλού διαλύματος της μεθόδου. Προκειμένου να επιτευχθεί η καλύτερη δυνατή αξιοπιστία κατά την εξαγωγή της καμπύλης αναφοράς, η μέτρηση της απορρόφησης του κάθε διαλύματος γνωστής συγκέντρωσης επαναλαμβάνεται εις τριπλούν.



Εικόνα 7: Πάνω, η ειδική πλακέτα στην οποία φορτώνονται 250 μL από το κάθε διάλυμα και κάτω, το φωτόμετρο Microplate reader στο οποίο τοποθετείται η πλακέτα και μετρώνται οι απορροφήσεις των διαλυμάτων στα εκάστοτε nm.

3.2.6 Χημική αφυδάτωση φρουκτόζης προς παραγωγή 5-υδροξυμεθυλοφουρφουράλης (HMF)

Επίσης, εξετάζεται η διαδικασία παραγωγής 5-υδροξυμεθυλοφουρφουράλης (HMF) μέσω αφυδάτωσης της φρουκτόζης που παράγεται από την ισομερείωση. Για τη συγκεκριμένη μελέτη λαμβάνεται ως λιγνινοκυτταρινούχο υλικό βιομάζα από ξύλο οξιάς που είχε προκατεργαστεί με αιθανόλη στους 175°C για 60 min. Αρχικά, προκειμένου να παραχθεί ένα σιρόπι υψηλής συγκέντρωσης φρουκτόζης από το υλικό αυτό, πραγματοποιείται υδρόλυση μεγαλύτερης κλίμακας μεγέθους σε αναμικτήρα ελευθέρας πτώσης με αυξημένη ποσότητα αρχικών στερεών (25% κ.β) και με ποσότητα ενζύμου 9 mg ανά g στερεών σε 5 mM ρυθμιστικό διάλυμα κιτρικών-φωσφορικών με pH 5 στους 50°C για 6 h. Στη συνέχεια προστίθεται επιπλέον ποσότητα ενζύμου μέχρι τα 18 mg ανά g στερεών και η υδρόλυση πραγματοποιείται σε κωνική φιάλη σε όγκο 800 mL υπό ανάδευση 160 rpm στους 50°C για 12 h. Στο τέλος της υδρόλυσης ο πολτός διηθείται υπό κενό και το πλούσιο σε σάκχαρα υδρολύμα υποβάλλεται σε ισομερείωση με την ισομεράση της γλυκόζης Sweetzyme, όπως περιεγράφηκε παραπάνω, προσθέτοντας την κατάλληλη ποσότητα τετραβορικού νατρίου και ρυθμίζοντας την τιμή του pH στο 7 με την προσθήκη NaOH.

Το πλούσιο σε σάκχαρα υδρολύμα αρχικά διαλύθηκε σε DMSO, ένα πολικό απρωτικό διαλύτη που χρησιμοποιείται για την αφυδάτωση της φρουκτόζης και τη σύνθεση HMF σε αναλογία 1:4 και θερμάνθηκε στους 150°C για 60 min. Παρόλο που η μετατροπή των σακχάρων ήταν σχεδόν πλήρης (99%), τα μόνα προϊόντα που προέκυψαν ήταν οργανικά οξέα (γλυκολικό, μαλεϊκό, φορμικό) και καθόλου HMF ως τελικό προϊόν, με αντίστοιχα αποτελέσματα και στην περίπτωση της χρήσης H₂O. Αυτό όπως διαπιστώθηκε από μετέπειτα μελέτες οφείλεται στην παρουσία του τετραβορικού νατρίου που προστίθεται στο υδρολύμα κατά το στάδιο της ισομερείωσης και ειδικότερα στο τετραβορικό ανιόν και στο βορικό οξύ, που παράγονται από την αλληλεπίδραση με το νερό και ενισχύουν τις αντιδράσεις μετατροπής της γλυκόζης προς τον σχηματισμό παραπροϊόντων (χουμικών ενώσεων, humins). Το υψηλό περιεχόμενο σε βορικές ενώσεις μπορεί να οδηγήσει στον σχηματισμό ενός περίπλοκου δεσμού της φρουκτόζης με δύο βορικά μόρια, που είναι πιο σταθερός συγκριτικά με τον δεσμό με ένα μόριο βορίου και αυτό έχει ως αποτέλεσμα να παρεμποδίζεται η απομάκρυνση του νερού κατά το πρώτο βήμα της μετατροπής σε HMF και να διευκολύνονται αντιδράσεις πολυμερισμού της φρουκτόζης. Με την προσθήκη ισχυρού οξέος (HCl ή H₂SO₄) το τετραβορικό νάτριο διασπάται στο αντίστοιχο άλας νατρίου και σε βορικό οξύ, το οποίο καταλύει τον σχηματισμό HMF, αν και ταυτόχρονα επιτρέπει και την πραγματοποίηση παράπλευρων αντιδράσεων πολυμερισμού. Επίσης, το pH είναι ένας ακόμα σημαντικός παράγοντας για την εκλεκτική σύνθεση του HMF, καθώς σε όξινο pH χαμηλότερο του 2, ευνοείται ο σχηματισμός HMF σε αντίθεση με υψηλότερες τιμές pH που ενισχύεται ο σχηματισμός προϊόντων αποσύνθεσης των σακχάρων (οργανικών οξέων και χουμικών ενώσεων).

Έτσι, για την αφυδάτωση της φρουκτόζης σε HMF εξετάζονται 5 διαφορετικοί καταλύτες: 2 ισχυρά ανόργανα οξέα, το υδροχλωρικό οξύ (HCl) και το φωσφορικό οξύ (H₃PO₄), 2 ασθενή οργανικά οξέα το φορμικό οξύ και το μαλεϊκό οξύ και ο στερεός όξινος καταλύτης H-mordernite. Ειδικότερα το πλούσιο σε σάκχαρα υδρολύμα διαλύεται με νερό σε αναλογία 1:4 προκειμένου να κατασταλούν παράπλευρες αντιδράσεις και ο σχηματισμός παραπροϊόντων και προστίθεται ο αντίστοιχος καταλύτης μέχρι το pH να λάβει την τιμή 1-2 προκειμένου να εξασφαλιστεί ότι θα διασπαστούν οι βορικές ενώσεις. Στη συνέχεια, τοποθετείται στον αναδευόμενο, αυτόκλειστο αντιδραστήρα διαλείποντος έργου (C-276 Parr Inst., ΗΠΑ)

υπό αέριο N₂ στους 150°C για 60 min υπό συνεχή ανάδευση και έπειτα αφήνεται να κρυώσει ελαφρώς ο αντιδραστήρας και το διάλυμα διηθείται προκειμένου να απομακρυνθούν τα στερεά (καταλύτες και παραπροϊόντα) και αναλύεται με Ιοντική Χρωματογραφία (ICS-5000, Dionex, ΗΠΑ).

3.2.7 Παραγωγή οξειδάσης της γαλακτόζης από τον μύκητα *Fusarium oxysporum*

Για την ενζυμική κατάλυση των οξειδωτικών αντιδράσεων της 5-υδροξυμεθυλοφουρφουράλης (HMF) προς τον σχηματισμό σημαντικών δομικών ενώσεων όπως FDCA, DFF, HMFCA και FFCA αναφέρονται διάφορα ένζυμα στη βιβλιογραφία, πολλά από τα οποία αναφέρθηκαν παραπάνω. Στη συγκεκριμένη διπλωματική εργασία επιλέχθηκε να μελετηθεί για την οξειδωτική της δράση στο HMF η οξειδάση της γαλακτόζης από τον μύκητα *Fusarium oxysporum* και απομονώθηκε το γονίδιο που την εκφράζει. Η οξειδάση της γαλακτόζης ανήκει στην οικογένεια AA5 της CAZy βάσης δεδομένων και τυπικά δρα σε γαλακτόζη. Ωστόσο, έχει βρεθεί ότι άλλα ένζυμα μέλη της ίδιας οικογένειας έχουν ενεργότητα στα φουράνια και στα παραγωγά τους και γι' αυτόν τον λόγο επιλέχθηκε να εξεταστεί και αυτό το ένζυμο. Για την παραγωγή του πραγματοποιήθηκε το πρώτο στάδιο του μετασχηματισμού κυττάρων *E.coli* των πλασμιδίων πολλαπλασιασμού και έκφρασης που έφεραν το γονίδιο της οξειδάσης της γαλακτόζης.

Μετασχηματισμός κυττάρων *E.coli* με το πλασμίδιο πολλαπλασιασμού PCR Blunt σε τρυβλία

Για την περίπτωση της ανάπτυξης καλλιεργείων σε τρυβλία στο θρεπτικό μέσο Luria-Bertani (LB) προστίθενται 15 g άγαρ (nutrient agar). Πριν προστεθεί το άγαρ, λαμβάνονται 10 mL από το θρεπτικό τα οποία μοιράζονται σε Eppendorf καθένα από τα οποία περιέχει 1 mL. Τέλος, όλα τα παραπάνω μαζί με τον εξοπλισμό που χρειάζεται για τη συνέχεια οδηγούνται για αποστείρωση στους 121°C για 20 min.

Σε 100 mL κυττάρων *E.coli* προστίθενται 5 mL από το ligation mix (γονίδιο και πλασμίδιο PCR Blunt) και το μείγμα αυτό παραμένει στον πάγο για 30 min. Στη συνέχεια, μεταφέρεται στους 42°C για 1.5 min ώστε τα κύτταρα να υποστούν το λεγόμενο «heat shock» και αμέσως μετά προστίθενται 200 mL θρεπτικού μέσου LB (χωρίς άγαρ) από τα Eppendorfs και το προκύπτον transformation mix επωάζεται για 1 h.

Στα τρυβλία προστίθεται το θρεπτικό υλικό LB (με το άγαρ) μαζί με το αντιβιοτικό καναμυκίνη (50 mL για 100 mL θρεπτικού μέσου) και στη συνέχεια απλώνεται το transformation mix σε διαφορετικές ποσότητες στα τρυβλία και επωάζεται για ένα βράδυ στους 37 °C.

Πολλαπλασιασμός ανασυνδυασμένων κυττάρων *E.coli* σε υγρές καλλιέργειες

Αφού παρασκευαστεί θρεπτικό υλικό LB χωρίς την προσθήκη του άγαρ και προστεθεί το αντιβιοτικό καναμυκίνη (50 mL για 100 mL θρεπτικού μέσου), τοποθετούνται σε φάλκον 5 mL από αυτό. Αποικίες κυττάρων που αναπτύχθηκαν στα τρυβλία τοποθετούνται και αυτές μέσα στο φάλκον και επωάζονται για μια μέρα στους 37°C. Αφού το διάλυμα στα φάλκον θολώσει, γεγονός που φανερώνει την ανάπτυξη κυττάρων, πραγματοποιείται φυγοκέντρηση του περιεχομένου του φάλκον για να καθιζάνουν τα κύτταρα.

Πέψη (digestion) και ηλεκτροφόρηση για το πλασμίδιο PCR Blunt με το γονίδιο

Για την απομόνωση του πλασμιδίου με το γονίδιο από τα κύτταρα *E.coli* ακολουθείται το πρωτόκολλο «Nucleospin Plasmid QuickPure protocol isolation of high-copy plasmid DNA from *E.coli*». Από το δείγμα του απομονωμένου DNA λαμβάνονται 5 mL και τοποθετούνται σε Eppendorf μαζί με 1 mL από το κάθε

ένζυμο περιορισμού (στη συγκεκριμένη περίπτωση χρησιμοποιούνται τα Cla I και Xba I), 2 μL ρυθμιστικού διαλύματος ενζύμων (10x) και 11 μL υπερκάθαρου νερού και στη συνέχεια πραγματοποιείται επώαση στους 37 °C για 1 h στο Thermomixer. Η ίδια διαδικασία ακολουθείται και για το πλασμίδιο φορέα έκφρασης pPICZ(alpha) C, που χρησιμοποιείται στη συγκεκριμένη περίπτωση. Οι αντιδράσεις του digestion μαζί με 2-3 μL loading buffer (χρωστική ουσία κυανού χρώματος) φορτώνονται σε πηκτή αγαρόζης για ηλεκτροφόρηση προκειμένου να αξιολογηθεί εάν το μήκος που αντιστοιχεί στις σχηματιζόμενες μπάντες είναι το αναμενόμενο σε σχέση με το μήκος του πλασμιδίου pPICZ(alpha) C και του γονιδίου. Γι' αυτό τον λόγο φορτώνεται στη πηκτή αγαρόζης και το διάλυμα του ladder και στη συνέχεια εφαρμόζονται 65 V στο τροφοδοτικό. Μετά από 30-45 min η πηκτή μεταφέρεται σε συσκευή UV προκειμένου να εμφανιστούν οι μπάντες και να αξιολογηθούν.

Ολική πέψη (digestion) και double cut του πλασμιδίου pPICZ(alpha) C

Για το ολικό digestion τοποθετούνται σε Eppendorf 7 μL υπερκάθαρου νερού, 3 μL ρυθμιστικού διαλύματος ενζύμων (10x), 15 μL από το zero blunt (PCR blunt και γονίδιο) και 1.5 μL από κάθε περιοριστικό ένζυμο (Cla I και Xba I). Αντίστοιχα, για να κοπεί το πλασμίδιο pPICZ(alpha) C τοποθετούνται σε Eppendorf 7 μL υπερκάθαρου νερού, 3 μL ρυθμιστικού διαλύματος ενζύμων (10x), 14 μL από το πλασμίδιο και 2 μL από το κάθε περιοριστικό ένζυμο (Cla I και Xba I). Στη συνέχεια, τα Eppendorf αυτά τοποθετούνται στο Thermomixer στους 37°C για 90 min. Μετά το πέρας των 90 min προστίθεται στις αντιδράσεις επιπλέον ποσότητα από τα περιοριστικά ένζυμα (Cla I και Xba I) και συγκεκριμένα 0.5 μL από το καθένα, διαδικασία που επαναλαμβάνεται ανά 1 h για 4 h συνολικά. Για την περίπτωση του πλασμιδίου pPICZ(alpha) C τα περιοριστικά ένζυμα βρίσκονται σε περίσσεια συγκριτικά με το πλασμίδιο για να μην υπάρχουν «no cuts» ή «single cuts».

Στη συνέχεια, πραγματοποιείται ηλεκτροφόρηση σε πηκτή αγαρόζης και για τις δύο αντιδράσεις και απομονώνονται τα σημεία της πηκτής που αντιστοιχούν στο γονίδιο και στο πλασμίδιο, τα οποία τοποθετούνται σε προζυγισμένα Eppendorf. Αφού υπολογιστεί το καθαρό βάρος του απομονωμένου κομματιού του gel, ακολουθείται το πρωτόκολλο «DNA extraction from agarose gels», προκειμένου να ληφθεί το καθαρό DNA του γονιδίου και του πλασμιδίου για να πραγματοποιηθεί το ligation.

Προκειμένου να ληφθεί υψηλότερη συγκέντρωση από το πλασμίδιο και το γονίδιο το τελευταίο βήμα του πρωτοκόλλου «DNA extraction from agarose gels» που περιλαμβάνει το ξέπλυμα της στήλης με το αντίστοιχο buffer της μεθόδου διαφοροποιείται και γίνεται με τη χρήση υπερκάθαρου νερού, ώστε να πραγματοποιηθεί η μέθοδος της λυοφιλίωσης (freeze-drying). Με αυτόν τον τρόπο αφού συλλεχθεί όλο το καθαρό DNA από το γονίδιο και το πλασμίδιο, αυτά τοποθετούνται αντίστοιχα σε δύο διαφορετικά Eppendorf, καταψύχονται και οδηγούνται στον freeze-dryer. Εκεί υφίστανται ξήρανση υπό κατάψυξη, κατά την οποία ο πάγος απομακρύνεται μέσω εξάχνωσης εξαιτίας των χαμηλών θερμοκρασιών και πιέσεων.

Ligation

Αφού ληφθεί το συμπυκνωμένο καθαρό DNA του πλασμιδίου pPICZ(alpha) C και του γονιδίου, ακολουθεί η διαδικασία του ligation, όπου το κατάλληλα κομμένο γονίδιο κολλάει μέσω της λιγάσης με το συμπληρωματικά κομμένο πλασμίδιο. Για τον σκοπό αυτό πραγματοποιούνται 3 αντιδράσεις, με διαφορετικές αναλογίες πλασμιδίου και γονιδίου, με το γονίδιο να βρίσκεται σε όλες σε περίσσεια, προκειμένου να αυξηθούν οι πιθανότητες ότι θα ληφθεί από το πλασμίδιο. Επίσης, κατασκευάζονται 2 Control, ένα χωρίς την προσθήκη γονιδίου και ένα χωρίς την προσθήκη γονιδίου και λιγάσης. Οι αντιδράσεις πραγματοποιούνται στους 16°C σε Thermal Cycler PCR για 4 h.

Αναλυτικά, οι ακριβείς ποσότητες των συστατικών της κάθε αντίδρασης αναφέρονται στον παρακάτω πίνακα.

Πίνακας 1: Αναλυτική σύσταση των αντιδράσεων ligation που πραγματοποιούνται

	Υπερακάθαρο νερό (μL)	Ρυθμιστικό διάλυμα λιγάσης (μL)	πλασμίδιο pPICZ(alpha) C (μL)	Γονίδιο (μL)	Λιγάση* (μL)
1:3	13	2	1	3	1
1:5	11	2	1	5	1
1:7	3	2	1	7	1
Control 1	16	2	1	-	1
Control 2	17	2	1	-	-

*4 U/μL

Μετασηματισμός κυττάρων *E.coli* με το πλασμίδιο έκφρασης pPICZ(alpha) C σε τρυβλία και πολλαπλασιασμός τους σε υγρές καλλιέργειες

Η διαδικασία του μετασηματισμού των κυττάρων *E.coli* με το πλασμίδιο έκφρασης pPICZ(alpha) C σε τρυβλία είναι όμοια με αυτήν που περιεγράφηκε για τον μετασηματισμό με το πλασμίδιο πολλαπλασιασμού PCR Blunt με τη μόνη διαφορά ότι ως αντιβιοτικό χρησιμοποιείται η ζεοσίνη. Έτσι, κατασκευάζεται θρεπτικό μέσο LB χαμηλής αλατότητας και προστίθεται όση ποσότητα ζεοσίνης απαιτείται, δεδομένου ότι για τα βακτήρια χρειάζονται 25 μL ζεοσίνης για 100 mL θρεπτικού μέσου. Όπως περιεγράφηκε παραπάνω ο πολλαπλασιασμός ανασυνδυασμένων κυττάρων *E.coli* σε υγρές καλλιέργειες (που έφεραν το πλασμίδιο πολλαπλασιασμού PCR Blunt), έτσι και στην περίπτωση που φέρουν το πλασμίδιο έκφρασης pPICZ(alpha) C ακολουθείται η ίδια διαδικασία με τη διαφοροποίηση της χρήσης ζεοσίνης ως αντιβιοτικό.

Απομόνωση πλασμιδίου pPICZ(alpha) C με γονίδιο και ηλεκτροφόρηση

Για την απομόνωση του πλασμιδίου με το γονίδιο από τα κύτταρα *E.coli* ακολουθείται το πρωτόκολλο «Nucleospin Plasmid QuickPure protocol isolation of high-copy plasmid DNA from *E.coli*» και στη συνέχεια πραγματοποιείται πέψη και ηλεκτροφόρηση σε πηκτή αгарόζης, προκειμένου να εξακριβωθεί η ύπαρξη του πλασμιδίου pPICZ(alpha) C με το γονίδιο.

4. Αποτελέσματα – Σχολιασμός

4.1 Υδρολύσεις και ισομερειώσεις προκατεργασμένων υλικών με χρήση ήπιας οξειδωτικής προκατεργασίας και οργανικών διαλυτών

Για τις υδρολύσεις της βιομάζας που πραγματοποιήθηκαν σύμφωνα με την προαναφερθείσα πειραματική διαδικασία, προκειμένου να ληφθεί ενζυμικά από την κυτταρίνη η αντίστοιχη ποσότητα γλυκόζης και στη συνέχεια μέσω ενζυμικής ισομερείωσης η αντίστοιχη ποσότητα φρουκτόζης, χρησιμοποιήθηκαν υλικά προκατεργασμένα μέσω ήπιας οξειδωτικής προκατεργασίας και οργανικών διαλυτών, τα οποία συγκρίνονται ως προς την αποδοτικότητα της προκατεργασίας με βάση τους διαφορετικούς διαλύτες/καταλύτες και τις διαφορετικές συνθήκες που χρησιμοποιήθηκαν για το καθένα.

Η αποδοτικότητα κάθε προκατεργασίας αξιολογείται με βάση τα αποτελέσματα των υδρολύσεων και ισομερειώσεων και μπορεί να εκτιμηθεί από την (%) μετατροπή της κυτταρίνης σε γλυκόζη και από τα g φρουκτόζης που παράγονται ανά 100 g προκατεργασμένης βιομάζας. Τα μεγέθη αυτά αποτυπώνονται σε παρακάτω διαγράμματα και όπως φαίνεται τείνουν να έχουν σχεδόν μια ανάλογη σχέση μεταξύ τους, που μπορεί να αιτιολογηθεί γιατί δικαιολογημένα όσο περισσότερη γλυκόζη παραχθεί από την υδρόλυση της κυτταρίνης, τόση περισσότερη φρουκτόζη θα προκύψει από την ισομερείωση της γλυκόζης.

Τα προκατεργασμένα υλικά έχουν ομαδοποιηθεί κατάλληλα ώστε να γίνει μια πιο στοχευμένη σύγκριση μεταξύ διαλυτών, καταλυτών και συνθηκών.

Παρακάτω παρατίθενται πίνακες για κάθε ομάδα με το είδος του κάθε υλικού, τους διαλύτες, την αναλογία των διαλυτών, τις συνθήκες προκατεργασίας, τον χρόνο της αντίδρασης και το κλάσμα κυτταρίνης και ημικυτταρίνης από την ανάλυση της σύστασης του προκατεργασμένου υλικού.

Επίσης, παρατίθενται τα αποτελέσματα των υδρολύσεων και ισομερειώσεων για κάθε προκατεργασμένο υλικό και συγκεκριμένα αναφέρονται η τελική συγκέντρωση της γλυκόζης, η μετατροπή της κυτταρίνης σε γλυκόζη, η μετατροπή της γλυκόζης σε φρουκτόζη, η μετατροπή της κυτταρίνης σε φρουκτόζη και η μετατροπή της προκατεργασμένης βιομάζας σε φρουκτόζη.

Ομάδα 1

Η ομάδα 1 περιλαμβάνει υλικά που προέρχονται από το ίδιο είδος βιομάζας (πεύκο) αλλά έχουν προκατεργαστεί με χρήση διαφορετικών διαλυτών (αιθανόλη, ακετόνη, τετραϋδροφουράνιο) και διαφορετικών χρόνων προκατεργασίας για σταθερές συνθήκες προκατεργασίας.

Πίνακας 2: Συγκεντρωτικές πληροφορίες με το είδος του κάθε υλικού, τους διαλύτες, την αναλογία των διαλυτών, τις συνθήκες προκατεργασίας, τον χρόνο της αντίδρασης και το κλάσμα κυτταρίνης και ημικυτταρίνης για τα προκατεργασμένα υλικά της ομάδας 1.

Αριθμός υλικού	Ονομασία υλικού	Είδος βιομάζας	Διαλύτες	Αναλογία διαλυτών	Πίεση (bar)	Θερμοκρασία (°C)	Χρόνος αντίδρασης (min)	Ποσοστό κυτταρίνης	Ποσοστό ημικυτταρίνης
1	pine_EtOH_250119_L	Πεύκο	H ₂ O/EtOH	(50/50%)	16	175	60	77.6	13.2
2	pine_ACO_280119_L	Πεύκο	H ₂ O/ACO	(50/50%)	16	175	60	82.8	10.1
3	pine_THF_280119_L	Πεύκο	H ₂ O/THF	(50/50%)	16	175	60	60.8	6.7
4	pine_THF_270219_L	Πεύκο	H ₂ O/THF	(50/50%)	16	175	120	71.3	6.8
5	pine_EtOH_270219_L	Πεύκο	H ₂ O/EtOH	(50/50%)	16	175	120	79.6	9.7

Πίνακας 3: Αποτελέσματα υδρολύσεων και ισομερειώσεων των προκατεργασμένων υλικών της ομάδας 1.

Αριθμός υλικού	Συγκέντρωση γλυκόζης (g/L)		Μετατροπή κυτταρίνης σε γλυκόζη (%)		Μετατροπή γλυκόζης σε φρουκτόζη (%)		g φρουκτόζης /g κυτταρίνης		g φρουκτόζης /100 g προκατεργασμένης βιομάζας	
1	51.0	(0.8) ²	53.3	(0.8)	74.5	(0.4)	(0.4)	(0.0)	31.0	(0.6)
2	41.6	(1.3)	40.8	(1.3)	73.1	(0.9)	(0.3)	(0.0)	24.8	(1.1)
3	28.4	(0.2)	37.8	(0.3)	- ³	-	-	-	-	-
4	43.0	(0.8)	48.8	(0.9)	76.1	(0.4)	0.4	(0.0)	26.4	(0.6)
5	56.5	(4.9)	57.5	(5.0)	75.7	(2.1)	0.4	(0.1)	35.0	(4.0)

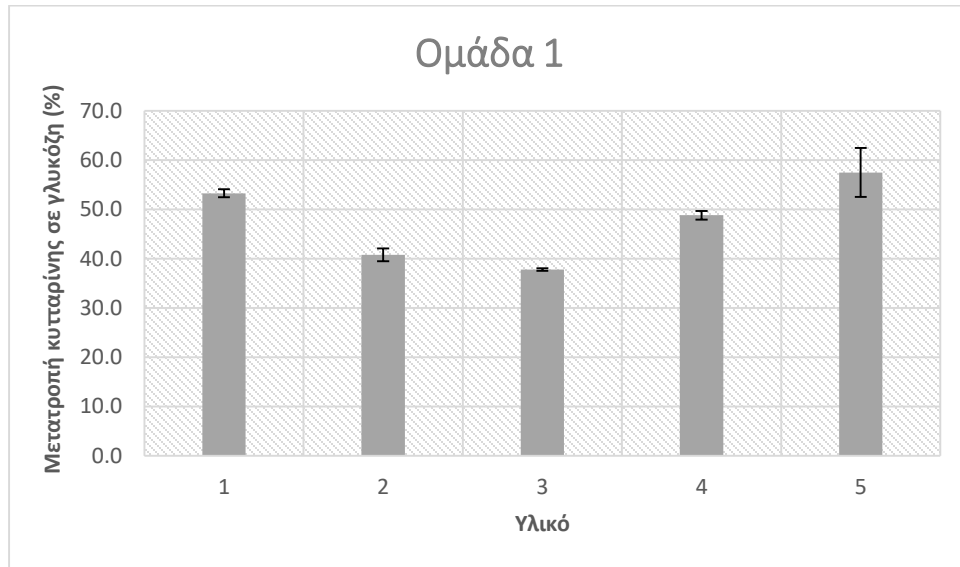
Συγκεκριμένα, όπως διαπιστώνεται και στα παρακάτω διαγράμματα, μεταξύ των προκατεργασμένων υλικών της ομάδας 1 που η βιομάζα προέρχεται από πεύκο και η θερμοκρασία της προκατεργασίας είναι 175°C, την υψηλότερη μετατροπή κυτταρίνης σε γλυκόζη (57.5%) επιτυγχάνει η προκατεργασία του υλικού με διαλύτη την αιθανόλη για χρόνο αντίδρασης 120 min (υλικό 5) με παραγωγή 35.0 g φρουκτόζης ανά 100 g προκατεργασμένης βιομάζας. Λίγο χαμηλότερη μετατροπή κυτταρίνης σε γλυκόζη παρουσιάζει η προκατεργασία με διαλύτη αιθανόλη και χρόνο 60 min (υλικό 1) και ακολουθεί η προκατεργασία με τετραϋδροφουράνιο για 120 min (υλικό 4), αν και αυτές οι προκατεργασίες παρουσιάζουν παρόμοια αποτελέσματα μεταξύ τους σχετικά με το κλάσμα g φρουκτόζης/ 100 g βιομάζας. Χαμηλότερη αποδοτικότητα συγκριτικά με τις προηγούμενες παρουσιάζει η προκατεργασία

² Οι αριθμοί στις παρενθέσεις αποτελούν το σφάλμα του εκάστοτε μεγέθους.

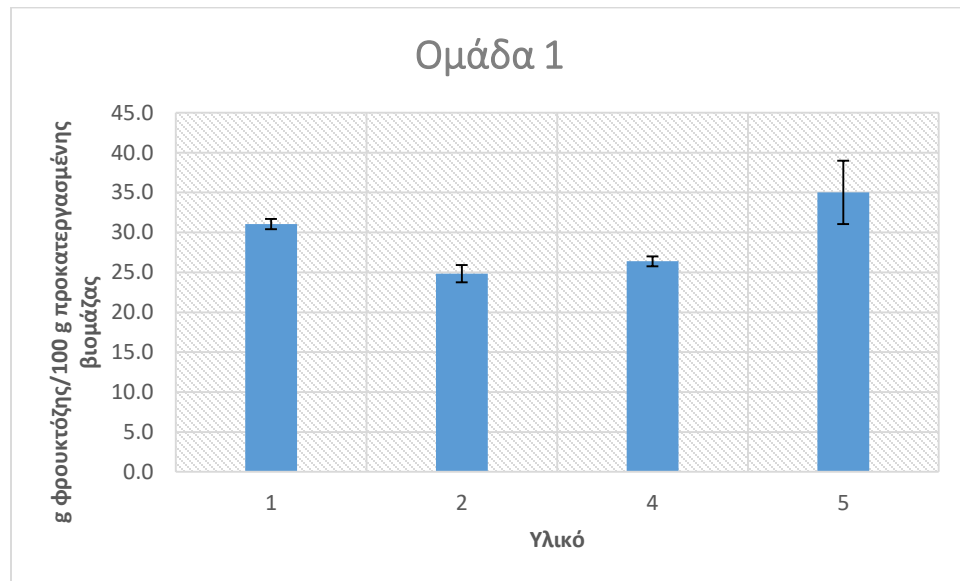
³ Η παύλα στα συγκεκριμένα μεγέθη δηλώνει ότι το υλικό δεν προχώρησε για ισομερείωση εξαιτίας της χαμηλής συγκέντρωσης γλυκόζης που παράχθηκε κατά το στάδιο υδρόλυσης.

με διαλύτη ακετόνη για 60 min (υλικό 2). Η συγκέντρωση της γλυκόζης από το υλικό που είχε προκατεργαστεί με τετραϋδροφουράνιο για 60 min (υλικό 3) ήταν πολύ χαμηλή (<30.0 g/L), γι' αυτό και το υδρόλυμα δεν προχώρησε για ισομερείωση.

Συμπερασματικά, δεδομένων αυτών των αποτελεσμάτων, ο διαλύτης αιθανόλη θεωρείται ο καταλληλότερος για την προκατεργασία του πεύκου ως τύπου βιομάζας και ο αυξημένος χρόνος προκατεργασίας (120 min έναντι 60 min) φαίνεται να ευνοεί την αποδοτικότητα της προκατεργασίας.



Διάγραμμα 1: Ποσοστιαία μετατροπή κυτταρίνης σε γλυκόζη για κάθε υλικό της ομάδας 1.



Διάγραμμα 2: Κλάσμα g φρουκτόζης ανά 100 g προκατεργασμένης βιομάζας για κάθε υλικό της ομάδας 1.

Ομάδα 2

Η ομάδα 2 περιλαμβάνει υλικά που προέρχονται από το ίδιο είδος βιομάζας (οξιά) και έχουν προκατεργαστεί με τον ίδιο διαλύτη (ισοβουτανόλη), αλλά διαφέρουν ως προς τη θερμοκρασία και τον χρόνο της προκατεργασίας.

Πίνακας 4: Συγκεντρωτικές πληροφορίες με το είδος του κάθε υλικού, τους διαλύτες, την αναλογία των διαλυτών, τις συνθήκες προκατεργασίας, τον χρόνο της αντίδρασης και το κλάσμα κυτταρίνης και ημικυτταρίνης για τα προκατεργασμένα υλικά της ομάδας 2.

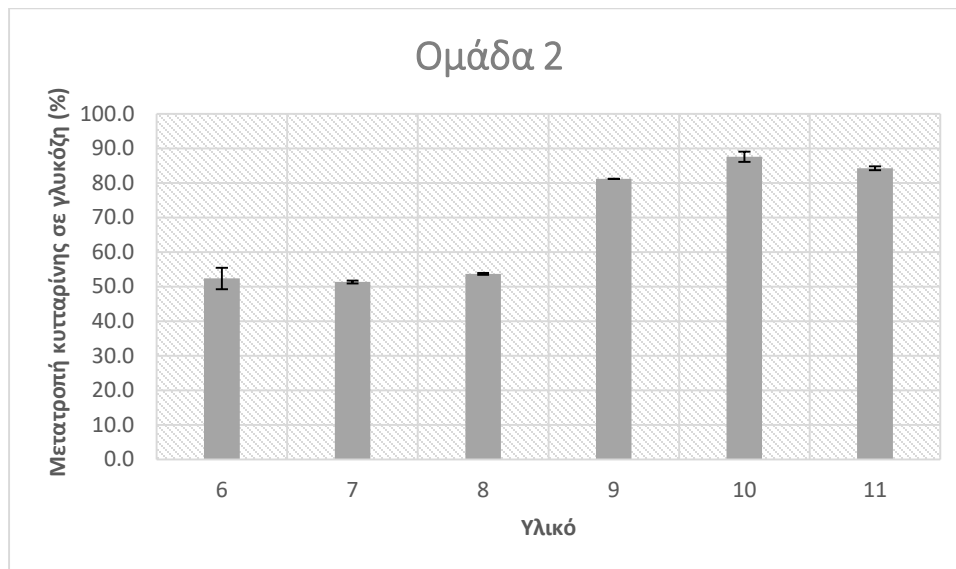
Αριθμός υλικού	Όνομασία υλικού	Είδος βιομάζας	Διαλύτες	Αναλογία διαλυτών	Πίεση (bar)	Θερμοκρασία (°C)	Χρόνος αντίδρασης (min)	Ποσοστό κυτταρίνης	Ποσοστό ημικυτταρίνης
6	lign_C4H10O_161019_L (Isobutanol)	Οξιά	H ₂ O/C ₄ H ₁₀ O	(50/50%)	16	150	60	55.5	25.0
7	lign_C4H10O_021019_L (Isobutanol)	Οξιά	H ₂ O/C ₄ H ₁₀ O	(50/50%)	16	150	120	65.9	19.4
8	lign_C4H10O_211019_L (Isobutanol)	Οξιά	H ₂ O/C ₄ H ₁₀ O	(50/50%)	16	160	60	68.2	21.6
9	lign_C4H10O_171019_L (Isobutanol)	Οξιά	H ₂ O/C ₄ H ₁₀ O	(50/50%)	16	160	120	87.8	16.0
10	lign_C4H10O_221019_L (Isobutanol)	Οξιά	H ₂ O/C ₄ H ₁₀ O	(50/50%)	16	175	60	87.4	13.1
11	lign_C4H10O_181019_L (Isobutanol)	Οξιά	H ₂ O/C ₄ H ₁₀ O	(50/50%)	16	175	120	92.6	11.6

Πίνακας 5: Αποτελέσματα υδρολύσεων και ισομερειώσεων των προκατεργασμένων υλικών της ομάδας 2.

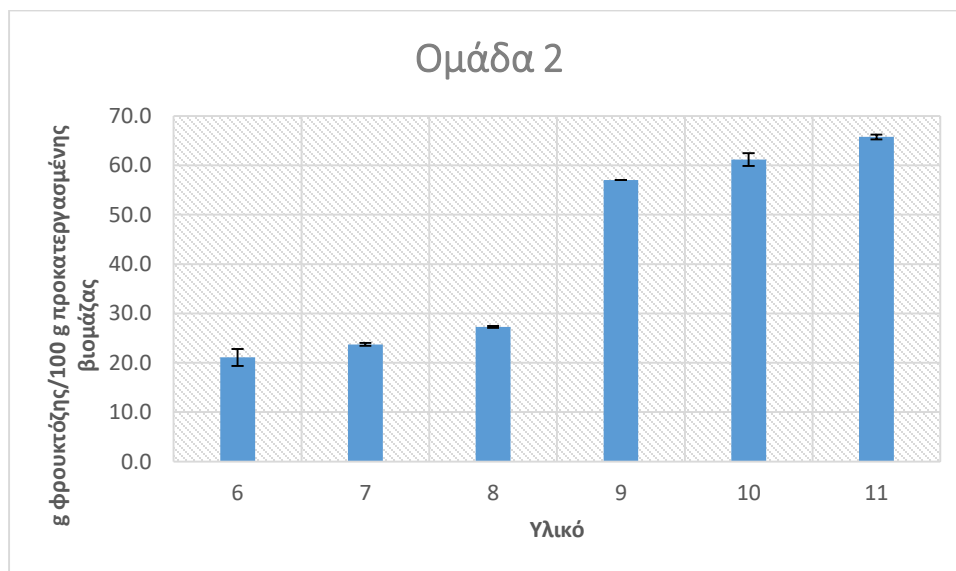
Αριθμός υλικού	Συγκέντρωση γλυκόζης (g/L)		Μετατροπή κυτταρίνης σε γλυκόζη (%)		Μετατροπή γλυκόζης σε φρουκτόζη (%)		g φρουκτόζης /g κυτταρίνης		g φρουκτόζης /100 g προκατεργασμένης βιομάζας	
6	35.9	(2.1)	52.4	(3.1)	73.1	(1.6)	0.4	(0.0)	21.1	(1.7)
7	41.7	(0.4)	51.3	(0.4)	69.5	(0.3)	0.4	(0.0)	23.7	(0.3)
8	45.2	(0.2)	53.7	(0.3)	73.7	(0.1)	0.4	(0.0)	27.3	(0.2)
9	88.0	(0.0)	81.2	(0.0)	79.5	(0.0)	0.7	(0.0)	57.0	(0.0)
10	94.5	(1.6)	87.5	(1.5)	79.8	(0.3)	0.7	(0.0)	61.2	(1.3)
11	96.3	(0.6)	84.2	(0.6)	84.6	(0.1)	0.7	(0.0)	65.7	(0.5)

Όπως φαίνεται και στα παρακάτω διαγράμματα των προκατεργασμένων υλικών της ομάδας 2, που αποτελούν υλικά που προέρχονται από οξιά και στα οποία χρησιμοποιείται ο διαλύτης ισοβουτανόλη, υψηλότερη μετατροπή κυτταρίνης σε γλυκόζη (87.5%) προκύπτει από το υλικό που είχε προκατεργαστεί στους 175°C με χρόνο αντίδρασης 60 min (υλικό 10) από το οποίο παράγονται 61.2 g φρουκτόζης ανά 100 g προκατεργασμένης βιομάζας. Ελάχιστη χαμηλότερη μετατροπή κυτταρίνης σε γλυκόζη (84.2%) παρουσιάζει το υλικό που είχε προκατεργαστεί στους 175 °C με χρόνο 120 min (υλικό 11), που παρουσιάζει όμως μεγαλύτερη παραγωγή φρουκτόζης, με 65.7 g φρουκτόζης ανά 100 g προκατεργασμένης βιομάζας. Ακολουθεί το υλικό που είχε προκατεργαστεί στους 160 °C για 120 min (υλικό 9), ενώ εμφανώς χαμηλότερες μετατροπές κυτταρίνης σε γλυκόζη από τις προηγούμενες παρουσιάζουν τα υλικά που είχαν προκατεργαστεί υπό τις εξής συνθήκες: 160 °C/60 min (υλικό 8), 150 °C/120 min (υλικό 7) και 150 °C/60 min (υλικό 6). Παρόμοια συγκριτικά αποτελέσματα φαίνεται να εμφανίζονται και σχετικά με το κλάσμα g φρουκτόζης/100 g προκατεργασμένης βιομάζας.

Με βάση τα παραπάνω αποτελέσματα συνάγεται το συμπέρασμα ότι η αποδοτικότητα της προκατεργασίας αυξάνεται με αύξηση της θερμοκρασίας στην οποία κατεργάζεται το υλικό, αφού στους 175°C, που είναι η υψηλότερη θερμοκρασία που εξετάστηκε, παρατηρήθηκαν και οι υψηλότερες μετατροπές κυτταρίνης σε γλυκόζη. Μάλιστα, η θερμοκρασία των 160 °C (με χρόνο αντίδρασης 120 min) μπορεί να θεωρηθεί κρίσιμη συνθήκη για την προκατεργασία βιομάζας τύπου οξιάς με τον διαλύτη ισοβουτανόλη, καθώς πάνω από αυτή η μετατροπή της κυτταρίνης σε γλυκόζη παρουσιάζει σαφώς υψηλότερες τιμές.



Διάγραμμα 3: Ποσοστιαία μετατροπή κυτταρίνης σε γλυκόζη για κάθε υλικό της ομάδας 2.



Διάγραμμα 4: Κλάσμα g φρουκτόζης ανά 100 g προκατεργασμένης βιομάζας για κάθε υλικό της ομάδας 2.

Ομάδα 3

Η ομάδα 3 περιλαμβάνει υλικά που προέρχονται από το ίδιο είδος βιομάζας (οξιά) και έχουν προκατεργαστεί με τις ίδιες συνθήκες, αλλά διαφέρουν ως προς τον διαλύτη και κατηγοριοποιούνται περαιτέρω ως προς τη χρήση ή μη καταλυτών και το είδος των καταλυτών.

Κανένας καταλύτης

Πίνακας 6: Συγκεντρωτικές πληροφορίες με το είδος του κάθε υλικού, τους διαλύτες, την αναλογία των διαλυτών, τις συνθήκες προκατεργασίας, τον χρόνο της αντίδρασης και το κλάσμα κυτταρίνης και ημικυτταρίνης για τα προκατεργασμένα υλικά της ομάδας 3 χωρίς της χρήση καταλυτών.

Αριθμός υλικού	Ονομασία υλικού	Είδος βιομάζας	Διαλύτες	Αναλογία διαλυτών	Πίεση (bar)	Θερμοκρασία (°C)	Χρόνος αντίδρασης (min)	Ποσοστό κυτταρίνης	Ποσοστό ημικυτταρίνης
12	lign_ACO_250418_L	Οξιά	H ₂ O/ACO	(25/75%)	16	150	120	52.5	23.7
13	lign_THF_120718_L	Οξιά	H ₂ O/THF	(50/50%)	16	150	120	73.1	13.3
14	lign_EtOH_020818_L	Οξιά	H ₂ O/EtOH	(50/50%)	16	150	120	56.7	20.7
7	lign_C ₄ H ₁₀ O_021019_L (Isobutanol)	Οξιά	H ₂ O/ C ₄ H ₁₀ O	(50/50%)	16	150	120	65.9	19.4

Πίνακας 7: Αποτελέσματα υδρολύσεων και ισομερειώσεων των προκατεργασμένων υλικών της ομάδας 3 χωρίς τη χρήση καταλυτών.

Αριθμός υλικού	Συγκέντρωση γλυκόζης (g/L)		Μετατροπή κυτταρίνης σε γλυκόζη (%)		Μετατροπή γλυκόζης σε φρουκτόζη (%)		g φρουκτόζης /g κυτταρίνης		g φρουκτόζης /100 g προκατεργασμένης βιομάζας	
12	16.4	(0.2)	25.3	(0.3)	-	-	-	-	-	-
13	72.3	(1.5)	80.1	(1.7)	77.7	(0.5)	0.6	(0.0)	45.3	(1.2)
14	40.4	(1.7)	57.7	(2.4)	73.5	(1.1)	0.4	(0.0)	23.8	(1.4)
7	41.7	(0.4)	51.3	(0.4)	69.5	(0.3)	0.4	(0.0)	23.7	(0.3)

Πολυοξυμεταλλικός καταλύτης (POM)

Πίνακας 8: Συγκεντρωτικές πληροφορίες με το είδος του κάθε υλικού, τους διαλύτες, την αναλογία των διαλυτών, τις συνθήκες προκατεργασίας, τον χρόνο της αντίδρασης και το κλάσμα κυτταρίνης και ημικυτταρίνης για τα προκατεργασμένα υλικά της ομάδας 3 με τη χρήση πολυοξυμεταλλικού καταλύτη.

Αριθμός υλικού	Ονομασία υλικού	Είδος βιομάζας	Διαλύτες	Αναλογία διαλυτών	Πίεση (bar)	Θερμοκρασία (°C)	Χρόνος αντίδρασης (min)	Ποσοστό κυτταρίνης	Ποσοστό ημικυτταρίνης
15	lign_ACO_Pom_100120_L	Οξιά	H ₂ O/ACO & 5g POM	(25/75%)	16	150	120	89.1	7.9
16	lign_EtOH_Pom_300120_L	Οξιά	H ₂ O/EtOH & 2.5g POM	(50/50%)	16	150	120	86.6	12.2
17	lign_THF_Pom_310120_L	Οξιά	H ₂ O/THF & 2.5g POM	(50/50%)	16	150	120	90.4	7.7
18	lign_C ₄ H ₁₀ O_Pom_030220_L (Isobutanol)	Οξιά	H ₂ O/ C ₄ H ₁₀ O& 2.5g POM	(50/50%)	16	150	120	93.3	5.3

Πίνακας 9: Αποτελέσματα υδρολύσεων και ισομερειώσεων των προκατεργασμένων υλικών της ομάδας 3 με τη χρήση πολυοξυμεταλλικού καταλύτη.

Αριθμός υλικού	Συγκέντρωση γλυκόζης (g/L)		Μετατροπή κυτταρίνης σε γλυκόζη (%)		Μετατροπή γλυκόζης σε φρουκτόζη (%)		g φρουκτόζης /g κυτταρίνης		g φρουκτόζης /100 g προκατεργασμένης βιομάζας	
15	46.4	(1.4)	42.2	(1.3)	60.4	(1.2)	0.3	(0.0)	22.3	(1.1)
16	58.5	(0.5)	54.7	(0.4)	64.8	(0.3)	0.4	(0.0)	30.3	(0.4)
17	47.7	(2.7)	42.8	(2.4)	64.7	(2.0)	0.3	(0.0)	25.3	(2.1)
18	56.2	(2.8)	48.8	(2.4)	61.5	(1.9)	0.3	(0.0)	28.0	(2.3)

Fe₃MO₁₂OP καταλύτης

Πίνακας 10: Συγκεντρωτικές πληροφορίες με το είδος του κάθε υλικού, τους διαλύτες, την αναλογία των διαλυτών, τις συνθήκες προκατεργασίας, τον χρόνο της αντίδρασης και το κλάσμα κυτταρίνης και ημικυτταρίνης για τα προκατεργασμένα υλικά της ομάδας 3 με τη χρήση Fe₃MO₁₂OP καταλύτη.

Αριθμός υλικού	Όνομασία υλικού	Είδος βιομάζας	Διαλύτες	Αναλογία διαλυτών	Πίεση (bar)	Θερμοκρασία (°C)	Χρόνος αντίδρασης (min)	Ποσοστό κυτταρίνης	Ποσοστό ημικυτταρίνης
19	lign_ACO_Fe ₃ MO ₁₂ OP_010620_L	Οξιά	H ₂ O/ACO & 2.5g Fe ₃ MO ₁₂ OP	(50/50%)	16	150	120	82.0	7.0
20	lign_EtOH_Fe ₃ MO ₁₂ OP_020620_L	Οξιά	H ₂ O/EtOH & 2.5g Fe ₃ MO ₁₂ OP	(50/50%)	16	150	120	77.7	9.9
21	lign_C ₄ H ₁₀ O_Fe ₃ MO ₁₂ OP_290620_L	Οξιά	H ₂ O/C ₄ H ₁₀ O & 0.25g Fe ₃ MO ₁₂ OP	(50/50%)	16	150	120	78.5	9.8

Πίνακας 11: Αποτελέσματα υδρολύσεων και ισομερειώσεων των προκατεργασμένων υλικών της ομάδας 3 με τη χρήση Fe₃MO₁₂OP καταλύτη.

Αριθμός υλικού	Συγκέντρωση γλυκόζης (g/L)		Μετατροπή κυτταρίνης σε γλυκόζη (%)		Μετατροπή γλυκόζης σε φρουκτόζη (%)		g φρουκτόζης /g κυτταρίνης		g φρουκτόζης /100 g προκατεργασμένης βιομάζας	
19	81.3	(0.8)	80.3	(0.8)	77.3	(0.2)	0.6	(0.0)	50.8	(0.7)
20	66.9	(1.8)	69.7	(1.9)	77.9	(0.6)	0.5	(0.0)	42.0	(1.4)
21	78.4	(0.7)	81.0	(0.7)	74.7	(0.2)	0.6	(0.0)	47.1	(0.5)

Cu₃MO₁₂OP καταλύτης

Πίνακας 12: Συγκεντρωτικές πληροφορίες με το είδος του κάθε υλικού, τους διαλύτες, την αναλογία των διαλυτών, τις συνθήκες προκατεργασίας, τον χρόνο της αντίδρασης και το κλάσμα κυτταρίνης και ημικυτταρίνης για τα προκατεργασμένα υλικά της ομάδας 3 με τη χρήση Cu₃MO₁₂OP καταλύτη.

Αριθμός υλικού	Ονομασία υλικού	Είδος βιομάζας	Διαλύτες	Αναλογία διαλυτών	Πίεση (bar)	Θερμοκρασία (°C)	Χρόνος αντίδρασης (min)	Ποσοστό κυτταρίνης	Ποσοστό ημικυτταρίνης
22	lign_ACO_Cu ₃ MO ₁₂ OP_120620_L	Οξιά	H ₂ O/ACO & 2.5g Cu ₃ MO ₁₂ OP	(50/50%)	16	150	120	83.3	6.8
23	lign_EtOH_Cu ₃ MO ₁₂ OP_020620_L	Οξιά	H ₂ O/EtOH & 2.5g Cu ₃ MO ₁₂ OP	(50/50%)	16	150	120	89.9	3.3
24	lign_C ₄ H ₁₀ O_Cu ₃ MO ₁₂ OP_260620_L	Οξιά	H ₂ O/C ₄ H ₁₀ O & 0.25g Cu ₃ MO ₁₂ OP	(50/50%)	16	150	120	86.6	8.2

Πίνακας 13: Αποτελέσματα υδρολύσεων και ισομερειώσεων των προκατεργασμένων υλικών της ομάδας 3 με τη χρήση Cu₃MO₁₂OP καταλύτη.

Αριθμός υλικού	Συγκέντρωση γλυκόζης (g/L)		Μετατροπή κυτταρίνης σε γλυκόζη (%)		Μετατροπή γλυκόζης σε φρουκτόζη (%)		g φρουκτόζης /g κυτταρίνης		g φρουκτόζης /100 g προκατεργασμένης βιομάζας	
22	47.0	(4.1)	45.7	(3.9)	68.5	(2.7)	0.3	(0.0)	25.8	(3.3)
23	53.9	(1.6)	48.6	(1.5)	69.0	(0.9)	0.3	(0.0)	30.6	(1.3)
24	77.5	(2.3)	72.5	(2.1)	74.7	(0.7)	0.5	(0.0)	46.8	(1.8)

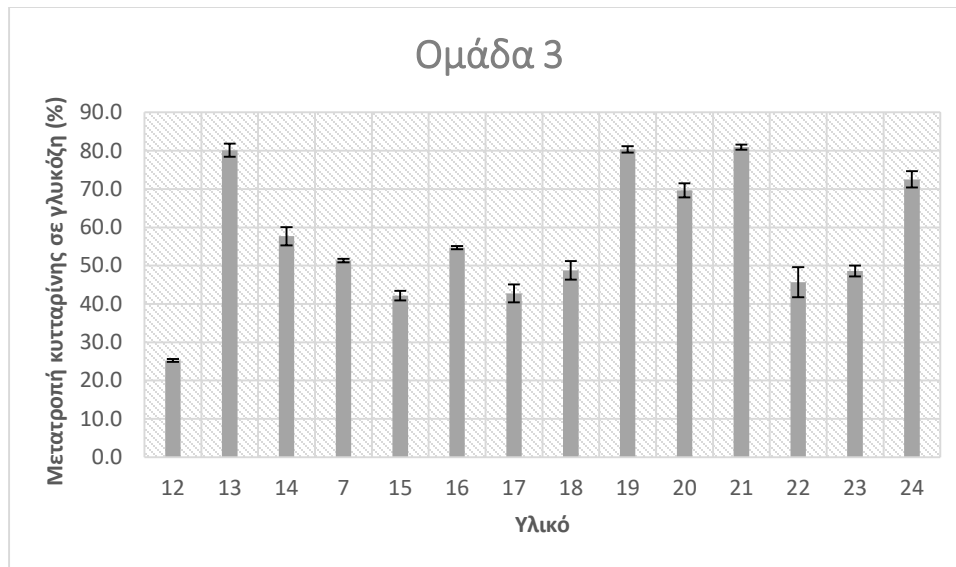
Από τα αντίστοιχα παρακάτω διαγράμματα των προκατεργασμένων υλικών της ομάδας 3, όταν δεν προστίθεται κάποιος στερεός καταλύτης, παρατηρείται ότι ο καλύτερος με διαφορά διαλύτης για την προκατεργασία της βιομάζας τύπου οξιάς είναι το τετραϋδροφουράνιο (υλικό 13) με 80.1% μετατροπή κυτταρίνης σε γλυκόζη και παραγωγή 45.3 g φρουκτόζης ανά 100 g προκατεργασμένης βιομάζας. Ακολουθεί συγκριτικά με την αποδοτικότητα η προκατεργασία με διαλύτη αιθανόλη (υλικό 14) και στη συνέχεια η προκατεργασία με διαλύτη ισοβουτανόλη (υλικό 15). Το υλικό που κατεργάστηκε με χρήση ακετόνης ως διαλύτη (υλικό 12) εμφανίζει αρκετά χαμηλή τελική συγκέντρωση γλυκόζης (<30.0 g/L) και δεν προχώρησε για ισομερείωση.

Σχετικά με τα προκατεργασμένα υλικά της ομάδας 3 στα οποία προστίθεται ο πολυοξυμεταλλικός καταλύτης (POM), φαίνεται ότι η υψηλότερη μετατροπή κυτταρίνης σε γλυκόζη (54.7%) επιτυγχάνεται με χρήση της αιθανόλης ως διαλύτη (υλικό 16) και παράγονται 30.3 g φρουκτόζης ανά 100 g προκατεργασμένης βιομάζας. Μια ελάχιστα χαμηλότερη μετατροπή κυτταρίνης σε γλυκόζη και κλάσμα g φρουκτόζης ανά 100 g προκατεργασμένης βιομάζας επιτυγχάνεται με τη χρήση της ισοβουτανόλης (υλικό 18) και ακολουθούν οι προκατεργασίες με διαλύτες ακετόνη (υλικό 15) και τετραϋδροφουράνιο (υλικό 17) με χαμηλότερα αποτελέσματα σε σχέση με την αποδοτικότητα της προκατεργασίας.

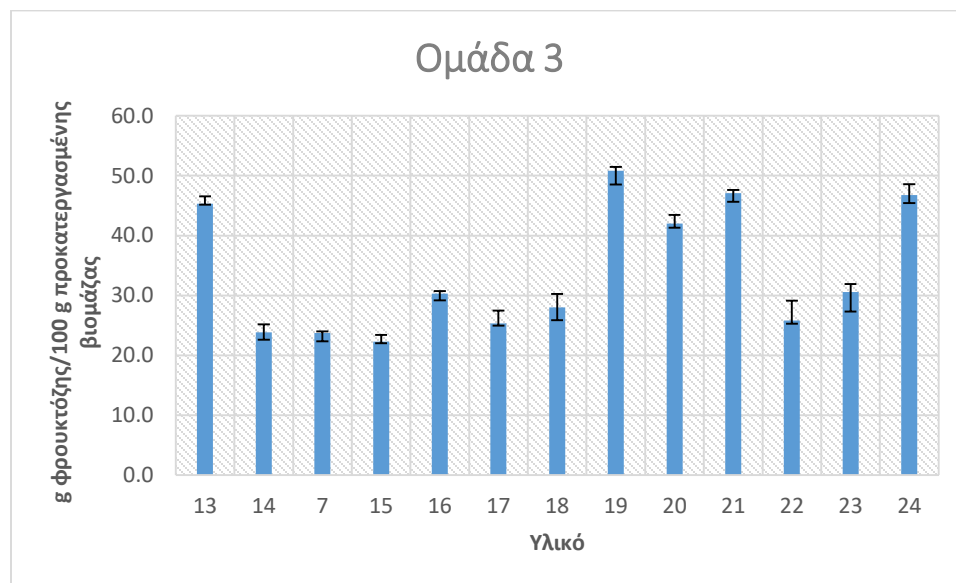
Σχετικά με τα προκατεργασμένα υλικά της ομάδας 3, μεταξύ αυτών που προστίθεται ο $\text{Fe}_3\text{MO}_{12}\text{OP}$ καταλύτης, παρατηρείται ότι η υψηλότερη μετατροπή κυτταρίνης σε γλυκόζη (81.0%) επιτυγχάνεται με χρήση της ισοβουτανόλης ως διαλύτη (υλικό 21), με παραγωγή 47.1 g φρουκτόζης ανά 100 g προκατεργασμένης βιομάζας, ενώ πολύ κοντινά αποτελέσματα παρουσιάζει και η προκατεργασία με ακετόνη (υλικό 19) με 80.3% μετατροπή κυτταρίνης σε γλυκόζη και με λίγο μεγαλύτερη παραγωγή φρουκτόζης, η οποία είναι 50.8 g φρουκτόζης ανά 100 g προκατεργασμένης βιομάζας. Χαμηλότερη συγκριτικά με τις προηγούμενες φαίνεται να είναι η μετατροπή κυτταρίνης σε γλυκόζη με τη χρήση αιθανόλης ως διαλύτη (υλικό 20).

Σχετικά με τα προκατεργασμένα υλικά της ομάδας 3 που προστίθεται ο $\text{Cu}_3\text{MO}_{12}\text{OP}$ καταλύτης, παρατηρείται ότι η υψηλότερη μετατροπή κυτταρίνης σε γλυκόζη (72.5%) επιτυγχάνεται με χρήση της ισοβουτανόλης ως διαλύτη (υλικό 24) με παραγωγή 46.8 g φρουκτόζης ανά 100 g προκατεργασμένης βιομάζας. Χαμηλότερες μετατροπές κυτταρίνης σε γλυκόζη παρουσιάζονται με τη χρήση ακετόνης (υλικό 22) και αιθανόλης (υλικό 23) για την προκατεργασία με τη χρήση του στερεού καταλύτη $\text{Cu}_3\text{MO}_{12}\text{OP}$.

Από μια συνολική επισκόπηση των προκατεργασμένων υλικών της ομάδας 3 μπορεί να προκύψει ότι η πιο αποδοτική προκατεργασία πραγματοποιείται με χρήση του $\text{Fe}_3\text{MO}_{12}\text{OP}$, που φαίνεται να είναι ο καλύτερος από τους στερεούς καταλύτες που δοκιμάστηκαν για την προκατεργασία βιομάζας τύπου οξιάς με διαλύτες ακετόνη ή ισοβουτανόλη, ενώ υψηλή μετατροπή κυτταρίνης σε γλυκόζη και υψηλό κλάσμα φρουκτόζης ανά 100 g προκατεργασμένης βιομάζας επιτυγχάνονται και με απουσία καταλυτών και χρήση αποκλειστικά διαλυτών και συγκεκριμένα του τετραϋδροφουρανίου. Ο καταλύτης $\text{Cu}_3\text{MO}_{12}\text{OP}$ δίνει και αυτός κάποια ικανοποιητικά αποτελέσματα σχετικά με την αποδοτικότητα της προκατεργασίας, ενώ ο καταλύτης POM δείχνει να είναι λιγότερο κατάλληλος.



Διάγραμμα 5: Ποσοστιαία μετατροπή κυτταρίνης σε γλυκόζη για κάθε υλικό της ομάδας 3.



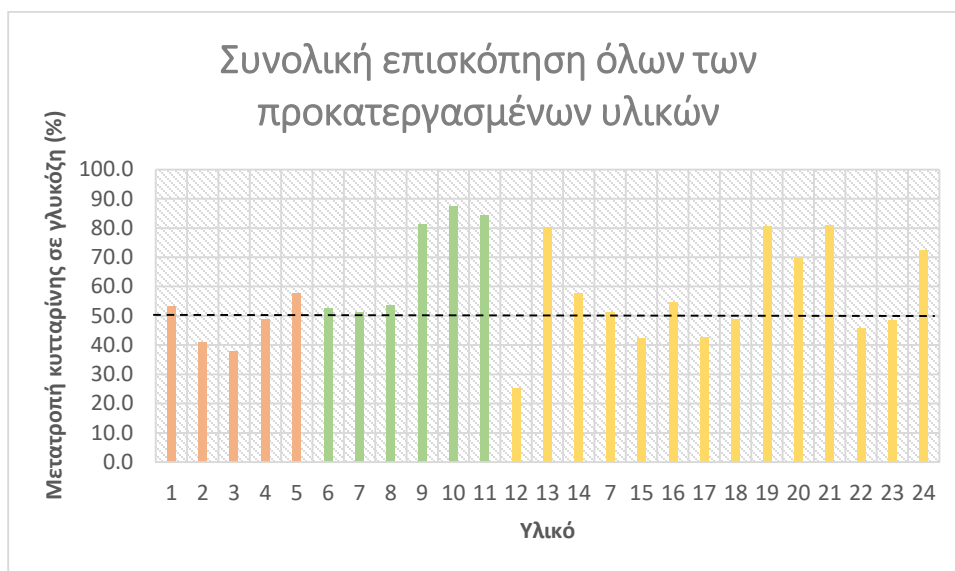
Διάγραμμα 6: Κλάσμα g φρουκτόζης ανά 100 g προκατεργασμένης βιομάζας για κάθε υλικό της ομάδας 3.

Αξίζει να σημειωθεί ότι υπάρχουν υλικά που δίνουν μια σχετικά ικανοποιητική τελική συγκέντρωση γλυκόζης, αλλά το κλάσμα g φρουκτόζης ανά 100 g προκατεργασμένης βιομάζας είναι χαμηλό. Αυτό μπορεί να οφείλεται σε δύο παραμέτρους: στο ποσοστό κυτταρίνης του υλικού ή/και στην απόδοση της ισομερείωσης. Από τη μία, δεδομένου ότι για να υπολογιστεί το κλάσμα g φρουκτόζης/100 g προκατεργασμένης βιομάζας, διαιρούνται τα g φρουκτόζης/g κυτταρίνης με το ποσοστό της κυτταρίνης του υλικού, είναι επόμενο ότι υλικά με υψηλό ποσοστό κυτταρίνης μπορεί να εμφανίζουν χαμηλότερες τιμές για το συγκεκριμένο κλάσμα. Αν αυτό συνδυαστεί με μικρότερη απόδοση ισομερείωσης, εξαιτίας πιθανής απώλειας της ενεργότητας της ισομεράσης ή απόκλιση από το βέλτιστο pH του υδρολύματος,

τότε οι τιμές του κλάσματος g φρουκτόζης/100 g προκατεργασμένης βιομάζας θα είναι σαφώς χαμηλότερες από τις αναμενόμενες.

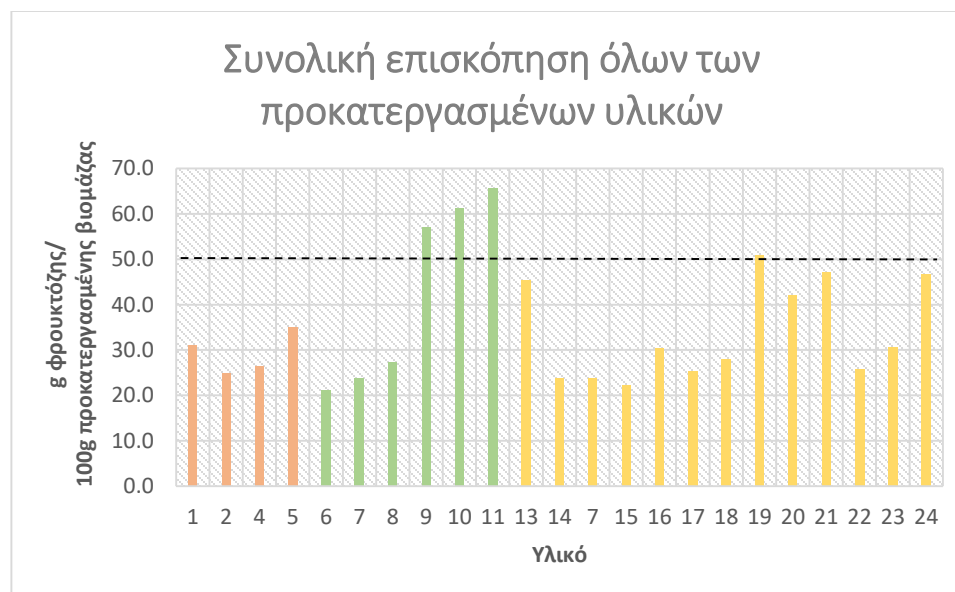
Δεδομένων των παραπάνω παρατηρήσεων και των παρακάτω διαγραμμάτων, στα οποία εξετάζονται συνολικά οι αποδοτικότητες όλων των προκατεργασμένων υλικών, μπορούν να εξαχθούν κάποια βασικά συμπεράσματα. Οι προκατεργασίες που διακρίνονται με τα καλύτερα αποτελέσματα, είναι εκείνες που ξεπερνούν τη 50% μετατροπή της κυτταρίνης σε φρουκτόζη και από τα 100 g προκατεργασμένης βιομάζας περισσότερα από τα μισά καταλήγουν να μετατρέπονται σε φρουκτόζη. Με βάση αυτά προκύπτει ότι η θερμοκρασία είναι μια ιδιαίτερα κρίσιμη παράμετρος της προκατεργασίας, καθώς τα υλικά που κατεργάστηκαν υπό υψηλότερες θερμοκρασίες (με διαλύτη ισοβουτανόλη) δίνουν τις υψηλότερες μετατροπές κυτταρίνης σε γλυκόζη και τα υψηλότερα κλάσματα φρουκτόζης ανά 100 g προκατεργασμένης βιομάζας. Ειδικότερα, τα υλικά οξιάς που είχαν προκατεργαστεί με ισοβουτανόλη στην υψηλή θερμοκρασία των 175 °C για 60 (υλικό 10) και 120 min (υλικό 11) παρουσίασαν 87.5% και 84.2% μετατροπή κυτταρίνης σε γλυκόζη και παραγωγή 61.2 και 65.7 g φρουκτόζης ανά 100 g προκατεργασμένης βιομάζας, αντίστοιχα. Η προκατεργασία στη θερμοκρασία των 160 °C για 120 min με χρήση ισοβουτανόλης (υλικό 9), επέφερε και αυτή υψηλή μετατροπή κυτταρίνης σε φρουκτόζη (81.2%) και παραγωγή 57.0 g φρουκτόζης ανά 100 g προκατεργασμένης βιομάζας. Η χρήση του κατάλληλου διαλύτη και καταλύτη παίζει επίσης καθοριστικό ρόλο στην αποδοτικότητα της προκατεργασίας. Έτσι, σε χαμηλότερη θερμοκρασία (150 °C) και απουσία κάποιου στερεού μεταλλικού καταλύτη ξεχώρισε για την αποδοτικότητά του ως διαλύτης της προκατεργασίας το τετραϋδροφουράνιο και από τους στερεούς μεταλλικούς καταλύτες ο καταλύτης $Fe_3MO_{12}OP$ με τον οποίο επιτεύχθηκαν υψηλές μετατροπές κυτταρίνης σε γλυκόζη (80.3 % με χρήση ακετόνης και 81% με χρήση ισοβουτανόλης ως διαλύτη). Η χρήση του καταλύτη $Cu_3MO_{12}OP$ φαίνεται να έδωσε κάποια ικανοποιητικά αποτελέσματα σχετικά με την αποδοτικότητα της προκατεργασίας, ενώ ο καταλύτης POM αποδείχτηκε λιγότερο κατάλληλος. Τέλος, παρατηρήθηκε ότι η οξιά είναι επιδεκτικότερος τύπος βιομάζας σε υδρολύσεις συγκριτικά με το πεύκο, το οποίο γενικά παρουσιάζει χαμηλότερες μετατροπές κυτταρίνης σε γλυκόζη.

	Ομάδα 1
	Ομάδα 2
	Ομάδα 3



Διάγραμμα 7: Συνολική επισκόπηση όλων των προκατεργασμένων υλικών με βάση τη ποσοστιαία μετατροπή της κυτταρίνης σε γλυκόζη.

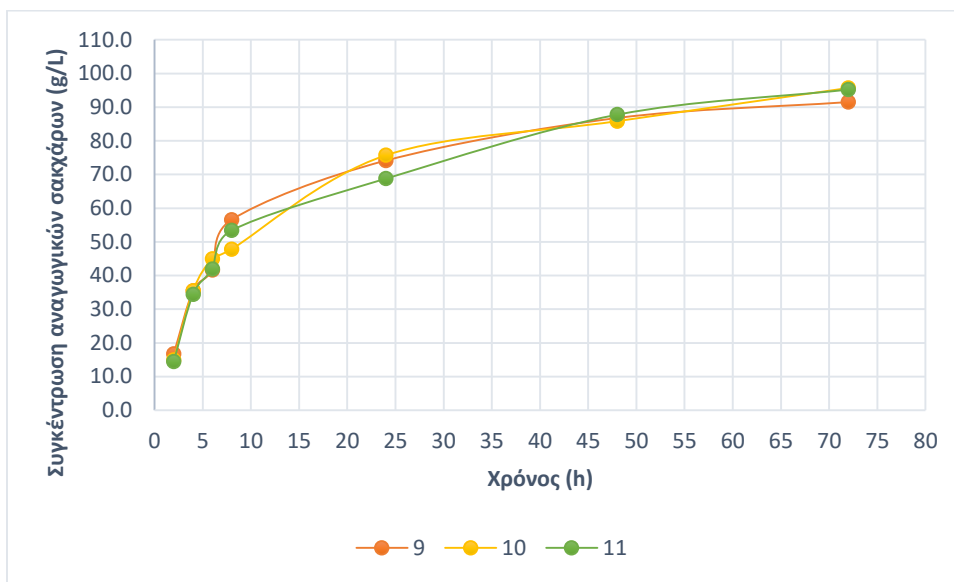
	Ομάδα 1
	Ομάδα 2
	Ομάδα 3



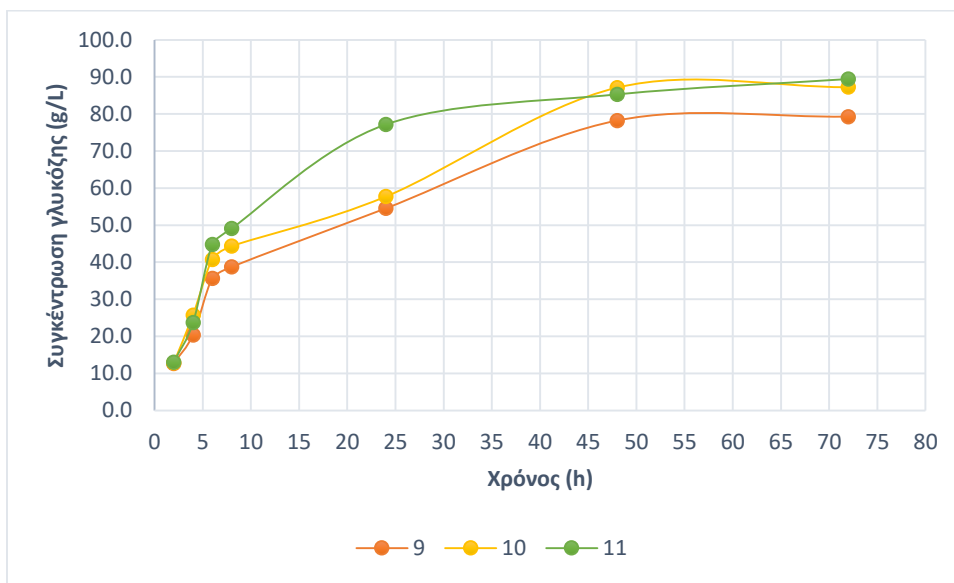
Διάγραμμα 8: Συνολική επισκόπηση όλων των προκατεργασμένων υλικών με βάση το κλάσμα g φρουκτόζης ανά 100 g προκατεργασμένης βιομάζας.

Ενδεικτικά παρατίθενται παρακάτω τα διαγράμματα της συγκέντρωσης των αναγωγικών σακχάρων και της γλυκόζης συναρτήσει του χρόνου για τα τρία προκατεργασμένα υλικά με τις υψηλότερες αποδοτικότητες, που είναι αυτά στα οποία είχαν εφαρμοστεί υψηλότερες θερμοκρασίες προκατεργασίας (υλικά 9,10,11). Παρόμοια μορφή έχουν οι αντίστοιχες καμπύλες για όλα τα προκατεργασμένα υλικά. Όπως φαίνεται μέχρι τις πρώτες 8 h της ενζυμικής υδρόλυσης παρουσιάζεται μια απότομη αύξηση της συγκέντρωσης των σακχάρων, εφόσον η συγκέντρωση του υποστρώματος είναι

υψηλότερη και η συγκέντρωση του προϊόντος χαμηλότερη, με αποτέλεσμα η παρεμπόδιση να είναι μικρή. Αντίθετα, από τις 24 h και μετά εμφανίζεται ένα πλατό που φτάνει τη μέγιστη τιμή σακχάρων που μπορεί να προκύψει από την υδρόλυση και αυτό οφείλεται στην μείωση της συγκέντρωσης του υποστρώματος και την αύξηση της συγκέντρωσης του προϊόντος, που συνεπάγεται παρεμπόδιση της δράσης των κυτταρινολυτικών ενζύμων. Επίσης, οι τιμές των συγκεντρώσεων των αναγωγικών σακχάρων είναι μεγαλύτερες από αυτές της γλυκόζης, που είναι αναμενόμενο, εφόσον η γλυκόζη είναι ένα αναγωγικό σάκχαρο αλλά όχι το μοναδικό. Στην πραγματικότητα πέρα από την υδρόλυση της κυτταρίνης που δίνει γλυκόζη, μπορεί να παραχθεί και ξυλόζη από το κλάσμα της ημικυτταρίνης.



Διάγραμμα 9: Διαγραμματική απεικόνιση της συγκέντρωσης των αναγωγικών σακχάρων συναρτήσει του χρόνου κατά την ενζυμική υδρόλυση για τα τρία προκατεργασμένα υλικά που παρουσίασαν τις υψηλότερες αποδοτικότητες.



Διάγραμμα 10: Διαγραμματική απεικόνιση της συγκέντρωσης της γλυκόζης συναρτήσει του χρόνου κατά την ενζυμική υδρόλυση για τα τρία προκατεργασμένα υλικά που παρουσίασαν τις υψηλότερες αποδοτικότητες.

4.2 Χημική αφυδάτωση φρουκτόζης προς παραγωγή 5-υδροξυμεθυλοφουρφουράλης (HMF)

Προκειμένου να μελετηθεί η παραγωγή της 5-υδροξυμεθυλοφουρφουράλης (HMF) μέσω αφυδάτωσης της φρουκτόζης που προερχόταν από προκατεργασμένο με αιθανόλη λιγνινοκυτταρινούχο υλικό από ξύλο οξιάς, πραγματοποιήθηκε μια μεγαλύτερης κλίμακας υδρόλυση ακολουθούμενη από μια μικρότερη υδρόλυση και στη συνέχεια ισομερείωση της παραγόμενης γλυκόζης για την παραγωγή σιροπιού πλούσιου σε φρουκτόζη. Τελικά, παράχθηκαν και από τα δύο στάδια της υδρόλυσης 152.3 g/L αναγωγικών σακχάρων και μετά το στάδιο της ισομερείωσης 129.6 g/L αναγωγικών σακχάρων (104.5 g/L φρουκτόζης και 25 g/L γλυκόζης), όπως αποτυπώνεται και στο παρακάτω σχήμα.



Σχήμα 19: Σχηματική απεικόνιση αρχικά της μεγαλύτερης κλίμακας υδρόλυσης με αυξημένη αρχική συγκέντρωση στερεών, ακολουθούμενη από τη μικρότερη υδρόλυση και στη συνέχεια της ισομερείωσης για την παραγωγή φρουκτόζης τελικής συγκέντρωσης 104.5 g/L [42].

Για την αφυδάτωση της παραχθείσας φρουκτόζης προς τον σχηματισμό HMF επιλέχτηκε η χρήση όξινων καταλυτών τόσο ομοιογενών, όπως το HCl, το H₃PO₄, το φορμικό οξύ και το μαλεϊκό οξύ, όσο και ετερογενών, όπως του καταλύτη H-mordernite και τα αποτελέσματα από τη χρήση του καθενός φαίνονται στον παρακάτω πίνακα.

Πίνακας 14: Αποτελέσματα αφυδάτωσης φρουκτόζης προς σχηματισμό HMF με τη χρήση όξινων ομοιογενών καταλυτών (HCl, H₃PO₄, φορμικό οξύ και μαλεϊκό οξύ) και του ετερογενούς καταλύτη H-mordernite.

Καταλύτης (τελική συγκέντρωση % κ.β)	Μετατροπή σακχάρων (%)	Απόδοση HMF (%)	Εκλεκτικότητα HMF (%)
HCl (0.7%)	76.1	36.3	47.7
H ₃ PO ₄ (3.0%)	83.1	43.7	52.6
Φορμικό οξύ (3.5%)	79.9	44.6	55.8
Μαλεϊκό οξύ (3.0%)	75.4	41.8	55.5
H-mordernite (2.6%)	97.6	1.4	1.4

Μεταξύ των όξινων καταλυτών που χρησιμοποιήθηκαν για την αφυδάτωση της φρουκτόζης προς την παραγωγή 5-υδροξυμεθυλοφουρφουράλης το φορμικό οξύ παρουσιάζει τα καλύτερα αποτελέσματα, με 44.6% απόδοση HMF και 55.8% εκλεκτικότητα HMF και μετατροπή σακχάρων 79.9%. Το H₃PO₄ και το

μαλεικό οξύ παρουσιάζουν επίσης υψηλή απόδοση HMF (43.7% και 41.8%, αντίστοιχα) και εκλεκτικότητα HMF (52.6% και 55.5%, αντίστοιχα), ενώ με τη χρήση του HCl επιτεύχθηκαν χαμηλότερες τιμές. Τέλος, με τη χρήση του ετερογενούς καταλύτη H-mordernite, αν και παρατηρήθηκε η υψηλότερη μετατροπή σακχάρων, εντέλει σημειώθηκε πολύ χαμηλή απόδοση και εκλεκτικότητα HMF και επομένως ο καταλύτης αποδεικνύεται ακατάλληλος για την αφυδάτωση της φρουκτόζης προς τον σχηματισμό HMF.

Αξίζει να σημειωθεί ότι όλοι οι καταλύτες που χρησιμοποιήθηκαν είναι ομοιογενείς όξινοι καταλύτες, εκτός από τον H-mordernite. Με τη χρήση ομογενών καταλυτών έναντι ετερογενών μεταλλικών καταλυτών όπως χρησιμοποιούνται σε πολλές άλλες μελέτες, η διαδικασία αυτή πλεονεκτεί καθώς καθίσταται περισσότερο φιλική προς το περιβάλλον και λιγότερο κοστοβόρα από άποψη καταλύτη. Επίσης, η χρήση οργανικών οξέων ως καταλύτες, οι οποίοι στη συγκεκριμένη περίπτωση παρουσίασαν και τις υψηλότερες αποδόσεις, πλεονεκτεί καθώς είναι ασθενέστερα οξέα συγκριτικά με τα ανόργανα, με αποτέλεσμα να έχουν χαμηλότερη περιβαλλοντική επίδραση και να εμφανίζουν μικρότερο βαθμό διάβρωσης στον εξοπλισμό.

Επιπρόσθετα, στη συγκεκριμένη πειραματική μελέτη αξιοποιείται η φρουκτόζη που προέρχεται από ένα πραγματικό λιγνινοκυτταρινούχο υπόστρωμα και όχι από καθαρή γλυκόζη όπως συμβαίνει σε πολλές μελέτες της βιβλιογραφίας. Οι Huang et al. μελέτησαν την παραγωγή HMF από καθαρή γλυκόζη μέσω της ισομερείωσης της γλυκόζης με την ισομεράση της γλυκόζης παρουσία τετραβορικού νατρίου και στη συνέχεια μέσω αφυδάτωσης της παραχθείσας φρουκτόζης προς HMF μέσω νερού-βουτανόλης και τελικά η απόδοση έφτασε 63.3 % HMF [12]. Επίσης, οι Wang et al. εξέτασαν την παραγωγή φουρφουράλης και HMF από ένα μείγμα καθαρών σακχάρων, γλυκόζης και ξυλόζης μέσω αφυδάτωσης της φρουκτόζης και της ξυλουλόζης με τη χρήση HCl ως καταλύτη [44]. Έτσι, η παραγωγή HMF από ένα λιγνινοκυτταρινούχο υλικό αποτελεί μια καινοτόμα προσέγγιση, που είναι σαφώς δυσκολότερη από την παραγωγή από καθαρά σάκχαρα, καθώς από τη μία σε αυτή την περίπτωση απαιτείται το στάδιο υδρόλυσης του υλικού, προκειμένου να «σπάσει» η σύνθετη δομή του και να απελευθερώσει τα μονομερή σάκχαρα και από την άλλη ένα λιγνινοκυτταρινούχο υλικό περιέχει πολλές ενώσεις που μπορούν να παρεμποδίσουν τη συνολική διεργασία.

4.3 Προκατεργασία λιγνινοκυτταρινούχων υλικών με μικροκύματα και χρήση οργανικών διαλυτών

Κατά την προκατεργασία στελεχών αραβοσίτου (corn stover) με μικροκύματα δοκιμάστηκε αρχικά η χρήση αποκλειστικά νερού ως διαλύτη για διαφορετικές συνθήκες θερμοκρασίας, αλλά τα αποτελέσματα των υδρολύσεων έδειξαν χαμηλές τελικές συγκεντρώσεις γλυκόζης. Συγκεκριμένα, εξετάστηκαν οι θερμοκρασίες 150,160,170 και 180 °C για χρόνο παραμονής 30 min και τα αποτελέσματα της τελικής συγκέντρωσης της γλυκόζης που προέκυψε μετά από την υδρόλυση των υλικών φαίνονται στον παρακάτω πίνακα.

Πίνακας 15: Συνθήκες προκατεργασίας με τη χρήση μικροκυμάτων και νερού και τελικές συγκεντρώσεις γλυκόζης κατόπιν υδρόλυσης των προκατεργασμένων υλικών.

Συνθήκες προκατεργασίας υλικού	Τελική συγκέντρωση γλυκόζης (g/L)
H ₂ O/150°C/30 min	15.5
H ₂ O/160°C/30 min	28.1
H ₂ O/170°C/30 min	31.3
H ₂ O/180°C/30 min	35.4

Οι χαμηλές τιμές της συγκέντρωσης της γλυκόζης σε αυτή την περίπτωση οφείλονται στη χρήση αποκλειστικά νερού ως διαλύτη, καθώς με αυτόν τον τρόπο διαλύεται μόνο η ημικυτταρίνη και καθόλου η λιγνίνη, η οποία διαλύεται μόνο σε οργανικούς διαλύτες. Έτσι, εξετάστηκε στη συνέχεια η χρήση νερού και αιθανόλης σε αναλογία 50:50 σε διαφορετικές θερμοκρασίες και χρόνους προκατεργασίας. Κατά τις δοκιμές αυτές παρατηρήθηκε απώλεια ποσότητας του διαλύτη από το φιαλίδιο (vial) και εξάτμισή της (εφόσον οι θερμοκρασίες λειτουργίας ήταν μεγαλύτερες από 150 °C και το σημείο βρασμού της αιθανόλης είναι 78.37 °C), που σε κάποιες περιπτώσεις είχε ως αποτέλεσμα να συμπαρασυρθεί με τον εξερχόμενο διαλύτη και υλικό έξω από το vial. Για την αντιμετώπιση αυτού του προβλήματος αρχικά μειώθηκε ο συνολικός όγκος της αντίδρασης από 20 mL σε 15 mL. Επίσης, η αύξηση της θερμοκρασίας επιλέχθηκε να πραγματοποιείται σε δύο στάδια με τη χρήση σταθερής τιμής ισχύος για καθένα και μάλιστα μικρότερης για το δεύτερο στάδιο. Σε κάποιες δοκιμές ωστόσο, ειδικά σε αυτές που η θερμοκρασία ήταν αυξημένη, παρατηρήθηκε και πάλι το ίδιο πρόβλημα, οπότε τελικά η αιτία αποδόθηκε είτε σε ελαττωματικά/πολυκαιρισμένα septum για το κλείσιμο των vial είτε σε ακαταλληλότητα του συγκεκριμένου είδους septum ως τρόπο κάλυψης των vial προκειμένου να διεξαχθεί η προκατεργασία αυτή με χρήση ιδιαίτερα πτητικών οργανικών διαλυτών όπως η αιθανόλη. Παρ' όλα αυτά πραγματοποιήθηκε η υδρόλυση των υλικών αυτών προκειμένου να εξεταστούν οι τελικές συγκεντρώσεις γλυκόζης. Οι τιμές αυτές όπως φαίνεται από τον παρακάτω πίνακα είναι ιδιαίτερα χαμηλές και δεν απέχουν πολύ από την τελική συγκέντρωση γλυκόζης που δίνει το μη προκατεργασμένο (untreated) στέλεχος αραβοσίτου. Αυτό μπορεί να εξηγηθεί είτε από την απώλεια του οργανικού διαλύτη σε ορισμένες περιπτώσεις που συνεπάγεται ελλιπή προκατεργασία των υλικών είτε από τους μικρούς χρόνους προκατεργασίας που επιλέχθηκαν. Αυξάνοντας τον χρόνο προκατεργασίας, εφόσον αντιμετωπιστεί και το πρόβλημα της απώλειας του διαλύτη από το vial, αναμένεται ότι η αποδοτικότητα της προκατεργασίας με μικροκύματα και χρήση οργανικών διαλυτών θα βελτιωθεί.

Πίνακας 16: Συνθήκες προκατεργασίας με τη χρήση μικροκυμάτων και αιθανόλης και τελικές συγκεντρώσεις γλυκόζης κατόπιν υδρόλυσης των προκατεργασμένων υλικών.

Συνθήκες προκατεργασίας υλικού	Τελική συγκέντρωση γλυκόζης (g/L)
Μη προκατεργασμένο στέλεχος αραβοσίτου	7.7
H ₂ O:EtOH (50:50)/154°C/12.5 min	9.3
H ₂ O:EtOH (50:50)/160°C/10 min	11.8
H ₂ O:EtOH (50:50)/165°C/5 min	10.7
H ₂ O:EtOH (50:50)/165°C/20 min	13.4
H ₂ O:EtOH (50:50)/175°C/2 min	11.1
H ₂ O:EtOH (50:50)/175°C/12.5 min	14.5

4.4 Παραγωγή οξειδάσης της γαλακτόζης από τον μύκητα *Fusarium oxysporum*

Η οξειδάση της γαλακτόζης από τον μύκητα *Fusarium oxysporum* επιλέχθηκε να μελετηθεί ως προς τη βιοκαταλυτική οξειδωτική μετατροπή της 5-υδροξυμεθυλοφουρφουράλης (HMF) στις βασικές δομικές ενώσεις FDCA, DFF, HMFCA και FFCA. Αρχικά, όπως περιγράφεται κατά την πειραματική διαδικασία, επιχειρήθηκε ο μετασχηματισμός κυττάρων *E.coli* με το πλασμίδιο πολλαπλασιασμού PCR Blunt που έφερε το γονίδιο της οξειδάσης της γαλακτόζης από τον *Fusarium oxysporum*. Τα κύτταρα αυτά αναπτύχθηκαν κανονικά στις καλλιέργειες σε τρυβλία και στις υγρές καλλιέργειες. Στη συνέχεια απομονώθηκε το πλασμίδιο PCR Blunt με το γονίδιο και υπέστησαν πέψη (digestion) προκειμένου να κοπούν μεταξύ τους και πραγματοποιήθηκε το ligation του γονιδίου με το πλασμίδιο φορέα έκφρασης pPICZ(alpha) C. Ωστόσο, κατά τον μετασχηματισμό των κυττάρων *E.coli* με το πλασμίδιο φορέα έκφρασης pPICZ(alpha) C που έφερε το γονίδιο της οξειδάσης της γαλακτόζης δεν παρατηρήθηκε καμία ανάπτυξη κυττάρων στις καλλιέργειες σε τρυβλία. Αυτό το πρόβλημα επιχειρήθηκε να αντιμετωπιστεί με διάφορους τρόπους εστιάζοντας σε τροποποιήσεις κατά τη διαδικασία της πέψης και του ligation. Αρχικά, τα περιοριστικά ένζυμα και η λιγάση ήταν πιθανό να έχουν χάσει την ενεργότητα τους, οπότε να μην είναι τόσο αποτελεσματικά τα στάδια της πέψης (digestion) και του ligation, γι' αυτό και πραγματοποιήθηκαν εκ νέου οι διαδικασίες με νέα περιοριστικά ένζυμα και λιγάση. Επίσης, δεδομένου ότι από τα αποτελέσματα της ηλεκτροφόρησης της ηλεκτρικής μετά από την ολική πέψη παρατηρήθηκε ότι το γονίδιο της οξειδάσης της γαλακτόζης ήταν ημιτελώς κομμένο, δοκιμάστηκαν διαφορετικές αναλογίες περιοριστικών ενζύμων κατά το στάδιο της πέψης, ώστε αυτά να βρίσκονται σε μεγαλύτερη ποσότητα και να αυξηθεί η πιθανότητα να κοπεί σωστά το γονίδιο από το πλασμίδιο PCR Blunt. Ακόμα, αυξήθηκε ο χρόνος της πέψης σε περίπτωση που το γονίδιο δεν προλάβει να κοπεί και δοκιμάστηκε η σταδιακή προσθήκη της ποσότητας των περιοριστικών ενζύμων. Κατά το ligation εξετάστηκαν τρεις διαφορετικές αναλογίες γονιδίου και πλασμιδίου, με το γονίδιο να είναι πάντα σε περίσσεια προκειμένου να βεβαιωθεί ότι λαμβάνεται από το πλασμίδιο. Ως τελευταία εναλλακτική επιχειρήθηκε η παραλαβή υψηλότερης συγκέντρωσης πλασμιδίου pPICZ(alpha) C και γονιδίου μέσω της μεθόδου λυοφιλίωσης (freeze-drying), ώστε να αυξηθεί η πιθανότητα να κολληθούν μεταξύ τους κατά το στάδιο του ligation. Παρόλες τις προσπάθειες και δοκιμές που έγιναν για την ανάπτυξη των κυττάρων *E.coli* με το πλασμίδιο έκφρασης pPICZ(alpha) C που έφερε το γονίδιο της οξειδάσης της γαλακτόζης, τελικά αυτό δεν κατέστη εφικτό σε καμία περίπτωση. Είναι πιθανό λοιπόν η αιτία του προβλήματος να μην βρίσκεται κατά τη διαδικασία της πέψης και του ligation, όπως θεωρήθηκε αρχικά, αλλά να εντοπίζεται στο προηγούμενο στάδιο του μετασχηματισμού των κυττάρων *E.coli* με το πλασμίδιο πολλαπλασιασμού PCR Blunt που έφερε το γονίδιο κατά το οποίο μπορεί να δημιουργείται κάποια μετάλλαξη στα άκρα του γονιδίου που εμποδίζει τα περιοριστικά ένζυμα να δράσουν αποτελεσματικά. Έτσι, απαιτείται μια αλληλούχιση (sequencing) του πλασμιδίου πολλαπλασιασμού PCR Blunt με το γονίδιο της οξειδάσης της γαλακτόζης προκειμένου να εξακριβωθεί αν έχει υπάρξει κάποια μετάλλαξη και σε δεύτερο χρόνο να ληφθεί έτοιμο συνθετικό πλασμίδιο έκφρασης pPICZ(alpha) C με ενσωματωμένο το γονίδιο, ώστε να προχωρήσει περαιτέρω η διαδικασία παραγωγής της οξειδάσης της γαλακτόζης.

5. Συμπεράσματα

5.1 Συζήτηση αποτελεσμάτων

Συνοψίζοντας όλα τα παραπάνω, στο πρώτο μέρος της παρούσας διπλωματικής εργασίας μελετήθηκε η αποδοτικότητα της ήπιας οξειδωτικής προκατεργασίας λιγνινοκυτταρινούχων υλικών με οργανικούς διαλύτες, χρησιμοποιώντας διαφορετικούς διαλύτες/καταλύτες και διαφορετικές συνθήκες κάθε φορά. Τα προκατεργασμένα υλικά υπέστησαν ενζυμική υδρόλυση προκειμένου να παραχθεί γλυκόζη από την περιεχόμενη κυτταρίνη και μέσω ενζυμικής ισομερείωσης η γλυκόζη μετατράπηκε σε φρουκτόζη και από τα αποτελέσματα των παραπάνω πειραμάτων μελετήθηκε η αποδοτικότητα της κάθε προκατεργασίας. Μεταξύ των προκατεργασμένων υλικών τα υλικά οξιάς που είχαν προκατεργαστεί με ισοβουτανόλη σε υψηλότερη θερμοκρασία (175°C) για 60 και 120 min και παρουσίασαν τις υψηλότερες μετατροπές κυτταρίνης σε γλυκόζη (87.5% και 84.2%, αντίστοιχα) με παραγωγή 61.2 και 65.7 g φρουκτόζης ανά 100 g προκατεργασμένης βιομάζας, αντίστοιχα. Ακόμα, η προκατεργασία στην υψηλή θερμοκρασία των 160°C για 120 min με χρήση ισοβουτανόλης, επέφερε και αυτή υψηλή μετατροπή κυτταρίνης σε γλυκόζη (81.2%) και παραγωγή 57.0 g φρουκτόζης ανά 100 g προκατεργασμένης βιομάζας. Έτσι, συμπεραίνεται ότι οι αυξημένες θερμοκρασίες (με διαλύτη ισοβουτανόλη) επιδρούν θετικά στην αποδοτικότητα της προκατεργασίας, καθώς σε αυτές τις περιπτώσεις περισσότερο από το ήμισυ της προκατεργασμένης βιομάζας μετατρέπεται σε φρουκτόζη. Σε χαμηλότερη θερμοκρασία (150°C) και απουσία κάποιου στερεού μεταλλικού καταλύτη ξεχώρισε για την αποδοτικότητά του ως διαλύτης της προκατεργασίας το τετραϋδροφουράνιο με 80.1% μετατροπή κυτταρίνης σε γλυκόζη και από τους στερεούς μεταλλικούς καταλύτες ο καταλύτης $\text{Fe}_3\text{MO}_{12}\text{OP}$, σημειώνοντας υψηλές μετατροπές κυτταρίνης σε γλυκόζη 80.3% με χρήση ακετόνης και 81.0% με χρήση ισοβουτανόλης ως διαλύτη. Με χρήση του καταλύτη $\text{Cu}_3\text{MO}_{12}\text{OP}$ η μετατροπή κυτταρίνης σε γλυκόζη έφτασε μέχρι 72.5%, ενώ ο καταλύτης POM αποδείχτηκε λιγότερο αποδοτικός συγκριτικά με τους υπόλοιπους.

Συνολικά, τα αποτελέσματα από την ήπια οξειδωτική προκατεργασία λιγνινοκυτταρινούχων υλικών (κυρίως οξιάς) με οργανικούς διαλύτες είναι πολύ ικανοποιητικά καθώς μετά το στάδιο της ενζυμικής υδρόλυσης οι μετατροπές της κυτταρίνης σε γλυκόζη κυμαίνονται μεταξύ 40-88%. Οι τιμές αυτές είναι κατά βάση παρόμοιες με αυτές που παρουσιάζονται σε άλλες βιβλιογραφικές μελέτες σχετικά με την προκατεργασία της βιομάζας μέσω οργανικών διαλυτών. Ενδεικτικά, σύμφωνα με τους Zhang et al. ο συνδυασμός ενζυμικής προϋδρόλυσης για προκατεργασία με χρήση αιθανόλης 80% και καταλύτη H_2SO_4 σε υλικό από μίσχανθο στους 150/170°C για 30/60 min επέφερε 75% μετατροπή κυτταρίνης σε γλυκόζη. Επίσης, σύμφωνα με τον Borand et al. μέσω προκατεργασίας σε ακτινωτή πεύκη με αναλογία νερού:αιθανόλης 60:40 και καταλύτη H_2SO_4 στους 200 °C για 47 min επιτεύχθηκε 60% μετατροπή κυτταρίνης σε γλυκόζη, ενώ για το ίδιο υλικό με χρήση ακετόνης (50:50) και καταλύτη H_2SO_4 στους 195°C για 40 min πραγματοποιήθηκε 71.8% μετατροπή κυτταρίνης σε γλυκόζη. Η προκατεργασία με χρήση επίσης αιθανόλης (75:25) σε υλικό από ευκάλυπτο σφαιρικό και καταλύτη οξικό οξύ στους 200°C για 60 min πέτυχε μέχρι και 96.6% μετατροπή κυτταρίνης σε γλυκόζη. Ακόμα, κατά τη προκατεργασία σε άχυρο σιταριού με οξικό οξύ (90:10), καταλύτη H_2SO_4 στους 110°C για 120 min μετατράπηκε 21.3% της κυτταρίνης σε γλυκόζη και με φορμικό οξύ (78:22) στους 107°C για 60 min μετατράπηκε 50.1% της κυτταρίνης σε γλυκόζη. Αξίζει να αναφερθεί ότι στις προαναφερθείσες

βιβλιογραφικές αναφορές, σε αντίθεση με τα πειράματα της παρούσας διπλωματικής, χρησιμοποιούνται ως καταλύτες οξέα που γενικώς δεν προτιμάται ως επιλογή [47,48].

Επιπλέον, η ήπια οξειδωτική προκατεργασία με οργανικούς διαλύτες φαίνεται να παρουσιάζει σε κάποιες περιπτώσεις καλύτερα αποτελέσματα συγκριτικά με άλλες μεθόδους προκατεργασίας που αναφέρονται βιβλιογραφικά. Για παράδειγμα, σύμφωνα με τον Kumar et al. η χημική προκατεργασία με θειϊκό οξύ για 90 min στους 121°C πέτυχε μόνο 23.9% μετατροπή κυτταρίνης σε γλυκόζη, ενώ στις ίδιες συνθήκες με NaOH μετατράπηκε 60.8% κυτταρίνη σε γλυκόζη. Κατά την προκατεργασία με H₂O₂ για 30 min στους 121°C πραγματοποιήθηκε 49.8% μετατροπή κυτταρίνης σε γλυκόζη. Ακόμα, σύμφωνα με τους Katsimpouras et al. μέσω οξείδωσης με ακετόνη και νερό σε ξύλο οξιάς στους 175°C για 2h εφαρμόζοντας διάφορες αναλογίες διαλύτη/νερού πραγματοποιήθηκαν μετατροπές κυτταρίνης σε γλυκόζη μεταξύ των τιμών 46-69% [14,49].

Η παραγωγή φρουκτόζης από λιγνινοκυτταρινούχα υλικά μέσω ισομερείωσης της παραγόμενης γλυκόζης αποτελεί ένα πεδίο έρευνας με ελάχιστες αναφορές και μελέτες, γεγονός που καθιστά δύσκολη τη σύγκριση των αποτελεσμάτων της παρούσας εργασίας με τη βιβλιογραφία, καταδεικνύοντας ωστόσο την καινοτομία του.

Επιπρόσθετα, στην παρούσα εργασία επιχειρήθηκε η προκατεργασία στελεχών αραβοσίτου με τη χρήση μικροκυμάτων και νερού ή οργανικών διαλυτών σε διαφορετικές θερμοκρασίες και για διαφορετικούς χρόνους προκατεργασίας, που έχει μελετηθεί ελάχιστα στη βιβλιογραφία. Οι χαμηλές τελικές συγκεντρώσεις γλυκόζης (μέχρι 35.4 g/L) που προέκυψαν με τη χρήση νερού οφείλονται στην αδυναμία απομάκρυνσης της λιγνίνης, ενώ οι επίσης χαμηλές τιμές (μέχρι 14.5 g/L) με τη χρήση αιθανόλης αποδόθηκαν στην απώλεια του διαλύτη από το φιαλίδιο (vial) κατά την διάρκεια της προκατεργασίας και στους μικρούς χρόνους προκατεργασίας που είχαν επιλεχτεί.

Στη συνέχεια, από προκατεργασμένο υλικό από ξύλο οξιάς κατόπιν δύο σταδίων υδρολύσης για την παραγωγή γλυκόζης και ενός σταδίου ισομερείωσης για την μετατροπή της σε φρουκτόζη (με 104.5 g/L παραχθείσας φρουκτόζης), εξετάστηκε η αφυδάτωση της φρουκτόζης σε 5-υδροξυμεθυλοφουρφουράλη (HMF) με τη χρήση όξινων ομογενών καταλυτών. Από αυτούς ξεχώρισε το φορμικό οξύ με τη μεγαλύτερη απόδοση (44.6%) και εκλεκτικότητα (55.8%) HMF. Στη βιβλιογραφία σχετικά με την αφυδάτωση της φρουκτόζης αναφέρεται η χρήση ετερογενών ιοντικών υβριδικών καταλυτών βασιζόμενοι σε οξέα που μπορούν να επιτύχουν 53.9% απόδοση HMF, η χρήση TiO₂-SO₃H και οξειδίου του γραφενίου που μπορούν να φτάσουν μέχρι 71% και 87% εκλεκτικότητα HMF, αντίστοιχα και η χρήση φωσφορικού ζirkονίου με απόδοση 39.4 mol% HMF. Επίσης, με χρήση σουλφονωμένης πολυανιλίνης σε μέσο νερό/1,4 διοξάνιο επιτυγχάνεται απόδοση 71% HMF και με χρήση μεσόπορων σουλφονικών οξέων σε μέσο νερό/νιτρομεθάνιο αναφέρεται εκλεκτικότητα 75% HMF [46,51,52,53,55,56]. Η σχετική μελέτη της συγκεκριμένης διπλωματικής εργασίας όμως ξεχωρίζει μεταξύ των παρεμφερών βιβλιογραφικών αναφορών καθώς από τη μία χρησιμοποιεί ομοιογενείς καταλύτες έναντι ετερογενών, με αποτέλεσμα να καθιστά τη διαδικασία περισσότερο φιλική προς το περιβάλλον και λιγότερο κοστοβόρα και από την άλλη επιτυγχάνει την παραγωγή HMF από ένα πραγματικό λιγνινοκυτταρινούχο υπόστρωμα και όχι από καθαρή γλυκόζη, όπως έχει δοκιμαστεί σε άλλες μελέτες.

Στο τελευταίο σκέλος του πειραματικού μέρους της εργασίας, επιχειρήθηκε η παραγωγή της οξειδάσης της γαλακτόζης από τον *Fusarium oxysporum* προκειμένου να μελετηθεί η οξειδωτική της δράση στο HMF προς τον σχηματισμό σημαντικών δομικών ενώσεων, όπως DFF, HMFCA, FFCA και FDCA. Κατά το αρχικό στάδιο του μετασχηματισμού των κυττάρων *E.coli* με το πλασμίδιο έκφρασης pPICZ(alpha) C που έφερε

το γονίδιο της οξειδάσης της γαλακτόζης, οι καλλιέργειες των κυττάρων στα τρυβλία δεν αναπτύχθηκαν. Έγιναν διάφορες τροποποιήσεις κατά τη διαδικασία της πέψης (digestion) και του ligation, οι οποίες περιγράφονται αναλυτικά σε προηγούμενο κεφάλαιο, αλλά σε καμία περίπτωση δεν κατάφερε να προχωρήσει η διαδικασία. Πιθανόν το πρόβλημα να οφείλεται σε κάποια μετάλλαξη στα άκρα του γονιδίου που δημιουργείται από το προηγούμενο στάδιο του μετασχηματισμού των κυττάρων *E.coli* με το πλασμίδιο πολλαπλασιασμού PCR Blunt που έφερε το γονίδιο, γι' αυτό και απαιτείται η αλληλούχιση (sequencing) αυτού. Σε δεύτερο χρόνο θα μπορούσε ως εναλλακτική λύση να ληφθεί το έτοιμο συνθετικό πλασμίδιο έκφρασης pPICZ(alpha) C με ενσωματωμένο το γονίδιο, ώστε να προχωρήσει περαιτέρω η διαδικασία παραγωγής της οξειδάσης της γαλακτόζης.

5.2 Μελλοντικές προτάσεις

Η ήπια οξειδωτική προκατεργασία της λιγνινοκυτταρινούχου βιομάζας με τη χρήση οργανικών διαλυτών που εφαρμόστηκε στην παρούσα διπλωματική εργασία παρουσιάζει πολλά πλεονεκτήματα με κυριότερο ότι διαχωρίζει αποτελεσματικά τα βασικά συστατικά της βιομάζας, παράγοντας υψηλής καθαρότητας κυτταρίνη και λιγνίνη. Ακόμα, είναι φιλικότερη προς το περιβάλλον διεργασία από άλλες χημικές μεθόδους προκατεργασίας, αλλά για να καταστεί ακόμα πιο πράσινη και οικονομικά συμφέρουσα είναι αναγκαίο να πραγματοποιείται ανάκτηση των διαλυτών, οι οποίοι χρησιμοποιούνται σε μεγάλη ποσότητα. Επιπλέον, η βελτιστοποίηση των συνθηκών προκατεργασίας (της θερμοκρασίας, του χρόνου προκατεργασίας, της συγκέντρωσης του διαλύτη και της επιλογής καταλυτών), με στόχο της μεγιστοποίηση της απόδοσης και της ποιότητας του προϊόντος, αλλά και η μελέτη προκατεργασίας διαφορετικών ειδών υποστρωμάτων, αποτελούν ακόμα ανοιχτά ερευνητικά πεδία. Πέρα από την χρήση της κυτταρίνης για την παραγωγή γλυκόζης, μπορεί να αξιοποιηθεί και το κλάσμα υψηλής καθαρότητας λιγνίνης απομονώνοντας το από τον οργανικό διαλύτη και παράγοντας με βάση αυτό χημικά προϊόντα βιολογικής προέλευσης με διάφορες βιομηχανικές εφαρμογές. Επίσης, παραπροϊόντα που σχηματίζονται κατά την προκατεργασία, όπως το HMF και η φουρφουράλη δεν πρέπει να θεωρούνται ανεπιθύμητα προϊόντα για ένα μελλοντικό βιοδιωλιστήριο παραγωγής φουρανίων, καθώς μπορούν να προστεθούν στην ποσότητα φουρανίων που παράγεται από την τυπική διεργασία που περιεγράφηκε, αυξάνοντας έτσι την παραγωγή του προϊόντος με αξιοποίηση της ίδιας πρώτης ύλης.

Η προκατεργασία της βιομάζας με μικροκύματα και η παράλληλη χρήση οργανικών διαλυτών, που επίσης εξετάστηκε στην εργασία, συνδυάζει τα θετικά χαρακτηριστικά των προκατεργασιών με οργανικούς διαλύτες με την ταχεία θέρμανση και την αύξηση του ρυθμού της αντίδρασης που προσφέρουν μεταξύ άλλων τα μικροκύματα. Με περαιτέρω μελέτη των συνθηκών προκειμένου να αντιμετωπιστούν οι όποιες δυσκολίες παρουσιάζονται στη διαχείριση αυτής της καινούργιας μέχρι στιγμής μεθόδου, θα μπορέσουν να αξιοποιηθούν τα οφέλη της για την προκατεργασία της λιγνινοκυτταρινούχου βιομάζας και να διερευνηθεί αν η μεταφορά θερμότητας με μικροκύματα επηρεάζει τη βιομάζα διαφορετικά από τη συμβατική μεταφορά θερμότητας σε χαρακτηριστικά όπως παράδειγμα η δομή της.

Σχετικά με την αφυδάτωση της φρουκτόζης σε HMF με τη χρήση όξινων ομοιογενών καταλυτών, δεδομένης της χαμηλότερης περιβαλλοντικής της επίδρασης και κόστους, αξίζει να μελετηθεί ως προς τη βελτιστοποίησή της ώστε να μπορέσει να ανταγωνιστεί άλλες περισσότερο αποδοτικές μεθόδους.

Τέλος, η βιοκαταλυτική μετατροπή του HMF που προέρχεται από λιγνινοκυτταρινούχο βιομάζα προς την παραγωγή χημικών προϊόντων υψηλής αξίας, αποτελεί ένα μεγάλο ανερχόμενο πεδίο έρευνας στο πλαίσιο της κυκλικής οικονομίας και της βιωσιμότητας. Μέχρι τώρα οι βιομηχανίες προσπαθούν να παράγουν FDCA, που αποτελεί ένα από τα σημαντικότερα παράγωγα του HMF για την εφαρμογή του ως υποκατάστατο του τереφθαλικού οξέος που χρησιμοποιείται για την παραγωγή PET, μέσω χημικών μεθόδων, καθώς οι βιοκαταλυτικές προσεγγίσεις παρουσιάζουν προβλήματα όπως χαμηλή παραγωγικότητα, χαμηλές συγκεντρώσεις υποστρώματος και εκτεταμένη κατανάλωση ενέργειας για διαχωρισμό και συγκέντρωση του προϊόντος σε μεταγενέστερα στάδια της διαδικασίας. Προκειμένου αυτές οι βιοτεχνολογικές διαδικασίες να μπορέσουν να χρησιμοποιηθούν σε βιομηχανική κλίμακα, θα πρέπει να διερευνηθεί η βελτίωση των ενζυμικών και μικροβιακών διαδικασιών με τη βελτιστοποίηση των θρεπτικών τους μέσων και συνθηκών, με την ανάπτυξη ενζύμων με πολλαπλά υποστρώματα και μέσω γενετικής και μεταβολικής μηχανικής [25,27,40].

Στο πλαίσιο αυτό αξίζει να μελετηθεί περαιτέρω η παραγωγή και ο χαρακτηρισμός της οξειδάσης της γαλακτόζης από τον *Fusarium oxysporum*, που δεν κατέστη εφικτό να ολοκληρωθεί στα πλαίσια αυτής της εργασίας, προκειμένου να διερευνηθεί η οξειδωτική της δράση στο HMF και οι αποδόσεις που έχει στα ενδιάμεσα προϊόντα DFF, HMFCA, FFCA και στο τελικό προϊόν FDCA. Είναι πιθανό να απαιτείται η προσθήκη και άλλου ενζύμου στην αντίδραση, όπως μιας καταλάσης, που θα αξιοποιεί το H₂O₂ που παράγεται από τη δράση της οξειδάσης και θα αυξάνει την απόδοση των οξειδωτικών προϊόντων του HMF.

Σε δεύτερο χρόνο θα ήταν σκόπιμο να ενταχθεί στη συνολική διεργασία και το ρεύμα της ημικυτταρίνης παράγοντας μέσω υδρόλυσης ξυλόζη και μέσω ισομερείωσης ξυλουλόζη για την παραγωγή φουρφουράλης, η οποία μπορεί επίσης να οξειδωθεί σε σημαντικές δομικές ενώσεις. Παράλληλα, αναμένεται να υπάρξει, όπως στην περίπτωση του HMF, μια πιο εκτενής μελέτη των ενζύμων που μπορούν να φέρουν σε πέρας την οξείδωση της φουρφουράλης.

Συνολικά, η παραγωγή δομικών χημικών ενώσεων (platform chemicals) από την αξιοποίηση της λιγνινοκυτταρινούχου βιομάζας με τη χρήση βιοκαταλυτικών μεθόδων και εκμετάλλευση όλων των ρευμάτων της διεργασίας, μπορεί να αποτελέσει μια ολοκληρωμένη «πράσινη» τεχνολογία εφαρμόσιμη βιομηχανικά στο εγγύς μέλλον.

Βιβλιογραφία

- [1] Dedes, G., Karnaouri, A., & Topakas, E. (2020). Novel routes in transformation of lignocellulosic biomass to furan platform chemicals: From pretreatment to enzyme catalysis. *Catalysts*, *10*(7), 743.
- [2] Taha, M., Foda, M., Shahsavari, E., Aburto-Medina, A., Adetutu, E., & Ball, A. (2016). Commercial feasibility of lignocellulose biodegradation: possibilities and challenges. *Current opinion in biotechnology*, *38*, 190-197.
- [3] Sukumaran, R. K., Singhanian, R. R., & Pandey, A. (2005). Microbial cellulases-production, applications and challenges.
- [4] Alvira, P., Tomás-Pejó, E., Ballesteros, M., & Negro, M. J. (2010). Pretreatment technologies for an efficient bioethanol production process based on enzymatic hydrolysis: a review. *Bioresource technology*, *101*(13), 4851-4861.
- [5] Saini, J. K., Saini, R., & Tewari, L. (2015). Lignocellulosic agriculture wastes as biomass feedstocks for second-generation bioethanol production: concepts and recent developments. *3 Biotech*, *5*(4), 337-353
- [6] Zhang, H., Han, L., & Dong, H. (2021). An insight to pretreatment, enzyme adsorption and enzymatic hydrolysis of lignocellulosic biomass: Experimental and modeling studies. *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, *140*, 110758.
- [7] Χριστακόπουλος, Π., Τόπακας, Ε., 2015. *Βιοτεχνολογική παραγωγή βιοκαυσίμων*. [ηλεκτρ. βιβλ.] Αθήνα: Σύνδεσμος Ελληνικών Ακαδημαϊκών Βιβλιοθηκών. Διαθέσιμο στο: <http://hdl.handle.net/11419/1721>
- [8] Ethaib, S., Omar, R., Kamal, S. M., & Biak, D. A. (2015). Microwave-assisted pretreatment of lignocellulosic biomass: a review. *Journal of Engineering Science and Technology*, *10*, 97-109.
- [9] Intanakul, P., Krairiksh, M., & Kitchaiya, P. (2003). Enhancement of enzymatic hydrolysis of lignocellulosic wastes by microwave pretreatment under atmospheric pressure. *Journal of wood chemistry and technology*, *23*(2), 217-225.
- [10] Puligundla, P., Oh, S. E., & Mok, C. (2016). Microwave-assisted pretreatment technologies for the conversion of lignocellulosic biomass to sugars and ethanol: a review. *Carbon letters*, *17*(1), 1-10.
- [11] Zabed, H., Sahu, J. N., Boyce, A. N., & Faruq, G. (2016). Fuel ethanol production from lignocellulosic biomass: an overview on feedstocks and technological approaches. *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, *66*, 751-774.
- [12] Huang, R., Qi, W., Su, R., & He, Z. (2010). Integrating enzymatic and acid catalysis to convert glucose into 5-hydroxymethylfurfural. *Chemical Communications*, *46*(7), 1115-1117.
- [13] Limayem, A., & Ricke, S. C. (2012). Lignocellulosic biomass for bioethanol production: current perspectives, potential issues and future prospects. *Progress in energy and combustion science*, *38*(4), 449-467.

- [14] Katsimpouras, C., Kalogiannis, K. G., Kalogianni, A., Lappas, A. A., & Topakas, E. (2017). Production of high concentrated cellulosic ethanol by acetone/water oxidized pretreated beech wood. *Biotechnology for biofuels*, 10(1), 1-16.
- [15] Katsimpouras, C., Dedes, G., Bistis, P., Kekos, D., Kalogiannis, K. G., & Topakas, E. (2018). Acetone/water oxidation of corn stover for the production of bioethanol and prebiotic oligosaccharides. *Bioresource technology*, 270, 208-215.
- [16] Liu, C., Carraher, J. M., Swedberg, J. L., Herndon, C. R., Fleitman, C. N., & Tessonier, J. P. (2014). Selective base-catalyzed isomerization of glucose to fructose. *Acs Catalysis*, 4(12), 4295-4298.
- [17] Moreau, C., Durand, R., Roux, A., & Tichit, D. (2000). Isomerization of glucose into fructose in the presence of cation-exchanged zeolites and hydrotalcites. *Applied Catalysis A: General*, 193(1-2), 257-264.
- [18] Yang, Q., Sherbahn, M., & Runge, T. (2016). Basic amino acids as green catalysts for isomerization of glucose to fructose in water. *ACS Sustainable Chemistry & Engineering*, 4(6), 3526-3534.
- [19] Yoo, C. G., Li, N., Swannell, M., & Pan, X. (2017). Isomerization of glucose to fructose catalyzed by lithium bromide in water. *Green Chemistry*, 19(18), 4402-4411.
- [20] Marianou, A. A., Michailof, C. M., Ipsakis, D. K., Karakoulia, S. A., Kalogiannis, K. G., Yiannoulakis, H., ... & Lappas, A. A. (2018). Isomerization of glucose into fructose over natural and synthetic MgO catalysts. *ACS Sustainable Chemistry & Engineering*, 6(12), 16459-16470.
- [21] Delidovich, I., & Palkovits, R. (2016). Fructose production via extraction-assisted isomerization of glucose catalyzed by phosphates. *Green Chemistry*, 18(21), 5822-5830.
- [22] Dijkman, W. P., Groothuis, D. E., & Fraaije, M. W. (2014). Enzyme-catalyzed oxidation of 5-hydroxymethylfurfural to furan-2, 5-dicarboxylic acid. *Angewandte Chemie International Edition*, 53(25), 6515-6518.
- [23] Silvianti, F., Maniar, D., Boetje, L., & Loos, K. (2020). Green Pathways for the Enzymatic Synthesis of Furan-Based Polyesters and Polyamides. In *Sustainability & Green Polymer Chemistry Volume 2: Biocatalysis and Biobased Polymers* (pp. 3-29). American Chemical Society.
- [24] McKenna, S. M., Leimkühler, S., Herter, S., Turner, N. J., & Carnell, A. J. (2015). Enzyme cascade reactions: synthesis of furandicarboxylic acid (FDCA) and carboxylic acids using oxidases in tandem. *Green Chemistry*, 17(6), 3271-3275.
- [25] Lalanne, L., Nyanhongo, G. S., Guebitz, G. M., & Pellis, A. (2021). Biotechnological production and high potential of furan-based renewable monomers and polymers. *Biotechnology Advances*, 107707.
- [26] Sousa, A. F., Vilela, C., Fonseca, A. C., Matos, M., Freire, C. S., Gruter, G. J. M., ... & Silvestre, A. J. (2015). Biobased polyesters and other polymers from 2, 5-furandicarboxylic acid: a tribute to furan excellency. *Polymer chemistry*, 6(33), 5961-5983.
- [27] Rajesh, R. O., Godan, T. K., Sindhu, R., Pandey, A., & Binod, P. (2020). Bioengineering advancements, innovations and challenges on green synthesis of 2, 5-furan dicarboxylic acid. *Bioengineered*, 11(1), 19-38.

- [28] Wen, M., Zhang, X. Y., Zong, M. H., & Li, N. (2020). Significantly improved oxidation of bio-based furans into furan carboxylic acids using substrate-adapted whole cells. *Journal of Energy Chemistry*, *41*, 20-26.
- [29] Wu, S., Liu, Q., Tan, H., Zhang, F., & Yin, H. (2020). A novel 2, 5-furandicarboxylic acid biosynthesis route from biomass-derived 5-hydroxymethylfurfural based on the consecutive enzyme reactions. *Applied biochemistry and biotechnology*, *191*(4), 1470-1482.
- [30] Krystof, M., Pérez-Sánchez, M., & Domínguez de María, P. (2013). Lipase-Mediated Selective Oxidation of Furfural and 5-Hydroxymethylfurfural. *ChemSusChem*, *6*(5), 826-830.
- [31] Carro, J., Ferreira, P., Rodríguez, L., Prieto, A., Serrano, A., Balcells, B., ... & Martínez, A. T. (2015). 5-hydroxymethylfurfural conversion by fungal aryl-alcohol oxidase and unspecific peroxygenase. *The FEBS journal*, *282*(16), 3218-3229.
- [32] Serrano, A., Calviño, E., Carro, J., Sánchez-Ruiz, M. I., & Martínez, A. T. (2019). Complete oxidation of hydroxymethylfurfural to furandicarboxylic acid by aryl-alcohol oxidase. *Biotechnology for biofuels*, *12*(1), 1-12.
- [33] Qin, Y. Z., Li, Y. M., Zong, M. H., Wu, H., & Li, N. (2015). Enzyme-catalyzed selective oxidation of 5-hydroxymethylfurfural (HMF) and separation of HMF and 2, 5-diformylfuran using deep eutectic solvents. *Green Chemistry*, *17*(7), 3718-3722.
- [34] Karich, A., Kleeberg, S. B., Ullrich, R., & Hofrichter, M. (2018). Enzymatic preparation of 2, 5-furandicarboxylic acid (FDCA)—a substitute of terephthalic acid—by the joined action of three fungal enzymes. *Microorganisms*, *6*(1), 5.
- [35] Daou, M., Yassine, B., Wikee, S., Record, E., Duprat, F., Bertrand, E., & Faulds, C. B. (2019). *Pycnoporus cinnabarinus* glyoxal oxidases display differential catalytic efficiencies on 5-hydroxymethylfurfural and its oxidized derivatives. *Fungal biology and biotechnology*, *6*(1), 1-15.
- [36] Mathieu, Y., Offen, W. A., Forget, S. M., Ciano, L., Viborg, A. H., Blagova, E., ... & Brumer, H. (2020). Discovery of a fungal copper radical oxidase with high catalytic efficiency toward 5-hydroxymethylfurfural and benzyl alcohols for bioprocessing. *ACS Catalysis*, *10*(5), 3042-3058.
- [37] Birmingham, W., Pedersen, A. T., Gomes, M. D., Madsen, M. B., Breuer, M., Woodley, J., & Turner, N. J. (2020). Biocatalytic conversion of 5-hydroxymethylfurfural by galactose oxidase: Toward scalable technology using integrated process and enzyme engineering.
- [38] Hwang, K. R., Jeon, W., Lee, S. Y., Kim, M. S., & Park, Y. K. (2020). Sustainable bioplastics: Recent progress in the production of bio-building blocks for the bio-based next-generation polymer PEF. *Chemical engineering journal*, *390*, 124636.
- [39] Rajesh, R. O., Pandey, A., & Binod, P. (2018). Bioprocesses for the production of 2, 5-furandicarboxylic acid. In *Biosynthetic technology and environmental challenges* (pp. 127-141). Springer, Singapore.
- [40] Xia, H., Xu, S., Hu, H., An, J., & Li, C. (2018). Efficient conversion of 5-hydroxymethylfurfural to high-value chemicals by chemo-and bio-catalysis. *RSC advances*, *8*(54), 30875-30886.

- [41] Saikia, K., Rathankumar, A. K., Kumar, P. S., Varjani, S., Nizar, M., Lenin, R., ... & Vaidyanathan, V. K. (2021). Recent advances in biotransformation of 5-Hydroxymethylfurfural: challenges and future aspects. *Journal of Chemical Technology & Biotechnology*.
- [42] Dedes, G., Karnaouri, A., Marianou, A. A., Kalogiannis, K. G., Michailof, C. M., Lappas, A. A., & Topakas, E. (2021). Conversion of organosolv pretreated hardwood biomass into 5-hydroxymethylfurfural (HMF) by combining enzymatic hydrolysis and isomerization with homogeneous catalysis. *Biotechnology for biofuels*, 14(1), 1-11.
- [43] Karnaouri, A., Muraleedharan, M. N., Dimarogona, M., Topakas, E., Rova, U., Sandgren, M., & Christakopoulos, P. (2017). Recombinant expression of thermostable processive Mt EG5 endoglucanase and its synergism with Mt LPMO from *Myceliophthora thermophila* during the hydrolysis of lignocellulosic substrates. *Biotechnology for biofuels*, 10(1), 1-17.
- [44] Wang, W., Mittal, A., Pilath, H., Chen, X., Tucker, M. P., & Johnson, D. K. (2019). Simultaneous upgrading of biomass-derived sugars to HMF/furfural via enzymatically isomerized ketose intermediates. *Biotechnology for biofuels*, 12(1), 1-9.
- [45] Román-Leshkov, Y., & Dumesic, J. A. (2009). Solvent effects on fructose dehydration to 5-hydroxymethylfurfural in biphasic systems saturated with inorganic salts. *Topics in Catalysis*, 52(3), 297-303.
- [46] Zhao, P., Zhang, Y., Wang, Y., Cui, H., Song, F., Sun, X., & Zhang, L. (2018). Conversion of glucose into 5-hydroxymethylfurfural catalyzed by acid–base bifunctional heteropolyacid-based ionic hybrids. *Green Chemistry*, 20(7), 1551-1559.
- [47] Zhang, K., Pei, Z., & Wang, D. (2016). Organic solvent pretreatment of lignocellulosic biomass for biofuels and biochemicals: a review. *Bioresource technology*, 199, 21-33.
- [48] Borand, M. N., & Karaosmanoğlu, F. (2018). Effects of organosolv pretreatment conditions for lignocellulosic biomass in biorefinery applications: a review. *Journal of Renewable and Sustainable Energy*, 10(3), 033104.
- [49] Kumar, P., Barrett, D. M., Delwiche, M. J., & Stroeve, P. (2009). Methods for pretreatment of lignocellulosic biomass for efficient hydrolysis and biofuel production. *Industrial & engineering chemistry research*, 48(8), 3713-3729.
- [50] Ordonsky, V. V., van der Schaaf, J., Schouten, J. C., & Nijhuis, T. A. (2012). Fructose dehydration to 5-hydroxymethylfurfural over solid acid catalysts in a biphasic system. *ChemSusChem*, 5(9), 1812-1819.
- [51] Shaikh, M., Singh, S. K., Khilari, S., Sahu, M., & Ranganath, K. V. (2018). Graphene oxide as a sustainable metal and solvent free catalyst for dehydration of fructose to 5-HMF: a new and green protocol. *catalysis communications*, 106, 64-67.
- [52] Testa, M. L., Miroddi, G., Russo, M., La Parola, V., & Marci, G. (2020). Dehydration of fructose to 5-HMF over acidic TiO₂ catalysts. *Materials*, 13(5), 1178.
- [53] Antonetti, C., Melloni, M., Licursi, D., Fulignati, S., Ribechini, E., Rivas, S., ... & Galletti, A. M. R. (2017). Microwave-assisted dehydration of fructose and inulin to HMF catalyzed by niobium and zirconium phosphate catalysts. *Applied Catalysis B: Environmental*, 206, 364-377.

- [54] Zhao, Y., Lu, K., Xu, H., Zhu, L., & Wang, S. (2021). A critical review of recent advances in the production of furfural and 5-hydroxymethylfurfural from lignocellulosic biomass through homogeneous catalytic hydrothermal conversion. *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, 139, 110706.
- [55] Dai, J., Zhu, L., Tang, D., Fu, X., Tang, J., Guo, X., & Hu, C. (2017). Sulfonated polyaniline as a solid organocatalyst for dehydration of fructose into 5-hydroxymethylfurfural. *Green Chemistry*, 19(8), 1932-1939.
- [56] Karimi, B., & Mirzaei, H. M. (2013). The influence of hydrophobic/hydrophilic balance of the mesoporous solid acid catalysts in the selective dehydration of fructose into HMF. *RSC Advances*, 3(43), 20655-20661.