



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

## **Διπλωματική Εργασία**

«Αξιοποίηση λιγνινοκυτταρινούχου βιομάζας για την παραγωγή φρουκτόζης και μονομερών παραγωγών του φουρανίου»

**Σταυρωτή Γιαννάκου**

Επιβλέπων Καθηγητής: Ευάγγελος Τόπακας

**ΑΘΗΝΑ 2023**



# Ευχαριστίες

Η παρούσα διπλωματική εκπονήθηκε στο Εργαστήριο Βιοτεχνολογίας, της Σχολής Χημικών Μηχανικών, του Εθνικού Μετσόβιο Πολυτεχνείου στα πλαίσια της ολοκλήρωσης του κύκλου σπουδών μου στη σχολή.

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 εμβαθύνω τις γνώσεις μου στον τομέα της Βιοτεχνολογίας. Επίσης, τον ευχαριστώ πολύ για το ενδιαφέρον του με το οποίο μας εισήγαγε στον κόσμο της Βιοτεχνολογίας κατά τη διάρκεια των φοιτητικών χρόνων και για την καθοδήγηση και τα ερεθίσματα που μας έδωσε, σε συνδυασμό με το ευρύ φάσμα γνώσεων που κατέχει, γεγονός που αποτέλεσε έμπνευση για εμένα να ακολουθήσω αυτήν την κατεύθυνση και να εκπονήσω την διπλωματική μου στο Εργαστήριο Βιοτεχνολογίας.

Ακόμη, θα ήθελα να ευχαριστήσω ιδιαίτερα τον υποψήφιο διδάκτορα του Ε.Μ.Π Γρηγόριο Δέδε για την καθοδήγηση, την εμπειρογνωμοσύνη και την υποστήριξή του κατά την εκπόνηση της διπλωματικής μου εργασίας. Οι συμβουλές και οι συζητήσεις μαζί του με βοήθησαν να διεκρινώ το πεδίο των γνώσεων μου και να αναπτύξω μια βαθύτερη κατανόηση του θέματος, καθώς και να γνωρίσω ένα πλήρως λειτουργικό εργαστήριο. Εκτός από της επιστημονικές γνώσεις που μου παρείχε, τον ευχαριστώ για το φιλικό, αισιόδοξο και υποστηρικτικό κλίμα που δημιούργησε, το οποίο έκανε την εμπειρία μου στο εργαστήριο ακόμα πιο ευχάριστη.

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

Τέλος, θα ήθελα να ευχαριστήσω τους φίλους μου για την αμέριστη υποστήριξη και την κατανόησή τους καθ' όλη τη διάρκεια των φοιτητικών μου χρόνων, ιδιαίτερα κατά τη διάρκεια εκπόνησης της διπλωματικής μου εργασίας. Αλλά και για τις όμορφες αναμνήσεις που δημιουργήσαμε αυτά τα χρόνια.

## Περίληψη

Σκοπός της παρούσας διπλωματικής εργασίας είναι η αξιοποίηση της λιγνινοκυτταρινούχου βιομάζας για την βιοκαταλυτική παραγωγή φρουκτόζης και μονομερών ενώσεων παραγωγών των φουρανίων.

Αρχικά, στο πρώτο μέρος μελετήθηκε η προκατεργασία στελεχών αραβοσίτου με τη χρήση μικροκυμάτων και αντιστάσεων σε διαφορετικές θερμοκρασίες και χρόνους, αλλά και διαλύτες. Ακολούθησαν σειρές πειραμάτων ενζυμικής υδρόλυσης της βιομάζας σε μικρή κλίμακα. Στην αρχή μελετήθηκε η προκατεργασία στελεχών αραβοσίτου με τη χρήση μικροκυμάτων και αντιστάσεων σε θερμοκρασία 150°C, με διαλύτη νερό-αιθανόλη σε αναλογία 50:50 και μέτρηση της γλυκόζης στις 24 και 72 h. Επιπλέον, επιχειρήθηκε να προκατεργαστούν στελέχη αραβοσίτου με τη χρήση μικροκυμάτων και αντιστάσεων, με διαλύτη νερό-αιθανόλη σε αναλογία 50:50, σε διαφορετικές θερμοκρασίες και σε διαφορετικούς χρόνους προκατεργασίας.

Ακόμη, στην παρούσα εργασία επιχειρήθηκε η προκατεργασία στελεχών αραβοσίτου με αντιστάσεις και μικροκύματα σε διαφορετικούς χρόνους προκατεργασίας και χρόνο προ-επάσης και προσθήκη οξικού οξέος στους διαλύτες, λόγω του ότι δεν ήταν εφικτή η περαιτέρω αύξηση της θερμοκρασίας. Η υψηλότερη απόδοση σε γλυκόζη, 18,7 g/L, επιτυγχάνεται στην προκατεργασία με αντιστάσεις στους 150 °C και για χρόνο προκατεργασίας 90 min, χωρίς προ-επάση και με συγκέντρωση οξικού οξέος 2,5%. Για την προκατεργασία με αντιστάσεις με την αύξηση του χρόνου προκατεργασίας και την προσθήκη οξικού οξέος αυξάνεται η απόδοση σε γλυκόζη, συγκεκριμένα για 1,5 % σημειώνεται η βέλτιστη τιμή, 18,3 g/L.

Στη συνέχεια, 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 τα υλικά οξιάς που είχαν προκατεργαστεί με ισοβουτανόλη σε υψηλότερη θερμοκρασία 175 και 160°C για 120 min παρουσίασαν τις υψηλότερες μετατροπές κυτταρίνης σε γλυκόζη (95,1% και 81,2%, αντίστοιχα) με παραγωγή 70,5 g και 56,6 g φρουκτόζης ανά 100 g προκατεργασμένης βιομάζας, αντίστοιχα. Ακόμα, η προκατεργασία στην υψηλή θερμοκρασία των 175°C για 120 min με χρήση ισοβουτανόλης σε υλικά από πεύκο, επέφερε και αυτή υψηλή μετατροπή κυτταρίνης σε γλυκόζη (73,1%) και παραγωγή 53,4 g φρουκτόζης ανά 100 g προκατεργασμένης βιομάζας. Επιπλέον, τα υλικά που είχαν προκατεργαστεί με καταλύτες εμφάνισαν μικρότερη απόδοση από αυτά που στην προκατεργασία απουσίαζε καταλύτη. Η βέλτιστη απόδοση στα υλικά με καταλύτη επιτεύχθηκε σε αυτό που είχε προκατεργαστεί με καταλύτη POM, με 54,7% μετατροπή κυτταρίνης σε γλυκόζη και παραγωγή 30,7 g φρουκτόζης ανά 100 g προκατεργασμένης βιομάζας.

Στο δεύτερο μέρος της εργασίας, επιλέχθηκε να μελετηθεί για την οξειδωτική της δράση στο HMF η οξειδάση της γαλακτόζης. Η οξειδάση της γαλακτόζης ανήκει στην οικογένεια AA5 της CAZy βάσης δεδομένων και τυπικά δρα σε γαλακτόζη. Το γονίδιο που εκφράζει την οξειδάση της γαλακτόζης εισήχθη στον ζυμομύκητα *Pichia pastoris*. Το μετασχηματισμένο στέλεχος *P. Pastoris* αναπτύχθηκε σε στερεό και στη συνέχεια σε υγρό μέσο. Έπειτα, απομονώθηκε η οξειδάση της γαλακτόζης μέσω φυγοκέντρησης, φιλτραρίσματος με μοριακά φίλτρα υπό κενό και τελικά υπερδιήθησης με χρήση μοριακών φίλτρων. Ακολούθησε χρωματογραφία συγγένειας για την ολοκλήρωση της απομόνωσης του ενζύμου. Προκειμένου να πιστοποιηθεί ότι το ένζυμο που απομονώθηκε ήταν η οξειδάση της γαλακτόζης εφαρμόστηκε η Ηλεκτροφόρηση Πρωτεϊνών σε πήκτωμα Πολυακρυλαμιδίου υπό Αποδιατακτικές Συνθήκες SDS-Page gel και επιβεβαιώθηκε το μοριακό βάρος 68 kDa.

Ακολούθως, πραγματοποιήθηκε ο προσδιορισμός του βέλτιστου pH και θερμοκρασίας δράσης του ενζύμου χρησιμοποιώντας ως υπόστρωμα τη γαλακτόζη 50 mM. Συγκεκριμένα, το ένζυμο οξειδάση της γαλακτόζης εμφάνισε βέλτιστη δράση σε pH=6,0 και T= 40 °C σε ρυθμιστικό διάλυμα φωσφορικών καλίου (Potassium phosphate buffer).

Τέλος, πραγματοποιήθηκαν οι αντιδράσεις της οξειδάση της γαλακτόζης με το HMF αλλά και άλλα φουράνια, όπως DFF, HMFCA, FFCA και FDCA. Προέκυψε το συμπέρασμα ότι η οξειδάση της γαλακτόζης μπορεί να οξειδώσει τα φουράνια, αφού εμφάνισε ενεργότητα στο HMF, οξειδώνοντας το μέχρι την παραγωγή του DFF και HMFCA, χωρίς να συνεχίζεται περαιτέρω η αντίδραση προς παραγωγή FDCA.

## Abstract

The purpose of this thesis is the utilization of lignocellulosic biomass for the biocatalytic production of fructose and monomeric compounds of furan derivatives.

Initially, in the first part, the pretreatment of corn stover was studied using microwave and resistive heating at different temperatures and times, as well as different solvents. This was followed by enzymatic hydrolysis experiments on a small scale. At the beginning, the pretreatment of corn stover was studied using microwaves and resistors at a temperature of 150°C, with a water-ethanol solvent in a ratio of 50:50 and glucose concentration was measured at 24 and 72 h. Also, it was attempted to pretreat corn stover using microwaves and resistors, with a 50:50 water-ethanol solvent, at different temperatures and at different pre-treatment times.

Also, in the present work, the pretreatment of corn stover with resistors and microwaves at different pretreatment times and pre-incubation time and addition of acetic acid to the solvents was attempted, due to the fact that further temperature increase was not possible. The highest glucose yield, 18.7 g/L, is obtained in the pre-treatment with resistors at 150 °C and for a pre-treatment time of 90 min, without pre-incubation and with an acetic acid concentration of 2.5%. For pretreatment with resistive heating, an increased pretreatment time and adding acetic acid increases the glucose yield, specifically for 1.5%, with the optimum value being 18.3 g/L.

Then, the efficiency of the mild oxidative pretreatment of lignocellulosic materials with organic solvents was studied in terms of the use of different solvents, catalysts and different conditions. For this reason, enzymatic hydrolysis experiments were first carried out in order to produce glucose from the cellulose of the materials, and then enzymatic isomerization experiments so that the produced glucose could be converted into fructose. Based on the results of these experiments, the pretreated materials were compared, and the efficiency of each pretreatment was evaluated. Specifically, among the pretreated materials, the oak materials pretreated with isobutanol at higher temperatures of 175 and 160°C for 120 minutes showed the highest cellulose conversion to glucose (95.1% and 81.2% respectively), with a production of 70.5 g and 56.6 g of fructose per 100 g of pre-processed biomass, respectively. Furthermore, the pretreatment at the high temperature of 175°C for 120 min using isobutanol in pine materials also resulted in a high conversion of cellulose to glucose (73.1%) and production of 53.4 g of fructose per 100 g of pretreated biomass. Additionally, materials pretreated with catalysts showed lower yields compared to those without a catalyst. The optimum yield in materials with a catalyst was achieved with the POM catalyst, with a 54.7% cellulose conversion to glucose and a production of 30.7 g of fructose per 100 g of pretreated biomass.

In the second part of the study, galactose oxidase was chosen to be studied for its oxidative activity in HMF. Galactose oxidase belongs to the AA5 family of the CAZy database and typically acts on galactose. The gene expressing galactose oxidase was introduced into the yeast *Pichia pastoris*. The transformed *P. pastoris* strain was grown on a solid and then on liquid medium. Galactose oxidase was then isolated by centrifugation, filtration using molecular filters under vacuum, and finally molecular filter ultrafiltration. Metal Affinity Chromatography followed to complete the isolation of the enzyme.

To confirm that the enzyme isolated was galactose oxidase, Protein Electrophoresis was performed on a SDS-Page gel under denaturing SDS-Page gel conditions and a molecular weight of 68 kDa was confirmed.

Subsequently, the determination of the optimal pH and temperature of the enzyme was carried out using 50 mM galactose as a substrate. Specifically, the enzyme galactose oxidase showed optimal activity at pH=6.0 and T= 40 °C in potassium phosphate buffer.

Finally, the reactions of galactose oxidase with HMF and other furans, such as DFF, HMFCa, FFCA and FDCA, were carried out. It was concluded that galactose oxidase can oxidize furans, since it showed activity on HMF, oxidizing it to the production of DFF and HMFCa, without continuing the reaction further to produce FDCA.

## Περιεχόμενα

2.1. Λιγνινοκυτταρινούχος βιομάζα .....	12
2.1.1 ΕΙΣΑΓΩΓΙΚΑ .....	12
2.1.2 Πηγές Λιγνινοκυτταρινούχου Βιομάζας .....	13
2.1.3 Λιγνοκυτταρινούχος βιομάζα .....	15
2.1.4 Κυτταρίνη .....	16
2.1.5 Ημικυτταρίνη .....	17
2.1.6 Λιγνίνη.....	17
2.2 Προκατεργασία λιγνινοκυτταρινούχου βιομάζας .....	18
2.2.1 Φυσικές προκατεργασίες .....	19
2.2.1.1 Μηχανική προκατεργασία .....	19
2.2.1.2 Προκατεργασία με μικροκύματα.....	20
2.2.1.3 Προκατεργασία με Υπερήχους (Ultrasound) .....	22
2.2.1.4 Προκατεργασία με συνδυασμό μικροκυμάτων και υπερήχων .....	23
2.2.1.5 Προκατεργασία με ακτίνες γ (Gamma ray) .....	23
2.2.2 Φυσικοχημική προκατεργασία.....	23
2.2.2.1 Προκατεργασία με έκρηξη ατμού (steam explosion, SE) .....	23
2.2.2.2 Υδροθερμική προκατεργασία .....	25
2.2.2.3 Προκατεργασία με έκρηξη αμμωνίας (Ammonia Fiber Explosion AFEX) .....	25
2.2.2.4 Προκατεργασία με έκρηξη του διοξειδίου του άνθρακα.....	26
2.2.3 Χημικές προκατεργασίες .....	26
2.2.3.1 Προκατεργασία με οργανικό διαλύτη (Organosolv Process) .....	27
2.2.3.2 Οζονόλυση .....	28
2.2.3.3 Όξινη υδρόλυση.....	28
2.2.3.4 Ήπια όξινη υδρόλυση .....	29
2.2.3.5 αλκαλική υδρόλυση.....	29
2.2.3.6 Προκατεργασία με χρήση ιοντικών υγρών.....	30
2.2.4 Βιολογικές προκατεργασίες.....	31
2.2.5 Άλλες μέθοδοι.....	31
2.2.5.1 Πυρόλυση .....	31
2.2.5.2 Οξειδωτική απολιγνιτοποίηση.....	31
2.2.5.3 Προκατεργασία με παλμικά ηλεκτρικά πεδία .....	32
2.2.5.4 Διαλυτόλυση με τη βοήθεια μικροκυμάτων(Microwave-assisted solvolysis).....	32



2.2.5.5	Πυρόλυση με τη βοήθεια μικροκυμάτων (Microwave-assisted pyrolysis) .....	33
2.2.5.6	Προκατεργασία με Ακτινοβολία δέσμης ηλεκτρονίων (Electron beam irradiation) .....	33
2.2.5.7	Προκατεργασία με Υψηλή υδροστατική πίεση (High hydrostatic pressure HHP) .....	33
2.2.5.8	Προκατεργασία με ομογενοποίηση υπό υψηλή πίεση (High-pressure homogenization HPH) .....	34
2.2.6	Σύνοψη.....	34
2.3	Υδρόλυση .....	36
2.3.1	Ενζυμική υδρόλυση .....	36
2.3.2	Όξινη υδρόλυση.....	38
2.3.2.1	Όξινη υδρόλυση με αραιό οξύ.....	39
2.3.2.2	Όξινη υδρόλυση με πυκνό οξύ .....	39
3.1	Ενζυμική ισομερείωση γλυκόζης προς παραγωγή φρουκτόζης.....	39
3.2	Χημική αφυδάτωση φρουκτόζης προς σχηματισμό 5-υδροξυμεθυλοφουρφουράλης (HMF) .....	41
3.3	Ενζυμική μετατροπή των φουρανίων σε δομικές ενώσεις (building blocks) για τη σύνθεση πολυμερών ..	42
3.4	Παράγωγα των φουρανίων .....	45
3.5	2,5-φουρανοδικαρβοξυλικό οξύ (FDCA).....	46
3.5.1	Κλασσικοί τρόποι σύνθεσης του 2,5-φουρανοδικαρβοξυλικού οξέος (FDCA) .....	46
3.5.2	Οξειδωτικές αντιδράσεις του HMF και παραγωγή του 2,5-φουρανοδικαρβοξυλικού οξέος (FDCA) ...	47
3.5.2.1	Ένζυμα της οικογένειας Auxiliary Activity Family 5 (AA5) .....	49
3.5.3	Εφαρμογές του 2,5-φουρανοδικαρβοξυλικού οξέος (FDCA) .....	52
3.5.4	Εφαρμογές άλλων παραγώγων ενώσεων του HMF .....	54
4.	Πειραματικό μέρος .....	56
4.1	Υλικά και στήλες Χρωματογραφίας .....	56
4.2	<i>Pichia Pastoris</i> .....	56
4.3	Εμπορικά ένζυμα .....	56
4.4	Ρυθμιστικά διαλύματα .....	57
4.4.1	Ρυθμιστικό διάλυμα φωσφορικών-κιτρικών (Citrate phosphate buffer) .....	57
4.4.2	Ρυθμιστικό διάλυμα φωσφορικών καλίου (Potassium phosphate buffer).....	57
4.4.3	Ρυθμιστικό διάλυμα Γλυκίνης -υδροξείδιο του νατρίου (NaOH).....	58
4.5	Χημικά αντιδραστήρια.....	58
4.6	Συσκευές και όργανα .....	59
4.7	Παραγωγή οξειδάσης της γαλακτόζης από τον ζυμομύκητα <i>Pichia pastoris</i> .....	59
4.7.1	Ανάπτυξη του μετασχηματισμένου μικροοργανισμού σε τρυβλία .....	60
4.7.2	Προκαλλιέργεια .....	60
4.7.3	Καλλιέργεια.....	62

4.7.4 Απομόνωση ενζύμου .....	64
4.7.5 Φυγοκέντρωση .....	64
4.7.6 Φιλτράρισμα .....	64
4.7.7 Αλλαγή ρυθμιστικού διαλύματος (Dialysis).....	66
4.7.8 Χρωματογραφία συγγένειας (TALON Metal Affinity Chromatography).....	67
4.8 Bradford .....	69
4.9 Δοκιμασία προσδιορισμού ενεργότητας ενζύμου (Enzyme Assay) .....	69
4.10 Συμπύκνωση .....	70
4.11 Ηλεκτροφόρηση Πρωτεϊνών σε πήκτωμα Πολυακρυλαμιδίου υπό Αποδιατακτικές Συνθήκες SDS-Page gel (sodium dodecyl sulfate–polyacrylamide gel electrophoresis).....	72
4.12 Εύρεση βέλτιστων συνθηκών δράσης του απομονωμένου ενζύμου της οξειδάσης της γαλακτόζης....	75
4.13 Υγρή χρωματογραφία υψηλής απόδοσης (HPLC, High Performance Liquid Chromatography) .....	76
4.13.1 Διαλύτης της Υγρής χρωματογραφίας υψηλής απόδοσης (HPLC) .....	77
4.13.2 Προκατεργασία δειγμάτων.....	77
4.14 Εύρεση Βέλτιστης Θερμοκρασίας Δράσης .....	78
4.15 Εύρεση βέλτιστου χρόνου αντίδρασης (Time course) .....	78
4.16 ΠΡΟΚΑΤΕΡΓΑΣΙΕΣ .....	79
4.16.1 Σκοπός.....	79
4.16.2 Προκατεργασία λιγνινοκυτταρινούχων υλικών με τη χρήση μικροκυμάτων και οργανικών διαλυτών .....	79
4.16.3 Προκατεργασία λιγνινοκυτταρινούχων υλικών με τη χρήση αντιστάσεων και οργανικών διαλυτών .....	81
4.17 Ενζυμική υδρόλυση προκατεργασμένων λιγνινοκυτταρινούχων υλικών.....	81
4.18 Μέτρηση γλυκόζης με τη μέθοδο Glucotest .....	83
4.19 Καμπύλες αναφοράς γλυκόζης.....	83
4.20 Ενζυμική ισομερείωση γλυκόζης προς παραγωγή φρουκτόζης.....	83
5. Αποτελέσματα – Σχολιασμός.....	85
5.1 Προκατεργασία και υδρόλυση υλικών με μικροκύματα και παραδοσιακή προκατεργασία με αντιστάσεις .....	85
5.1.1 Μελέτη υδρόλυσης στις 24 και 72 h σε προκατεργασμένα υλικά με μικροκύματα και αντιστάσεις.....	85
5.1.2 Σύγκριση προκατεργασίας υλικών με μικροκύματα και παραδοσιακή προκατεργασία με αντιστάσεις παρουσία οξικού οξέος .....	88
5.2 Υδρολύσεις και ισομερειώσεις προκατεργασμένων υλικών με χρήση ήπιας οξειδωτικής προκατεργασίας και οργανικών διαλυτών.....	90

5.2.1 Προκατεργασία υλικών από πεύκο με διαφορετικούς διαλύτες (ισοβουτανόλη, αιθανόλη, ακετόνη, τετραϋδροφουράνιο).....	91
5.2.2 Προκατεργασία υλικών από οξιά με διαλύτη ισοβουτανόλη .....	94
5.2.3 Προκατεργασμένα υλικά από οξιά με χρήση ή μη καταλυτών και διαφορετικά είδη καταλυτών ...	96
5.2.4 Συνολικά- Σύνοψη.....	99
5.3 Οξειδάση της γαλακτόζης .....	102
5.3.1 Πρωτεϊνική συγκέντρωση .....	102
5.3.2 Αξιολόγηση καθαρότητας του ενζύμου από το αποτέλεσμα της ηλεκτροφόρησης σε πηκτή πολυακρυλαμιδίου υπό αποδιατακτικές συνθήκες .....	102
5.3.3 Προσδιορισμός της βέλτιστης θερμοκρασίας δράσης της οξειδάσης της γαλακτόζης .....	103
5.3.4 Προσδιορισμός του βέλτιστου pH της οξειδάσης της γαλακτόζης .....	104
5.3.5 Αντιδράσεις της οξειδάσης της γαλακτόζης με φουράνια .....	105
6. Συμπεράσματα.....	108
7. Μελλοντικές προτάσεις .....	112
7. Βιβλιογραφία .....	113

## 2.1. Λιγνινοκυτταρινούχος βιομάζα

### 2.1.1 ΕΙΣΑΓΩΓΙΚΑ

Οι χώρες αναπτύσσονται συνεχώς και παγκόσμιος πληθυσμός αυξάνεται, αντίστοιχα αυξάνεται η παγκόσμια ζήτηση για καύσιμα και χημικά. Τα καύσιμα και τα χημικά παράγονται από πρώτες ύλες που βασίζονται σε ορυκτά καύσιμα. Γεγονός που προκαλεί περιβαλλοντικά προβλήματα, όπως εκπομπές αερίων θερμοκηπίου (GHG) και εξάντληση ορυκτών καυσίμων (Kim et al., 2020). Μέχρι τώρα η οικονομία ήταν βασισμένη στο να παράγει ότι χρειάζεται να καταναλώσει. Τον 21ο αιώνα η βιοοικονομία επιβάλλει την επαναχρησιμοποίηση και ανάκτηση των πόρων ώστε να επιτευχθεί οικονομική ευημερία αλλά και οικολογική επιβίωση. Η αξιοποίηση της λιγνοκυτταρινούχου βιομάζας, εφόσον προέρχεται από υπολείμματα της αγροτικής βιομηχανίας και της βιομηχανίας τροφίμων, αποτελεί σημαντική εφαρμογή της κυκλική οικονομίας (Hassan et al., 2018). Διότι οι τεράστιες ποσότητες της λιγνοκυτταρινούχου βιομάζας που απορρίπτονται κάθε χρόνο θα μπορούσαν ενδεχομένως να μετατραπούν σε ποικίλα προϊόντα και βιοκαύσιμα μέσω της αξιοποίησής της με την προσέγγιση του βιοδιυλιστηρίου. Βιοδιυλιστήριο είναι μια βιώσιμη μονάδα όπου εφαρμόζονται διάφορες τεχνολογίες μετασχηματισμό της βιομάζας, όπως η θερμοχημική, η βιοχημική και η χρήση μικροοργανισμών, για την παραγωγή βιοκαυσίμων, χημικών ουσιών, ενέργειας και προϊόντων προστιθέμενης αξίας. Σε ένα βιοδιυλιστήριο μέσω υδρόλυσης, ζύμωσης και απομόνωσης μπορούν να αναπτυχθούν διαφορετικά τελικά προϊόντα όπως βιοπολυμερή, οξέα και χρωστικές ουσίες (Rajesh Banu et al., 2021).

Τα ορυκτά καύσιμα κάλυπταν πάνω από το 80,3% της ενέργειας που καταναλώνονταν στον κόσμο, συγκεκριμένα το 57,7% καταναλώνονταν στο τομέα των μεταφορών. Μελέτες έδειχναν την επικείμενη μείωση της παγκόσμιας παραγωγής ορυκτών καυσίμων και την ανάγκη χρήσης νέων πηγών ενέργειας που μπορούν να συμβάλουν στην κάλυψη των αναγκών. Μία λύση αποτελούσε η αντικατάσταση ενός ποσοστού βενζίνης και ντίζελ, με βιοκαύσιμα (βιοντίζελ ή βιο-αιθανόλη) ώστε να αυξηθεί η διαθεσιμότητα του καυσίμου στον τομέα των μεταφορών. Η αιθανόλη μπορεί να παραχθεί από οργανική ύλη βιολογικής προέλευσης που έχει σημαντικές ποσότητες σακχάρων και υλικών που μπορούν να μετατραπούν σε σάκχαρα όπως άμυλο ή κυτταρίνη. Τα βιοκαύσιμα μπορούν να παραχθούν μέσω της υδρόλυσης κυτταρίνης και στη συνέχεια ζύμωση σακχάρων. Η κυτταρίνη και οι ημικυτταρίνες μπορούν να μετατραπούν σε σάκχαρα (C6 και C5) και έτσι είναι δυνατή η λήψη αιθανόλης από αυτά. Η αύξηση όμως της παραγωγής βιοκαυσίμων στις ΗΠΑ είχε άμεση επίδραση στις τιμές των δημητριακών και άλλων προϊόντων διατροφής που σχετίζονται με αυτά (Escobar et al., 2009).

Επίσης για να μπορέσουν να μειωθούν οι εκπομπές των αερίων του θερμοκηπίου θα πρέπει να μειωθεί η χρήση των ορυκτών καυσίμων. Για αυτό το σκοπό μπορεί να αξιοποιηθεί η ανανεώσιμη βιομάζα, συγκεκριμένα ως πρώτη ύλη χρησιμοποιείται κυρίως η λιγνοκυτταρινούχος βιομάζα (de Bhowmick et al., 2018).

Επίσης, άλλος ένας λόγος για την αξιοποίηση των λιγνινοκυτταρινούχων αποβλήτων έγκειται στο γεγονός ότι η καύση τους σε ανοιχτό χώρο, παρόλο που είναι μια πρακτική που εφαρμόζεται παγκόσμια, καθώς είναι ένας φθηνός, γρήγορος και πρακτικός τρόπος 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. Συγκεκριμένα, η διαδικασία καύσης της λιγνινοκυτταρινούχου βιομάζας σε ανοιχτό χώρο μειώνει την ποιότητα του αέρα, δημιουργώντας ποικίλα προβλήματα υγείας από την απόρριψη καρκινογόνων οξειδίων ( $\text{NO}_x$ ,  $\text{SO}_2$  και  $\text{CO}_x$ ) με τις ετήσιες εκπομπές να είναι περίπου 0.37 Tg  $\text{SO}_2$ , 2,8 Tg  $\text{NO}_x$ , 1100 Tg  $\text{CO}_2$ , 67 Tg CO και 3,1 Tg μεθανίου ( $\text{CH}_4$ ) (Taha et al., 2016).

Για αυτό το λόγο μια λύση είναι ένα μοντέλο βιοδιυλιστηρίου το οποίο βασίζεται στην ανακύκλωση της λιγνοκυτταρινούχου βιομάζας από διάφορες πηγές και μετατροπή της σε προϊόντα προστιθέμενης αξίας, όπως βιοέλαιο, βιοάνθρακα και χημικές ουσίες βιολογικής προέλευσης. Επίσης προτείνεται ο συνδυασμός της σκοτεινής ή φωτεινής ζύμωσης με ταυτόχρονη καλλιέργεια μικροφυκών. Συγκριτικά με άλλα είδη πρώτης ύλης το κόστος της λιγνοκυτταρινούχου βιομάζας είναι λιγότερο κατά 50% συγκριτικά με άλλες πηγές. Βέβαια χρησιμοποιείται και ως πρώτη ύλη για υλικά, ζωτροφές αλλά και καύσιμα και χημικές ουσίες βιολογικής προέλευσης. Για αυτό και πρέπει να ληφθεί υπόψιν το κόστος της διεργασίας και η διαθεσιμότητα της λιγνοκυτταρινούχου βιομάζας (de Bhowmick et al., 2018).

Για την παραγωγή καυσίμων και χρήσιμων χημικών ουσιών από την λιγνοκυτταρινούχο βιομάζα απαιτείται μια διεργασία δυο σταδίων. Αρχικά απαιτείται η προκατεργασία της βιομάζας και στη συνέχεια η μετατροπή της στις ουσίες στόχους. Παρόλο που μεγάλες ποσότητες λιγνοκυτταρινούχου βιομάζας είναι διαθέσιμες για παραγωγή καυσίμων και άλλων χρήσιμων χημικών ουσιών, στη μετατροπή αυτή εμφανίζονται δυσκολίες λόγω των βιολογικών δομών και της αναλογίας άνθρακα, υδρογόνου και οξυγόνου. Σημαντικό ρόλο παίζει το κυτταρικό τοίχωμα. Για την αποτελεσματική μετατροπή της κυτταρίνης σε μονομερή σακχάρων θα πρέπει να τροποποιηθούν οι χημικές και φυσικές ιδιότητες του κυτταρικού τοιχώματος. Ανάλογα με την προέλευση της βιομάζας απαιτούνται διαφορετικές χημικές και φυσικές διεργασίες και συνδυασμοί αυτών (de Bhowmick et al., 2018).

### 2.1.2 Πηγές Λιγνοκυτταρινούχου Βιομάζας

Οι διάφορες πηγές της βιομάζας στον κόσμο μπορούν να ομαδοποιηθούν σε τέσσερις κατηγορίες: απόβλητα ξύλου από βιομηχανία, αστικά στερεά απόβλητα, υπολείμματα γεωργίας και ενεργειακές καλλιέργειες, που ο σκοπός τους είναι η παραγωγή της βιομάζας. Κατά τη διάρκεια ή μετά την επεξεργασία των γεωργικών καλλιεργειών παράγονται γεωργικά υπολείμματα, τα οποία είναι πλούσια σε λιγνοκυτταρινούχο βιομάζα (Limayem & Ricke, 2012). Το 2019 παράχθηκαν περίπου 181,5 δισεκατομμύρια τόνοι λιγνινοκυτταρινούχου βιομάζας ετησίως και αποτελεί περίπου το 90% της συνολικής βιομάζας. Όμως μόνο το 3% της λιγνοκυτταρινούχου βιομάζας χρησιμοποιήθηκε αποτελεσματικά και ενσωματώθηκε στην κυκλική βιοοικονομία (Rajesh Banu et al., 2021).

Η πλειονότητα των αγροτικών υπολειμμάτων προέρχεται κυρίως από τέσσερα είδη καλλιεργειών τα οποία είναι το καλαμπόκι, το στάχυ, το ρύζι και το σακχαροκάλαμο ενώ οι υπόλοιπες αγροτικές καλλιέργειες συνεισφέρουν σε πολύ μικρό βαθμό στη συνολική παγκόσμια βιομάζα. Για αυτό θεωρείται ότι η βιομάζα αποτελείται κυρίως από στελέχη αραβόσιτου, καλάμια ρυζιού και σταχιού και τη βγάσση η οποία προκύπτει από την επεξεργασία του σακχαροκάλαμου (Saini et al., 2015). Τα

υπολείμματα των καλλιεργειών είναι περίπου 350-450 εκατομμύρια τόνοι ετησίως στις Ηνωμένες Πολιτείες (Limayem & Ricke, 2012).

Στις ΗΠΑ τα δασικά υπολείμματα αποτελούν το 30% της βιομάζας. Η παραγωγή βιομάζας εκτιμάται ότι είναι σχεδόν 1,4 δισεκατομμύρια ξηροί τόνοι ετησίως. Δηλαδή τα δασικά υπολείμματα αντιστοιχούν σε περίπου 370 εκατομμύρια τόνους ετησίως λιγνοκυτταρινούχου βιομάζας στις Η.Π.Α. Τα δασικά υπολείμματα περιλαμβάνουν κυρίως υλικά που περιέχουν ξύλο όπως σκληρό ξύλο, που συλλέγεται από ιτιές και βελανιδιές, μαλακό ξύλο, που συλλέγεται από έλατα, κυπαρίσσια και κέδρους, καθώς και απόβλητα του δάσους όπως πριονίδι και νεκρά κλαδιά και δέντρα. Επιπλέον, αυτή η ξυλώδης πρώτη ύλη έχει περισσότερη λιγνίνη από γεωργικά υπολείμματα και λιγότερη περιεκτικότητα σε τέφρα (Limayem & Ricke, 2012).

Οι πηγές της βιομάζας για τη σύνθεση βιοχημικών προϊόντων μπορούν επίσης να χωριστούν σε δύο ακόμη κατηγορίες: τη βρώσιμη και τη μη βρώσιμη βιομάζα. Τα ζαχαροκάλαμα και τα ζαχαρότευτλα μπορούν να διασπαστούν σε 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, κυρίως 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 η υδροξυμεθυλοφουρφουράλη (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 (Dedes et al., 2020; Taha et al., 2016).

Πίνακας 1:Ετήσια παραγωγή βιομάζας (Limayem & Ricke, 2012)

**Table 1**  
Annual total tonnages of biomass for biofuel in the U.S. (U.S. Department of Energy Biomass Program, 2009) [54].

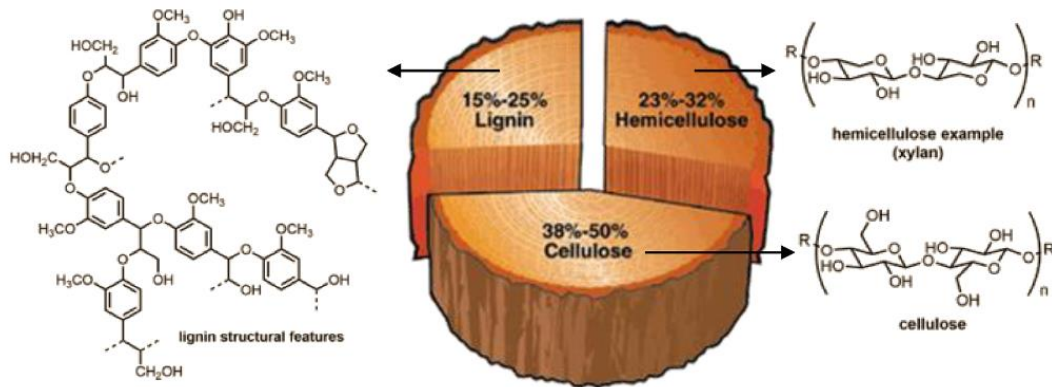
Biomass	Million dry tons/year
Agricultural residues	428
Forest resources	370
Energy crops	377
Grains and corn	87
Municipal and industrial wastes	58
Others (i.e., oilseeds)	48
Total	1368

### 2.1.3 Λιγνοκυτταρινούχος βιομάζα

Το φυτικό κυτταρικό τοίχωμα αποτελεί μια εξωκυτταρική μήτρα στην οποία εμπερικλείεται το κύτταρο ενός φυτού. Το κυτταρικό τοίχωμα έχει σημαντικό ρόλο στο φυτικό κύτταρο, αφού σε αυτό οφείλονται πολλά από τα μοναδικά χαρακτηριστικά ενός φυτού. Τα διαφορετικά τοιχώματα των γειτονικών κυττάρων που συνδέονται μεταξύ τους για να σχηματιστεί το φυτό είναι εν γένει πιο παχιά, δυνατά και κυρίως άκαμπτα από την πλασματική μεμβράνη των ζωικών κυττάρων (Bruce Alberts et al., 2002).

Η βιομάζα αποτελείται κυρίως από πολυσακχαρίτες. Οι πολυσακχαρίτες είναι πολυμερή σακχάρων, για αυτό αποτελούν πηγή ζυμώσιμων σακχάρων αλλά και πηγή μονομερών σακχάρων όπως η γλυκόζη (Hassan et al., 2018). 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 (Dedes et al., 2020). Η ξηρή μάζα της βιομάζας περιέχει 50% κυτταρίνη, 10-40% ημικυτταρίνη και 10-40% λιγνίνη (Hassan et al., 2018). Τα στελέχη αραβοσίτου αποτελούνται κατά 35,1-39,5% κυτταρίνη, 20,7-24,6% ημικυτταρίνη και 11,0-19,1% λιγνίνη (de Bhowmick et al., 2018). Το μαλακό ξύλο, το οποίο προέρχεται από τα δασικά υπολείμματα, αποτελείται από περίπου 33-42% κυτταρίνη, 22-40% ημικυτταρίνη και 27-32% λιγνίνη. Για βιομάζα σκληρού ξύλου τα αντίστοιχα ποσοστά είναι 38-51% κυτταρίνη, 17-38% ημικυτταρίνη και 21-31% λιγνίνη. Ενώ τα χόρτα περιέχουν 25-95% κυτταρίνη, 20-50% ημικυτταρίνη και 0-40% λιγνίνη (Dedes et al., 2020).

Η λιγνοκυτταρινούχος βιομάζα αποτελείται κυρίως από την κυτταρίνη, την λιγνίνη και την ημικυτταρίνη. Αυτές συνδέονται με ομοιοπολικές διασταυρούμενες διασυνδέσεις και μη ομοιοπολικούς δεσμούς (Sindhu et al., 2016). Η σύνθετη μήτρα που κατασκευάζεται από το συνδυασμό αυτών των τριών κλασμάτων έχει προστατευτικό ρόλο για το φυτό, αφού εμποδίζει την πρόσβαση μικροοργανισμών ή ενζύμων στα δομικά σάκχαρα του κυτταρικού τοιχώματος και, ως εκ τούτου αποτρέπει την αποικοδόμησή τους (Dedes et al., 2020). Ειδικότερα, τα πρωτογενή λεπτά και σχετικά ευλύγιστα κυτταρικά τοιχώματα δύο γειτονικών φυτικών κυττάρων αποτελούνται από κυτταρίνη και ημικυτταρίνη με την πηκτίνη ως η κολλώδη ουσία που συγκολλά και 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 (Taha et al., 2016; Zhang et al., 2021a).

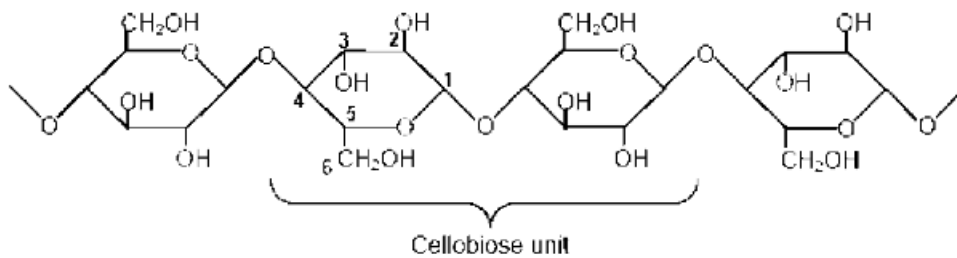


Εικόνα 1: Η δομική σύνθεση της λιγνοκυτταρινούχου βιομάζας (Rajesh Banu et al., 2021)

#### 2.1.4 Κυτταρίνη

Η κυτταρίνη είναι ένα άφθονο διαθέσιμο υλικό στη φύση. Η κυτταρίνη είναι το κύριο δομικό συστατικό των φυτικών κυττάρων, το ποσοστό της στο φυτικό κυτταρικό τοίχωμα να κυμαίνεται μεταξύ 35% και 50% ανάλογα με τον τύπο της βιομάζας. Είναι ένα πολυμερές που αποτελείται από μονομερή D-γλυκόζης που συνδέονται μεταξύ τους με β-(1,4)-γλυκοζιδικούς δεσμούς. Λόγω του δεσμού αυτού, ο δισακχαρίτης κελλοβιόζη αποτελεί την επαναλαμβανόμενη δομική μονάδα στην αλυσίδα της κυτταρίνης. Ο βαθμός πολυμερισμού της κυτταρίνης έχει ένα εύρος από 7000 έως 15000 μονάδες γλυκόζης. Οι πολυμερικές αλυσίδες συνδέονται μεταξύ τους με van der Waals δεσμούς και δεσμούς υδρογόνου. Με αυτόν τον τρόπο δημιουργούνται μικροϊνίδια. Η κυτταρίνη έχει μια περίπλοκη δομή στην οποία οι εσω- και εξωκυτταρικοί δεσμοί υδρογόνου συνεισφέρουν στη σύνδεση μεταξύ των μορίων της. Οι εσωμοριακοί δεσμοί υδρογόνου φαίνεται να προσδίδουν ακαμψία στις αλυσίδες, ενώ οι εξωμοριακοί την ιδιότητα να οργανώνεται σε μορφές παράλληλων φύλων. Η κυτταρίνη μπορεί να θεωρηθεί ως ένα ημικρυσταλλικό πολυμερές όπου άμορφες περιοχές συνυπάρχουν υψηλά κρυσταλλικές. Η πηγή και η προκατεργασία της κυτταρίνης καθορίζουν το βαθμό κρυσταλλικότητας ο οποίος συνήθως κυμαίνεται από 40% σε 60%. Η κυτταρίνη είναι άτηκτη και αδιάλυτη στους περισσότερους υδατικούς και οργανικούς διαλύτες. Η ημικυτταρίνη και η λιγνίνη καλύπτουν τα μικροϊνίδια της κυτταρίνης. Για διασπαστεί η κυτταρίνη στα μονομερή της, δηλαδή στην D-γλυκόζη, η οποία είναι ζυμώσιμη, χρησιμοποιούνται οξέα ή ένζυμα που μπορούν να σπάσουν αυτούς τους γλυκοζιδικούς δεσμούς. Η κυτταρίνη στην βιομάζα βρίσκεται σε κρυσταλλική και άμορφη δομή. Η κρυσταλλική κυτταρίνη αποτελεί το μεγαλύτερο ποσοστό κυτταρίνης στη βιομάζα, ενώ ένα μικρό ποσοστό μη οργανωμένων αλυσίδων αποτελούν την άμορφη κυτταρίνη. Η κυτταρίνη είναι πιο ευαίσθητη στην ενζυμική αποικοδόμηση στην άμορφη μορφή της (Deng et al., 2023; Kumar et al., 2009; Medronho & Lindman, 2015).





Εικόνα 2: Αλυσίδα της κυτταρίνης (Kumar et al., 2009)

Λόγω των γλυκοζιδικών δεσμών η δομή της κυτταρίνης είναι επίπεδα φύλλα που στοιβάζονται και δημιουργούν κρυσταλλικά ινίδια. Ο βαθμός πολυμερισμού της κυτταρίνης είναι ο μεγαλύτερος συγκριτικά με τα υπόλοιπα πολυμερή της λιγνινοκυτταρίνης, για αυτό και έχει χαμηλή ελαστικότητα και αδιάλυτη στο νερό και στους περισσότερους διαλύτες. Συγκριτικά με την κυτταρίνη και την λιγνίνη, η ημικυτταρίνη είναι αυτή που υδρολύεται ευκολότερα. Οι δομές που σχηματίζονται από κυτταρίνη, ημικυτταρίνη και λιγνίνη είναι ανθεκτικές στη βιολογική και χημική αποδόμηση. Αυτό συμβαίνει διότι η λιγνίνη και η ημικυτταρίνη που προσδένονται στην επιφάνεια της κυτταρίνης εμποδίζουν διάσπαση της κυτταρίνης λόγω της χαμηλής προσβασιμότητας των κυτταρινασών με αποτέλεσμα την παρεμπόδιση της λειτουργίας τους (de Bhowmick et al., 2018).

### 2.1.5 Ημικυτταρίνη

Η ημικυτταρίνη διαφέρει από την κυτταρίνη διότι έχει κλάδους με κοντές πλευρικές αλυσίδες που αποτελούνται από διαφορετικά σάκχαρα. Αυτά τα σάκχαρα είναι μονοσακχαρίτες συγκεκριμένα πεντόζες, όπως ξυλόζη, ραμνόζη και αραβινόζη, εξόζες, όπως γλυκόζη, μαννόζη και γαλακτόζη και ουρονικά οξέα, όπως 4-ο-μεθυλογλυκουρονικό, D-γλυκουρονικό και D-γαλακτουρονικό οξύ. Ο κύριος κορμός της ημικυτταρίνης είναι είτε ομοπολυμερές είτε ετεροπολυμερές με βραχείς κλάδους συνδεδεμένους με β-(1,4)-γλυκοζιδικούς δεσμούς και περιστασιακά β-(1,3)-γλυκοζιδικούς δεσμούς. Η ημικυτταρίνη μπορεί να έχει κάποιο βαθμό ακετυλίωσης. Τα πολυμερή στα οποία υπάρχουν οι ημικυτταρίνες δεν είναι εύκολα υδρολύσιμα και δεν συσσωματώνονται, ακόμη και όταν συνκρυσταλλώνονται με αλυσίδες κυτταρίνης (Kumar et al., 2009). Ο πιο συχνός τύπος ημικυτταρίνης είναι η ξυλάνη. Η ξυλάνη αποτελείται από ξυλόζη (Sindhu et al., 2016).

### 2.1.6 Λιγνίνη

Η λιγνίνη είναι αρωματικό πολυμερές, το οποίο αποτελείται από φαινολικά και μη φαινολικά μονομερή. Επίσης αποτελεί κομμάτι των τοιχωμάτων στα φυτά, ενισχύει την αποτελεσματικότητα της αγωγιμότητας του νερού στα αγγεία των φυτών (Sindhu et al., 2016). Επίσης η λιγνίνη είναι μια σύνθετη και μεγάλη μοριακή δομή που περιέχει πολυμερή φαινολικών μονομερών με διασταυρούμενη σύνδεση. Είναι συστατικό του κυτταρικού τοιχώματος, προσδίδοντας δομική υποστήριξη, αδιαπέραστη ικανότητα και αντίσταση σε μικρόβια. Οι φαινυλοπροπιονικές αλκοόλες που είναι τα μονομερή της λιγνίνης είναι κωνφερυλική αλκοόλη (γουαϊακυλοπροπανόλη), κουμαρυλική αλκοόλη (p-υδροξυφαινυλ προπανόλη) και σιναπυλική αλκοόλη (συριγυλική αλκοόλη).

Γενικά, τα ποώδη φυτά όπως τα χόρτα έχουν τη χαμηλότερη περιεκτικότητα σε λιγνίνη, ενώ τα μαλακά ξύλα έχουν την υψηλότερη περιεκτικότητα σε λιγνίνη (Kumar et al., 2009).

## 2.2 Προκατεργασία λιγνινοκυτταρινούχου βιομάζας

Η προκατεργασία της λιγνινοκυτταρινούχου βιομάζας είναι απαραίτητη ώστε να μετατραπεί σε ζυμώσιμη βιομάζα και να μπορέσει να λάβει χώρα η ενζυμική υδρόλυση της λιγνίνης και της ημικυτταρίνης ώστε να διασπαστεί η διάταξη τους και να αποδεσμευτεί η κυτταρίνη (Hassan et al., 2018). Η απομάκρυνση της ημικυτταρίνης εκθέτει την κυτταρίνη στην επιφάνεια με αποτέλεσμα να αυξηθεί η ενζυμική προσβασιμότητα στην κυτταρίνη. Η λιγνίνη από την άλλη αφαιρείται σε ένα περιορισμένο βαθμό κατά τη διάρκεια της προκατεργασίας αλλά γίνεται ανακατανομή της στην επιφάνεια των ινών λόγω της τήξης και των αντιδράσεων αναπολυμερισμού και αποπολυμερισμού. Ένα έμμεσο αποτέλεσμα είναι της αφαίρεσης και της ανακατανομής της ημικυτταρίνης και της λιγνίνης είναι η αύξηση του όγκου του δείγματος (Kumar et al., 2009). Η απόδοση της υδρόλυσης λιγνινοκυτταρινούχου βιομάζας, η οποία δεν έχει προκατεργαστεί, είναι μικρότερη από 20% των συνολικών σακχάρων. Ενώ μετά την προκατεργασία η απόδοση μπορεί να φτάσει μέχρι και το 90%. Η κυτταρίνη προστατεύεται από την λιγνίνη και την ημικυτταρίνη, το γεγονός αυτό μειώνει την ελεύθερη επιφάνεια στην οποία μπορούν να δράσουν τα υδρολυτικά ένζυμα. Η ύπαρξη χαμηλού ποσοστού ημικυτταρίνης φαίνεται να επηρεάζει αρνητικά την λειτουργία των ενζύμων, συγκεκριμένα μειώνεται η απόδοσή τους στη διάσπαση της κυτταρίνης. Η προκατεργασία επηρεάζει την προσβασιμότητα των υδρολυτικών ενζύμων στη κυτταρίνη, καθώς και το κόστος όλης της διεργασίας. Μέσω αυτών των διεργασιών επηρεάζεται σε μακροσκοπικό και μικροσκοπικό επίπεδο το μέγεθος της βιομάζας, αλλά και η δομή της. Η αποτελεσματικότητα της προκατεργασίας της βιομάζας εξαρτάται από τη δομή της στο χώρο, τη χημική σύσταση και τις συνθήκες της προκατεργασίας που θα εφαρμοστεί (Sindhu et al., 2016). Για να θεωρηθεί η προκατεργασία επιτυχημένη θα πρέπει να μειωθεί το μέγεθος των σωματιδίων της βιομάζας, να έχει χαμηλό κόστος για καταλύτη, να απαιτεί μικρό ποσό ενέργειας, να παράγονται σε μικρό ποσοστό προϊόντα αποδόμησης τα οποία είναι ανασταλτικοί παράγοντες για την ανάπτυξη των μικροοργανισμών που χρησιμοποιούνται στη ζύμωση και τα κόστη της βιομάζας και της διεργασίας να είναι σε αποδεκτά επίπεδα (de Bhowmick et al., 2018).

Οι κατηγορίες προκατεργασίας βιομάζας είναι βιολογική, χημική, φυσική και φυσικοχημική (Hassan et al., 2018). Οι χημικές προκατεργασίες περιλαμβάνουν την προκατεργασία με οξέα και βάσεις, κυρίως χρησιμοποιούνται διαλύτες της κυτταρίνης. Σε αυτή την προκατεργασία διαταράζεται η δομή της βιομάζας με στόχο της βελτίωση της υδρόλυσης. Το πιο συχνά χρησιμοποιούμενο οξύ είναι το θειικό οξύ και αντίστοιχα το καυστικό νάτριο για τις βάσεις. Διαλύτες της κυτταρίνης είναι το αλκαλικό διάλυμα υπεροξειδίου του οξυγόνου, το όζον, η γλυκερίνη, το διοξάνιο, φαινόλες και η 1,2-αιθανοδιόλη. Συνδυάζοντας υγρή οξείδωση με παρουσία οξέων και σύμπλοκα μετάλλων χάνει την κρυσταλλική δομή της η κυτταρίνη και διασπά τις συνδέσεις ανάμεσα στη λιγνίνη, την κυτταρίνη και την ημικυτταρίνη (de Bhowmick et al., 2018). Οι περισσότερες χημικές και φυσικές

προκατεργασίες χρησιμοποιούν οξέα, αλκαλικά διαλύματα, μικροκύματα, έκρηξη ατμού, ιοντίζουσες ακτινοβολίες και συνδυασμός αυτών (Sindhu et al., 2016).

### 2.2.1 Φυσικές προκατεργασίες

Οι φυσικές προκατεργασίες αποτελούν απλούστερες διεργασίες και δεν παράγουν υγρά χημικά απόβλητα, γεγονός που τις καθιστά φιλικότερες προς το περιβάλλον. Συγκεκριμένα, οι φυσικές μέθοδοι προκατεργασίας περιλαμβάνουν μηχανικές μεθόδους και ακτινοβολίας. Οι μηχανικές προκατεργασίες χωρίζονται στον θρυμματισμό, την έκρηξη ατμού και υδροθερμόλυση. Ο θρυμματισμός, δηλαδή η μείωση του μεγέθους των σωματιδίων της βιομάζας με μηχανικό τρόπο, μπορεί να πραγματοποιηθεί σε ξηρό και υγρό περιβάλλον με χρήση σφαίρα άλεσης ή άλεση με συμπίεση.

Η μηχανική προκατεργασία καταστρέφει τους εσωτερικούς χημικούς δεσμούς και τους δεσμούς υδρογόνου μεταξύ των τριών συστατικών της βιομάζας, με αποτέλεσμα την μείωση του βαθμού πολυμερισμού, καθώς και διάσπαση των δεσμών υδρογόνου με αποτέλεσμα την μείωση της κρυσταλλικότητας της. Όμως, η λιγνίνη και η ημικυτταρίνη δεν μπορούν να απομακρυνθούν μέσω μηχανικής προκατεργασίας, επομένως απαιτείται πρόσθετη απολιγνοποίηση ή υδρόλυση κυτταρίνης και της ημικυτταρίνης. Η σχετικά υψηλή κατανάλωση ενέργειας και το λειτουργικό κόστος της μηχανικής προκατεργασίας περιορίζουν την εφαρμογή της στη βιομηχανική επεξεργασία της λιγνοκυτταρινούχου βιομάζας.

Η προκατεργασία με ακτινοβολία περιλαμβάνει την ακτινοβολία γάμμα, τους υπέρηχους και τα μικροκύματα. Οι ακτίνες γάμμα παράγονται από τη ραδιενεργή διάσπαση των ραδιοϊσοτόπων κοβαλτίου ή κεσίου. Αυτή η ιονίζουσα ακτινοβολία μπορεί να διεισδύσει στις δομές της λιγνοκυτταρινούχου βιομάζας και να έχει αρκετή ενέργεια για να καταστρέψει το σύμπλεγμα λιγνίνης με τους υδατάνθρακες. Επιπλέον, κατά τη διάρκεια αυτής της διεργασίας σχηματίζονται ελεύθερες ρίζες και διασπώνται οι γλυκοζιδικοί δεσμοί και παράγονται ολιγοσακχαρίτες. Η παραγωγή αυτών των ακτινοβολιών απαιτούν ακριβό εξοπλισμό και επομένως υψηλό κόστος προκατεργασίας. Ο υπέρηχος και τα μικροκύματα εφαρμόζονται επίσης για την προκατεργασία της βιομάζας. Με την ενσωμάτωση υπέρηχων, οι αιθερικοί δεσμοί στη λιγνίνη διασπώνται. Επίσης με τα μικροκύματα καταστρέφονται τα κυτταρικά τοιχώματα και διαταράσσονται οι ενδομοριακοί δεσμοί υδρογόνου στη λιγνοκυτταρινούχο βιομάζα. Ταυτόχρονα, η αύξηση της θερμοκρασίας και της πίεσης από την τοπική θέρμανση λόγω της ακτινοβολίας συμβάλλει επίσης στη διαταραχή της δομής της βιομάζας (de Bhowmick et al., 2018; Deng et al., 2023).

#### 2.2.1.1 Μηχανική προκατεργασία

Οι μηχανικές μέθοδοι περιλαμβάνουν κατά κύριο λόγο τη μέθοδο της άλεσης για τη μείωση του μεγέθους και της κοκκομετρίας της βιομάζας. 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. Σε αυτό το πλαίσιο έχει μελετηθεί η άλεση (με ή χωρίς άλλες μεθόδους που δεν περιλαμβάνουν θεϊκό οξύ) σε ξυλώδη βιομάζα και καλάμια ρυζιού. 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. Με στόχο την μείωση της κρυσταλλικότητας της κυτταρίνης η λιγνοκυτταρινούχος βιομάζα θρυμματίζεται, συγκεκριμένα μέσω του συνδυασμού θρυμματισμού, λειοτρίβηση και ή άλεσης. Μετά τον θρυμματισμό το μέγεθος του υλικού είναι της τάξης 10-30 mm ενώ μετά από άλεση ή λειοτρίβηση είναι της τάξης 0,2-2 mm. Πιο αποδοτική έχει αποδειχθεί να είναι η μηχανική πολτοποίηση της βιομάζας με άλεση με χρήση σφαιρόμυλου, διότι έχει βρεθεί ότι παράγει προϊόντα με κυτταρίνη μειωμένης κρυσταλλικότητας κάτι που βοηθάει την παραγωγικότητα των ενζύμων. Παρόλο που οι προκατεργασίες με άλεση συχνά περιγράφονται ως τεχνικές υψηλής ενέργειας, η μέθοδος της άλεσης με υγρό δίσκο φαίνεται ότι μπορεί να αποτελέσει μια πιθανή μηχανική μέθοδο για την επεξεργασία καλαμιού ρυζιού, αφού βρέθηκε ότι με αυτό τον τρόπο δεν παράγονται παρεμποδιστές της ζύμωσης, όπως η φουρφουράλη (Da Silva et al., 2010; Dedes et al., 2020; Kumar et al., 2009).

#### 2.2.1.2 Προκατεργασία με μικροκύματα

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, καθώς και το μικρό χρόνο προκατεργασίας. Ακόμη προσφέρει εκλεκτική αλληλεπίδραση με τις ενεργές ομάδες, στιγμιαίο και ακριβή έλεγχο και επιταχύνει τον ρυθμό της αντίδρασης. Σημαντικό είναι ότι 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.

Τα μικροκύματα είναι ηλεκτρομαγνητική ακτινοβολία με μήκη κύματος από 1 mm έως 1 m και συχνότητα από 300 (3×10<sup>8</sup> κύκλοι/s) έως 300,000 MHz (3×10<sup>11</sup> κύκλοι/s), τα οποία αλληλοεπιδρούν 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, όπως για παράδειγμα την δομή της βιομάζας. Κατά τη θέρμανση με μικροκύματα έχει παρατηρηθεί αύξηση στην απόδοση της υδρόλυσης, της οξειδωσης, της αλκυλίωσης και της εστεροποίησης.

Τα θετικά της χρήσης των μικροκυμάτων προέρχονται από το γεγονός ότι ο ρυθμός μεταφοράς θερμότητας είναι πιο γρήγορος, θερμαίνεται ομοιόμορφα όλος ο όγκος, είναι εύκολη διεργασία πειραματικά με λιγότερα περιθώρια για σφάλματα, αποδοτική ενεργειακά και είναι χαμηλό το ποσοστό σχηματισμού παραπροϊόντων. Το πρόβλημα που προκύπτει από την θέρμανση με συμβατικούς τρόπους είναι ότι εφόσον η θερμότητα μεταφέρεται με επαγωγή, μεταφέρεται από τα εξωτερικά στρώματα του υλικού προς τα εσωτερικά, με αποτέλεσμα να θερμαίνεται εξωτερικά αλλά εσωτερικά να μην θερμαίνεται με τον ίδιο ρυθμό και να έχει μικρότερη θερμοκρασία. Η θέρμανση με ακτινοβολία, όπως είναι τα μικροκύματα, δεν έχουν αυτό το πρόβλημα αφού θερμαίνεται το υλικό σε μοριακό επίπεδο. Άρα η θερμότητα μοιράζεται ομοιόμορφα σε όλη τη μάζα του υλικού.

Η προκατεργασία με μικροκύματα χωρίζεται σε δυο κατηγορίες με βάση την θερμοκρασία που επικρατεί κατά την διεργασία και οδηγούν σε διαφορετικά προϊόντα. Κατά την διαλυτόλυση με τη βοήθεια μικροκυμάτων (Microwave-assisted solvolysis) επικρατούν ήπιες θερμοκρασίες, συγκεκριμένα μικρότερες από 200 °C. Μέσω αυτής της διεργασίας αποδιοργανώνεται και διασπάται η δομή της βιομάζας. Κατά την αναερόβια πυρόλυση με τη βοήθεια μικροκυμάτων (Microwave-assisted pyrolysis) της λιγνίνης υπό υψηλή πίεση επικρατούν υψηλές θερμοκρασίες, συγκεκριμένα μεγαλύτερες από 400 °C. Μέσω αυτής της διεργασίας μετατρέπεται η βιομάζα σε βιοαέριο ή βιοέλαιο.

Ακόμη η προκατεργασία με μικροκύματα συνδυάζεται 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 που δημιουργείται, εκτίθεται σε ακτινοβολία μικροκυμάτων για χρόνους παραμονής 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.

Μετά την προκατεργασία με μικροκύματα η απόδοση της ενζυμικής υδρόλυσης επηρεάζεται από την ποσότητα της βιομάζας που κατεργάζεται, την ισχύς της ακτινοβολίας των μικροκυμάτων, το χρόνο εκθεσης στην ακτινοβολία και το 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 βρεθεί ότι η υδρόλυση της κυτταρίνης και της ημικυτταρίνης βελτιώνεται με την 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. Ακόμη, επηρεάζει η ισχύς της ακτινοβολίας που εφαρμόζεται. Αντίθετα με τη συμβατική θέρμανση, οι πυκνότητες ισχύος στην ακτινοβολία με μικροκύματα είναι υψηλότερες, κάτι το οποίο έχει θετική επίδραση στην προκατεργασία. Επίσης, με κάποιους περιορισμούς, αυξάνοντας το επίπεδο ισχύος των μικροκυμάτων μπορεί να μειωθεί ο απαιτούμενος χρόνος προκατεργασίας. Όταν 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. Επιπλέον ο χρόνος προκατεργασίας είναι καθοριστικός παράγοντας της προκατεργασίας. Συγκεκριμένα, 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 παραπροϊόντων που λειτουργούν ως παρεμποδιστών, όπως φουρφουράλης, υδροξυμεθυλοφουρφουράλης, ασθενών οξέων και φαινολικών μορίων, απαιτείται καθαρισμός της πρώτης ύλης μετά την προκατεργασία (Alvira et al., 2010; Ethaib et al., 2014; Hassan et al., 2018; Kitchaiya et al., 2003; Puligundla et al., 2016).

#### 2.2.1.3 Προκατεργασία με Υπερήχους (Ultrasound)

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. Οι υπέρηχοι που χρησιμοποιούνται στις χημικές διεργασίες ανήκουν στο διάστημα από 20 kHz έως 1 MHz. Οι υπέρηχοι προσβάλλουν τα κυτταρικά τοιχώματα, διασπώντας τους αιθερικούς δεσμούς μεταξύ λιγνίνης και ημικυτταρινών και αυξάνουν την προσβασιμότητα και εκχύλιση των ημικυτταρινών. Η προκατεργασία της βιομάζας με υπερήχους μεταβάλλει την επιφανειακή δομή και παράγονται οξειδωτικές ρίζες που προσβάλλουν χημικά τη λιγνοκυτταρινική μήτρα. Επίσης επηρεάζει τη δομή της λιγνίνης. 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 δημιουργία κενών της επιφάνειας των στερεών υποστρωμάτων, με αποτέλεσμα να βελτιώνεται η δράση των ενζύμων. Συγκεκριμένα, τα καλύτερα αποτελέσματα από την σπηλαίωση παρατηρούνται στους 50°C, γεγονός που θεωρείται θετικό καθώς αποτελεί και βέλτιστη θερμοκρασία για πολλά ένζυμα.

Με βάση τη βιβλιογραφία, η προκατεργασία ζαχαροκάλαμου με υπερήχους με ισχύ 100 W και χρόνο προκατεργασίας 2 ώρες με διαλύτη νερό και θερμοκρασία 55 °C, απομάκρυνε την ημικυτταρίνη και τη λιγνίνη σε ποσοστό 90%. Ακόμη, η αλκαλική προκατεργασία βιομάζας με υπερήχους αυξάνει με την διάσπαση της λιγνίνης και την απόδοση της ενζυμικής σακχαροποίησης και μειώνει την κρυσταλλικότητα. Πιο αναλυτικά, σε αλκαλική προκατεργασία βιομάζας με υπερήχους σε τρία διαφορετικά είδη προκατεργασίας, όπου η βιομάζα αποτελούσε το 0,5% του συνολικού όγκου, η ισχύς των υπερήχων ήταν 100 W και ο κύκλος λειτουργίας ήταν 80% για χρονική διάρκεια 70 min,

βρέθηκε ότι μέσω της προκατεργασίας με υπερήχους αυξήθηκε η απολιγνίνωση σε ποσοστό 80-100% συγκριτικά με συμβατικές αλκαλικές προκατεργασίες. Ο συνδυασμός της προκατεργασίας της βιομάζας με αμμωνία και συγχρόνως με υπερήχους μειώνει στον σχηματισμό παραπροϊόντων, αυξάνει την απολιγνίνωση και αυξάνει την ανάκτηση της κυτταρίνης. Επίσης αυτός ο συνδυασμός μεθόδων επιτρέπει την προκατεργασία σε ήπιες θερμοκρασίες. Σε προκατεργασία αραβοσίτου σε διάλυμα αμμωνίας συγκέντρωσης 2% w/v υπό την επίδραση υπερήχων ισχύος 90 W και συχνότητας 50 kHz σε θερμοκρασία 60 °C και για χρονική διάρκεια 2 h είχε ως αποτέλεσμα η απόδοση της ενζυμικής υδρόλυσης να είναι 66% (Alvira et al., 2010; Hassan et al., 2018).

#### 2.2.1.4 Προκατεργασία με συνδυασμό μικροκυμάτων και υπερήχων

Ο συνδυασμός μικροκυμάτων και υπερήχων στην προκατεργασία βιομάζας έχει αποδειχθεί ότι αυξάνει την ταχύτητα της υδρόλυσης και την βιοαποδομησιμότητα. Ακόμη είναι πιο αποδοτική από την εφαρμογή μόνο μικροκυμάτων. Όσον αφορά την διάσπαση της ημικυτταρίνης φάνηκε ότι ο συνδυασμός αυτός είχε έντονη θετική επίδραση, καθώς θέρμαινε όλη τη μάζα της βιομάζας εσωτερικά και οδηγούσε στην ακαριαία υδρόλυση της ημικυτταρίνης (Hassan et al., 2018).

#### 2.2.1.5 Προκατεργασία με ακτίνες γ (Gamma ray)

Η ακτινοβολία ακτινών γάμμα εκλύεται από ραδιοϊσότοπα Cobalt-60 ή Cesium-137 και έχει επίσης χρησιμοποιηθεί ως προκατεργασία λιγνοκυτταρινούχου βιομάζας. Η ιονίζουσα ακτινοβολία μπορεί εύκολα να διεισδύσει στη λιγνοκυτταρική δομή, προκαλώντας τροποποίηση της λιγνίνης και διάσπαση των κρυσταλλικών περιοχών κυτταρίνης. Ο σχηματισμός ελευθέρων ριζών οδηγεί στη γρήγορη διάσπαση των κρυσταλλικών δομών. Οι ελεύθερες ρίζες διασπώνται με την διακοπή της ακτινοβολίας στις άμορφες περιοχές της βιομάζας (Hassan et al., 2018).

### 2.2.2 Φυσικοχημική προκατεργασία

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 φυσικοχημικές μέθοδοι προκατεργασίας είναι πιο αποδοτικές από τις φυσικές μεθόδους και πιο πράσινες από τις χημικές, αλλά έχουν υψηλά λειτουργικά κόστη λόγω των υψηλών ποσοστών ενέργειας που απαιτούνται. Οι κύριοι τύποι φυσικοχημικών προκατεργασιών είναι η έκρηξη ατμού (steam explosion, SE), υδροθερμική προκατεργασία (aquasolv), έκρηξη αμμωνίας (ammonia fiber expansion, AFEX) και προκατεργασία με έκρηξη του διοξειδίου του άνθρακα. Ακόμη, οι κύριοι παράγοντες που επηρεάζουν την φυσικοχημική προκατεργασία της βιομάζας είναι η πίεση, ο χρόνος παραμονής και η θερμοκρασία (Dedes et al., 2020; Li et al., 2022; Zhang et al., 2021b).

#### 2.2.2.1 Προκατεργασία με έκρηξη ατμού (steam explosion, SE)

Η έκρηξη ατμού είναι από τις πιο συνήθεις μεθόδους για την προκατεργασία της λιγνοκυτταρινούχου βιομάζας. Σε αυτή τη μέθοδο χρησιμοποιείται υψηλής πίεσης κορεσμένος ατμός ο οποίος οδηγεί σε

μια εκρηκτική αποσυμπίεση των υλικών που προκατεργάζονται. Η έκρηξη του ατμού αρχίζει σε θερμοκρασίες 160-260 °C και πιέσεις 0,69-4,83 MPa και διαρκεί από δευτερόλεπτα μέχρι και μερικά λεπτά και μετά από μια ξαφνική αποσυμπίεση το υλικό εκτίθεται σε ατμοσφαιρική πίεση. Μέσω του ατμού θερμαίνεται η βιομάζα γρήγορα χωρίς να διαλυθούν υπερβολικά τα σάκχαρα που προκύπτουν από τη διάσπαση των πολυμερών. Το μείγμα της βιομάζας και του ατμού παραμένει σε υψηλή θερμοκρασία και πίεση ώστε να αυξηθεί το ποσοστό της υδρόλυσης της ημικυτταρίνης.

Η έκρηξη ατμού προκαλεί συνήθως έναν συνδυασμό φυσικών και χημικών αλλαγών. Αρχικά, η έντονη εξάτμιση του νερού καταστρέφει τις λιγνοκυτταρινικές ίνες. Ταυτόχρονα, οι δεσμοί άνθρακα-οξυγόνου-άνθρακα (C-O-C) διασπώνται μέσω της υδρόλυσης που λαμβάνει χώρα. Μέσω αυτής της διεργασίας, η ημικυτταρίνη μπορεί να εξαχθεί και να αποικοδομηθεί σε ολιγοσακχαρίτες ή μονοσακχαρίτες, ενώ η λιγνίνη μπορεί να διαχωριστεί χωρίς παραμόρφωση από την αρχική της δομή. Επιπλέον, η κυτταρίνη υφίσταται ελάχιστο αποπολυμερισμό, αλλά η κλασμάτωση μπορεί να επιτευχθεί σε μεγάλο βαθμό μέσω έκρηξης με ατμό, εφόσον αυξάνεται η πιθανότητα υδρόλυσης της. Η γρήγορη εναλλαγή σε ατμοσφαιρική πίεση και σε τρυβώδη ροή του αέρα προκαλεί τον θρυμματισμό του υλικού και έτσι αυξάνεται η επιφάνεια. Επίσης, σε έρευνες παρατηρήθηκε διάσπαση της κυτταρίνης σε γλυκόζη. Ωστόσο, το στερεό υπόλειμμα που προκύπτει από αυτή τη διεργασία θα πρέπει να πλυθεί πριν από περαιτέρω ενζυμική υδρόλυση, λόγω της δημιουργίας ανασταλτικών ενώσεων (π.χ. φουρφοουράλη).

Οι παράγοντες που επηρεάζουν την έκρηξη του ατμού είναι η θερμοκρασία, ο χρόνος παραμονής, το μέγεθος των θραυσμάτων και το ποσοστό της υγρασίας. Τα πλεονεκτήματα της προκατεργασίας με έκρηξη ατμού είναι ότι απαιτεί λιγότερη ενέργεια συγκριτικά με τη μηχανική καταπόνηση και θρυμματισμό του υλικού. Οι συμβατικές μηχανικές μεθόδους απαιτούν 70% περισσότερη ενέργεια για να πετύχουν την ίδια μείωση στο μέγεθος των σωματιδίων συγκριτικά με την προκατεργασία με έκρηξη ατμού. Επίσης οικονομικά είναι προτιμότερη γιατί δεν περιλαμβάνει ανακύκλωση και περιβαλλοντικά κόστη. Η βέλτιστη διαλυτοποίηση και υδρόλυση της ημικυτταρίνης μπορεί να επιτευχθεί από υψηλή θερμοκρασία και μικρό χρόνο παραμονής (270°C, 1 min) ή από πιο χαμηλές θερμοκρασίες και μεγαλύτερους χρόνους παραμονής (190°C, 10 min). Σε υψηλές θερμοκρασίες το νερό συμπεριφέρεται σαν οξύ. Η προσθήκη όμως θειικού οξέος H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> ή διοξειδίου του άνθρακα CO<sub>2</sub> σε συγκέντρωση 0,3-3% w/w κατά τη διάρκεια της έκρηξης του ατμού μειώνει τον απαιτούμενο χρόνο και θερμοκρασία της διεργασίας, αυξάνει επίσης την αποδοτικότητα της υδρόλυσης, καθώς και μειώνει την παραγωγή ανασταλτικών ουσιών και μπορεί να οδηγήσει στην πλήρη απομάκρυνση της ημικυτταρίνης.

Οι περιορισμοί της μεθόδου προκατεργασίας με έκρηξη ατμού είναι η καταστροφή μιας ποσότητας του κλάσματος της ξυλάνης, η μερική μόνο διατάραξη της μήτρας της λιγνίνης με τους υδατάνθρακες και η παραγωγή ενώσεων που μπορεί να είναι ανασταλτικές ως προς την μικροβιολογική ανάπτυξη που απαιτείται σε επόμενα βήματα της προκατεργασίας, την ενζυματική υδρόλυση και την ζύμωση. Για να αποφευχθεί αυτό η προκατεργασμένη βιομάζα θα πρέπει να εκπλυθεί με νερό ώστε να απομακρυνθούν αυτές οι ενώσεις καθώς και η ημικυτταρίνη, η οποία είναι υδατοδιαλυτή. Ακόμα και σε αυτή τη περίπτωση όμως δημιουργούνται προβλήματα καθώς η έκπλυση με νερό μειώνει την



απόδοση της σακχαροποίησης επειδή απομακρύνονται και σάκχαρα (Deng et al., 2023; Kumar et al., 2009).

#### 2.2.2.2 Υδροθερμική προκατεργασία

Η προκατεργασία με έκρηξη ατμού μπορεί επίσης να εφαρμοστεί και με νερό σε υγρή κατάσταση. Για να μπορέσει το νερό να παραμένει σε υγρή κατάσταση σε υψηλές θερμοκρασίες προσαρμόζεται κατάλληλα η πίεση. Αυτός ο τύπος προκατεργασίας ονομάζεται υδροθερμική προκατεργασία. Η υδροθερμική προκατεργασία είναι μια πράσινη κατεργασία που 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. 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. Σε έρευνα όπου ο χρόνος παραμονής για αυτή τη διεργασία ήταν περίπου 15 min και το θερμοκρασιακό εύρος 200-230°C, αποδείχθηκε ότι αποσυντίθεται το 40-60% της συνολικής βιομάζας. Συγκεκριμένα 4-22% της κυτταρίνης, 35-60% της λιγνίνης και όλη η ημικυτταρίνη απομακρύνθηκε.

Στην υδροθερμική προκατεργασία χρησιμοποιούνται τρεις τύποι αντιδραστήρων με νερό υψηλής θερμοκρασίας και είναι ομορροής (cocurrent), αντιρροή (counter-current), and flow-through. Στη προκατεργασία ομορροής η λιγνοκυτταρινούχος βιομάζα και το νερό κινούνται στην ίδια κατεύθυνση και το μείγμα τους θερμαίνεται στη επιθυμητή θερμοκρασία. Στη συνέχεια παραμένει στις συνθήκες της προκατεργασίας για τον επιλεγμένο χρόνο παραμονής κάθε φορά και στο τέλος ψύχεται. Στη προκατεργασία αντιρροής (counter-current) το νερό και η βιομάζα κινούνται προς αντίθετες κατευθύνσεις στον αντιδραστήρα. Σε έναν flow-through αντιδραστήρα το ζεστό νερό περνά γύρω από τη στατική φάση της βιομάζας. Για αυτό το λόγο και σε αυτή τη μέθοδο η μείωση του μεγέθους της βιομάζας δεν είναι απαραίτητη εφόσον η βιομάζα διασπάται όταν βράζεται σε νερό (Kumar et al., 2009; Zhang et al., 2021b).

#### 2.2.2.3 Προκατεργασία με έκρηξη αμμωνίας (Ammonia Fiber Explosion AFEX)

Στη προκατεργασία με έκρηξη αμμωνίας (Ammonia Fiber Explosion) η βιομάζα έρχεται σε επαφή με διάλυμα αμμωνίας σε υψηλές θερμοκρασίες και πιέσεις. Χρησιμοποιείται υγρή άνυδρη αμμωνία σε θερμοκρασίες από 60 έως 100 °C και υψηλές πιέσεις. Μετά το τέλος της διεργασίας η πίεση μειώνεται απότομα. απότομη εκτόνωση της αμμωνίας οδηγεί σε ένα συμπαγή πολτό που οι ίνες της κυτταρίνης έχουν διογκωθεί και είναι λιγότερο κρυσταλλικές. Με βάση τη βιβλιογραφία, οι επικρατέστερες συγκεντρώσεις αμμωνίας είναι 1-2 kg αμμωνία / kg ξηρής βιομάζας. Επίσης σε συνθήκες θερμοκρασία 90°C και χρόνο παραμονής 30 min, η συγκεκριμένη διεργασία έχει παρόμοια χαρακτηριστικά με την προκατεργασία με έκρηξη ατμού. Κατά τη διάρκεια αυτής της προκατεργασίας μόνο ένα μικρό κλάσμα της βιομάζας διαλυτοποιείται και δεν αφαιρείται μεγάλη ποσότητα της ημικυτταρίνης και της λιγνίνης. Η ημικυτταρίνη διασπάται στα μονομερή της και αποκετυλιώνεται.

Η μέθοδος αυτή είναι αποδοτική για λιγνοκυτταρινούχο βιομάζα με χαμηλά ποσοστά λιγνίνης. Για παράδειγμα η προκατεργασία αγριάδας (*bermudagrass*), που περιέχει περίπου 5% λιγνίνη και μπαγάσης (*bagasse*), που περιέχει 15% λιγνίνη έχει ως αποτέλεσμα την υδρόλυση του 90% της κυτταρίνης και της ημικυτταρίνης. Άλλα σε βιομάζα με μεγαλύτερα ποσοστά λιγνίνης δεν ήταν αποδοτική (Kumar et al., 2009).

#### 2.2.2.4 Προκατεργασία με έκρηξη του διοξειδίου του άνθρακα

Στην προκατεργασία με έκρηξη διοξειδίου του άνθρακα χρησιμοποιείται υπερκρίσιμο διοξείδιο του άνθρακα. Το διοξείδιο του άνθρακα είναι 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. Μετά από την εκτονωτική απελευθέρωση της πίεσης του CO<sub>2</sub>, 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 η θερμοκρασία είναι χαμηλότερη και το κόστος είναι χαμηλότερο συγκριτικά με την έκρηξη με παρουσία αμμωνίας.

Ακόμη, ο ρυθμός της υδρόλυσης είναι βελτιωμένος διότι το διοξείδιο του άνθρακα σε υδατικό διάλυμα μετατρέπεται σε ανθρακικό οξύ. Το μέγεθος του διοξειδίου του άνθρακα του επιτρέπει να εισχωρεί σε πόρους, όπως αντίστοιχα έχει αυτή τη δυνατότητα η αμμωνία και τα μόρια του νερού (Alvira et al., 2010; Kumar et al., 2009).

#### 2.2.3 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, ήπιο όξινο, αλκαλικό, οργανικός διαλύτης, όζον ή ιοντικό υγρό. Συνήθως, η χημική προκατεργασία περιλαμβάνει συστήματα που περιέχουν υδατικό ή οργανικό διαλύτη. Ακόμη, αυτή η προκατεργασία μπορεί να αυξήσει σημαντικά τον ρυθμό υδρόλυσης της βιομάζας. Ένα ευρύ φάσμα ουσιών, όπως οξέα, βάσεις, αμμωνία και όζον, χρησιμοποιείται για την διάσπαση των δεσμών στη βιομάζα. Τόσο οι όξινες όσο και οι αλκαλικές προκατεργασίες σε υδατικά διαλύματα αυξάνουν την προσβασιμότητα της ενζυμικής υδρόλυσης. Η χημική προκατεργασία χρησιμοποιείται συνήθως στη βιομηχανία λόγω της πιο απλής λειτουργίας και της υψηλής απόδοσης. Ωστόσο, σε αυτή την προκατεργασία παράγονται αναστολείς που εμποδίζουν την χρήση μικροοργανισμών σε μετέπειτα επεξεργασία. Επίσης, παράγονται περιβαλλοντικοί ρύποι. Λόγω αυτών των μειονεκτημάτων αυτής της μεθόδου, ορισμένες μελέτες συνδυάζουν άλλες μεθόδους προκατεργασίας με την χημική, ώστε να μειώσουν τη χρήση χημικών αντιδραστηρίων και την παραγωγή αναστολέων. Φυσικά, μαζί με αυτό έρχεται η πολυπλοκότητα και η αβεβαιότητα της διαδικασίας, από την επιλογή πρώτων υλών έως τη βελτιστοποίηση των παραμέτρων κατάστασης, που απαιτούν περισσότερη εξερεύνηση (Dedes et al., 2020; Deng et al., 2023; Li et al., 2022).

### 2.2.3.1 Προκατεργασία με οργανικό διαλύτη (Organosolv Process)

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. Στην προκατεργασία με την μέθοδο οργανικού διαλύτη η βιομάζα αναμυγνύεται με οργανικό διαλύτη και οξέα όπως υδρολώριο και θειικό οξύ. Οι κυρίως χρησιμοποιούμενοι οργανικοί διαλύτες είναι μεθανόλη, αιθανόλη, αιθυλενογλυκόλη, τριαιθυλενογλυκόλη και τετραϋδροφουρφουρική αλκοόλη. Ακόμη χρησιμοποιούνται ως καταλύτες στη διεργασία και οργανικά οξέα όπως το οξαλικό, ακετυλοσαλικυλικό και σαλικυλικό οξύ. Η προκατεργασία αυτή διεξάγεται είτε σε καθαρό οργανικό διαλύτη είτε σε μείγμα νερού με οργανικό διαλύτη, συνήθως στο εύρος θερμοκρασίας 120–250 °C.

Οι οργανικοί διαλύτες χρησιμοποιούνται μπορεί να είναι πολικοί πρωτικοί είτε απρωτικοί διαλύτες. Οι πολικοί πρωτικοί διαλύτες, όπως η μεθανόλη, η αιθανόλη και η αιθυλενογλυκόλη, διασπούν τους εσωτερικούς δεσμούς μεταξύ λιγνίνης και ημικυτταρίνης, καθώς και τους αιθερικούς δεσμούς που υπάρχουν στη λιγνίνη και τους γλυκοζιδικούς δεσμούς στην ημικυτταρίνη, καθώς και διαλυτοποιούν ολιγομερή της λιγνίνης και ολιγοσακχαρίτες. Αντίθετα, οι πολικοί απρωτικοί διαλύτες διαλυτοποιούν μόνο, λόγω της ασθενούς ικανότητας ιονισμού τους δεν μπορούν να διασπάσουν τους δεσμούς της λιγνοκυτταρινούχου βιομάζας. Για να αντιμετωπιστεί αυτό το μειονέκτημα χρησιμοποιούνται συστήματα συνδιαλύτη, όπου το νερό λειτουργεί ως πυρηνόφιλο για να σπάσει τους χημικούς δεσμούς, όπως για παράδειγμα νερού με τετραϋδροφουρανίου και γ-βαλερολακτόνης. Η χρήση οργανικού διαλύτη γενικά συνοδεύεται από αυξημένο κόστος και πιθανούς κινδύνους για την ασφάλεια και την υγεία.

Μια τεχνολογία βιοεξευγενισμού που εφαρμόζεται σε πολτούς με λιγνίνη που κυμαίνεται από 6,4% έως 27,4% (w/w), ονομάζεται διεργασία της λιγνόλης, η οποία βασίζεται σε μια υδατική εκχύλιση με οργανικό διαλύτη αιθανόλη. Συγκεκριμένα σε αυτή η διεργασία χρησιμοποιείται ένα μείγμα αιθανόλης και νερού σε την αναλογία 50:50 (w/w) σε θερμοκρασία 200°C και πίεση 400 psi. Η λιγνίνη ανακτάται ως λεπτό ίζημα διοχετεύοντας το υγρό πολτοποίησης στην ατμοσφαιρική πίεση, ακολουθούμενη από ταχεία αραίωση με νερό. Άλλα συμπροϊόντα όπως τα σάκχαρα ημικυτταρίνης και η φουρφουράλη ανακτώνται από το υδατοδιαλυτό ρεύμα της διεργασίας. Διαπιστώθηκε ότι όλοι οι πολτοί υδρολύθηκαν εύκολα χωρίς περαιτέρω απολιγνοποίηση και πάνω από το 90% της κυτταρίνης υδρολύθηκε στη συνέχεια σε γλυκόζη σε 48 ώρες. Οι προτιμώμενες συνθήκες είναι θερμοκρασία 180-195°C, χρόνος παραμονής 30-90 min, συγκέντρωση αιθανόλης 35-70% w/w και αναλογία υγρού προς στερεά από 4:1 έως 10:1 w/w. Το pH μπορεί να κυμαίνεται από 2,0 έως 3,8. Οι διαλύτες που χρησιμοποιούνται γενικά στη προκατεργασία με οργανικά οξέα πρέπει να απομακρύνονται από τον αντιδραστήρα, εξατμίζονται, συμπυκνώνονται και ανακυκλώνονται για να μειωθεί το κόστος (Dedes et al., 2020; Deng et al., 2023; Kumar et al., 2009; Li et al., 2022).

#### 2.2.3.2 Οζονόλυση

Το όζον είναι ένα ισχυρό οξειδωτικό που επιλεκτικά οξειδώνει και αποικοδομεί τη λιγνίνη στη βιομάζα χωρίς να επηρεάζεται η κυτταρίνη. Για αυτό το λόγο η προκατεργασία με όζον παρουσιάζει υψηλή αποτελεσματικότητα απολιγνινοποίησης χωρίς να παράγονται παράγονται τοξικές ενώσεις. Η οζονόλυση λαμβάνει χώρα σε θερμοκρασία δωματίου και σε φυσιολογικές πιέσεις χωρίς να σχηματιστούν παρεμποδιστικές ενώσεις που μπορούν να επηρεάσουν την επακόλουθη υδρόλυση για αυτό το λόγο και θεωρείται μια φιλική προς το περιβάλλον μέθοδος. Η υψηλή τιμή του όζοντος περιορίζει την εφαρμογή του σε μεγάλη κλίμακα, διότι αυξάνει το κόστος της διεργασίας. Οι περισσότερες προκατεργασίες με όζον γίνονται σε σταθερή κλίση σε διαλύματα ή σε διαλύματα περιεκτικότητας 45% οξικό οξύ.

Σε πολλά είδη λιγνοκυτταρινούχου βιομάζας έχει αποδειχθεί ότι αποδομεί κυρίως την λιγνίνη και σε μικρότερο ποσοστό την ημικυτταρίνη, ενώ η κυτταρίνη όπως αναφέρθηκε δεν επηρεάζεται. Με βάση τη βιβλιογραφία διαπιστώθηκε ότι οι αποδόσεις γλυκόζης ήταν ανάλογες με τη συγκέντρωση του όζοντος και τον χρόνο προκατεργασίας, με συγκεντρώσεις γλυκόζης να φθάνουν τα 1,1 mg/ml μετά από 24 ώρες επεξεργασίας με όζον (Alvira et al., 2010; Kumar et al., 2009; Li et al., 2022).

#### 2.2.3.3 Όξινη υδρόλυση

Μέσω της προκατεργασίας με όξινη υδρόλυση απελευθερώνονται τα μονομερή των σακχάρων και αυξάνεται η απόδοση της ενζυμικής υδρόλυσης που ακολουθεί. Η όξινη προκατεργασία επικεντρώνεται κυρίως στην αποικοδόμηση και τη διαλυτοποίηση της ημικυτταρίνης, η οποία έχει την πιο χαλαρή δομή μεταξύ των τριών βασικών συστατικών της βιομάζας. Τα πιο συχνά χρησιμοποιούμενα οξέα είναι τα θειικό και τα υδροχλωρικό οξέα, καθώς και ανόργανα, όπως το νιτρικό οξύ και το φωσφορικό οξύ, αλλά και οργανικά οξέα, όπως το μυρμηκικό οξύ, το οξικό οξύ και το οξαλικό οξύ. Η συγκέντρωση οξέος και η θερμοκρασία αντίδρασης, η αναλογία στερεού προς υγρό και ο τύπος του οξέος είναι οι βασικές παράμετροι που επηρεάζουν την απόδοση της προκατεργασίας. Αν και η προκατεργασία με αραιό οξύ μπορεί να βελτιώσει σημαντικά την υδρόλυση της κυτταρίνης, το κόστος της είναι συνήθως υψηλότερο από εκείνο των φυσικοχημικών διαδικασιών προκατεργασίας, όπως η έκρηξη ατμού. Αφού απαιτεί αντιδραστήρες που να αντέχουν τα ισχυρά οξέα και τα οξέα θα πρέπει να εξουδετερωθούν πριν απελευθερωθούν στο περιβάλλον.

Αποτελεσματική προκατεργασία της λιγνοκυτταρινούχου βιομάζας φαίνεται ότι λαμβάνει χώρα με όξινη υδρόλυση με διάλυμα θειικού οξέος συγκέντρωσης κάτω από 4% w/v. Το προτέρημα του θειικού οξέος είναι ότι είναι αποτελεσματικό ενώ έχει χαμηλό κόστος. Διαλύματα αραιού θειικού οξέος έχουν χρησιμοποιηθεί για την εμπορική παραγωγή φουρφουράλης. Η ανάμειξη του αραιού θειικού οξέος με την βιομάζα υδρολύει την ημικυτταρίνη σε ξυλόζη και άλλα σάκχαρα και στη συνέχεια συνεχίζει να διασπά την ξυλόζη για να σχηματίσει φουρφουράλη. Η απόδοση της υδρόλυσης της κυτταρίνης σε γλυκόζη αυξάνονται λόγω της απομάκρυνσης της ημικυτταρίνης σε σχεδόν 100%, όταν υπάρχει πλήρη υδρόλυση ημικυτταρίνης. Ευνοϊκότερες συνθήκες για την υδρόλυση της κυτταρίνης όταν η βιομάζα προκατεργάζεται με αραιό οξύ είναι υψηλές θερμοκρασίες. Εκτός από αραιό θειικό οξύ έχουν χρησιμοποιηθεί και το νιτρικό οξύ, το υδροχλωρικό οξύ και το φωσφορικό οξύ.

Βιομάζα προερχόμενη από καλαμπόκι (corn stover) υποβλήθηκε σε προκατεργασία με αραιό θειικό οξύ σε έναν κατακόρυφο αντιδραστήρα πιλοτικής κλίμακας, με σταθερό χρόνο παραμονής περίπου 1 λεπτό σε θερμοκρασίες που κυμαίνονταν από 180 έως 200°C, καθώς και φορτίσεις στερεών μεταξύ 25% και 35% (w/w) και φορτίσεις οξέος 0,03-0,06 g οξέος/g ξηρής βιομάζας. Όλα τα προκατεργασμένα δείγματα έδειξαν υψηλότερους πόρους από το μη προκατεργασμένο.

Επίσης πραγματοποιήθηκαν πειράματα για να προσδιοριστεί ο βέλτιστος χρόνος παραμονής, θερμοκρασία και συγκέντρωση θειικού οξέος. Βιομάζα που προέρχονταν από καλαμπόκι (corn stover) προκατεργάστηκε με συγκεντρώσεις θειικού οξέος 2%, 4% και 6% στους 80, 100 και 120°C. Οι βέλτιστες συνθήκες για την προκατεργασία του καλαμποκιού ήταν συγκέντρωση θειικού οξέος 2,0% και χρόνος της κατεργασίας 43 λεπτά στους 120°C. Ελήφθη απόδοση ξυλόζης έως 77%, ενώ η απόδοση γλυκόζης ήταν μόνο 8,4%. Η αντίστοιχη στερεά φάση έδειξε καλή ευαισθησία στην ενζυματική υδρόλυση, οδηγώντας σε διαλύματα που περιέχουν έως και 42,1 g γλυκόζης/100 g υποστρώματος, ισοδύναμη με απόδοση μετατροπής 70% υπό τις βέλτιστες συνθήκες (Deng et al., 2023; Kumar et al., 2009; Li et al., 2022).

#### 2.2.3.4 Ήπια όξινη υδρόλυση

Επίσης μπορεί να εφαρμοστεί και ήπια όξινη προκατεργασία, όπου χρησιμοποιούνται οξέα σε μικρότερες συγκεντρώσεις. Με4 βάση την βιβλιογραφία η ήπια όξινη υδρόλυση με συνθήκες 1 N H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, 97°C, 2.5 h στα προϊόντα της πυρόλυσης οδήγησε σε 80-85% μετατροπή της κυτταρίνης σε σάκχαρα, με πάνω από το 50% αυτών να είναι γλυκόζη (Kumar et al., 2009).

#### 2.2.3.5 αλκαλική υδρόλυση

Η λιγνοκυτταρινούχος βιομάζα μπορεί επίσης να προκατεργαστεί με αλκαλικά διαλύματα. Σε αυτή τη μέθοδο σημαντικό ρόλο έχει η περιεκτικότητα των υλικών σε λιγνίνη. Ο συγκεκριμένος τύπος προκατεργασίας απαιτεί χαμηλότερες θερμοκρασίες και πιέσεις συγκριτικά με άλλες μεθόδους. Το αρνητικό είναι ότι η αλκαλική υδρόλυση μπορεί να πραγματοποιηθεί σε συνθήκες περιβάλλοντος, αλλά οι χρόνοι προκατεργασίας είναι της τάξης των ωρών ή ημερών παρά των λεπτών ή των δευτερολέπτων. Συγκριτικά με την όξινη υδρόλυση, οι αλκαλικές διεργασίες προκαλούν λιγότερη αποικοδόμηση των σακχάρων και πολλά από τα καυστικά άλατα μπορούν να ανακτηθούν και/ή να αναγεννηθούν. Το κύριο αλκαλικό διάλυμα που έχει μελετηθεί είναι το υδροξείδιο του νατρίου. Αλλά έχουν επίσης μελετηθεί και τα υδροξείδια καλίου, ασβεστίου και αμμωνίου. Από τα τέσσερα αυτά το φθηνότερο είναι το υδροξείδιο του ασβεστίου, επειδή είναι δυνατό να ανακτηθεί το ασβέστιο από ένα υδατικό σύστημα με την μορφή αδιάλυτου ανθρακικού ασβεστίου μέσω εξουδετέρωσης. Το υδροξείδιο του ασβεστίου μπορεί στη συνέχεια να αναγεννηθεί χρησιμοποιώντας τεχνολογία ασβεστοκάμινου. Η προκατεργασία με υδροξείδιο του ασβεστίου αφαιρεί την λιγνίνη και την ημικυτταρίνη, γεγονός που αυξάνει τον δείκτη κρυσταλλικότητας.

Στην βιβλιογραφία έχουν αναφερθεί συσχετίσεις μεταξύ της ενζυμικής πεπτικότητας και τριών δομικών παραγόντων, συγκεκριμένα με την περιεκτικότητα σε λιγνίνη, την κρυσταλλικότητα και την περιεκτικότητα σε ακετύλιο. Συγκεκριμένα η εκτεταμένη απολιγνίνωση επιτρέπει την υψηλή πεπτικότητα ανεξάρτητα από την περιεκτικότητα σε ακετύλιο και την κρυσταλλικότητα. Επίσης η

απολιγνίνωση και η αποακετυλίωση βοηθούν στην ενζυματική υδρόλυση. Ακόμη βρέθηκε ότι η κρυσταλλικότητα επηρεάζει σημαντικά τον αρχικό ρυθμό υδρόλυσης αλλά έχει μικρότερη επίδραση στη τελική απόδοση. Μέσω την αλκαλική προκατεργασία μπορούν να απομακρυνθεί ένα σημαντικό ποσοστό της ημικυτταρίνης και της λιγνίνης με αποτέλεσμα να αυξηθεί η αποτελεσματικότητα του ενζύμου άρα να βελτιωθεί η μετέπειτα υδρόλυση.

Η προκατεργασία καλαμποκιού με υδροξείδιο του ασβεστίου, συγκεκριμένα 0,5 g Ca(OH)<sub>2</sub>/g βιομάζας, σε οξειδωτικές και μη οξειδωτικές συνθήκες στους 25, 35, 45, και 55°C. Τα αποτελέσματα της ενζυμικής υδρόλυσης μετέπειτα έδειξαν ότι η προκατεργασία αυτή επηρέασε την αλλαγή της δομής της βιομάζας. Η εκτεταμένη απολιγνίνωση λάμβανε χώρα υπό οξειδωτικές συνθήκες και με μεγαλύτερη συγκέντρωση υδροξειδίου του ασβεστίου, έως και 0,17 g Ca(OH)<sub>2</sub>/g βιομάζας. Επίσης η αποακετυλίωση έφτασε στο μέγιστο μέσα σε 1 εβδομάδα και δεν υπήρχαν σημαντικές διαφορές μεταξύ μη οξειδωτικών και οξειδωτικών συνθηκών καθώς και στις δύο συνθήκες αφαιρέθηκε περίπου το 90% των ομάδων ακετυλίου σε μια εβδομάδα σε όλες τις θερμοκρασίες που μελετήθηκαν. Η απολιγνίνωση φάνηκε να εξαρτάται περισσότερο από την θερμοκρασία και την παρουσία οξυγόνου. Ακόμη η λιγνίνη και η ημικυτταρίνη αφαιρέθηκαν ή διαλυτοποιήθηκαν σε ένα ποσοστό, ενώ η κυτταρίνη δεν επηρεάστηκε σε ήπιες θερμοκρασίες (25-55°C). Ο βαθμός της κρυσταλλικότητας φαίνεται να αυξάνεται με την απολιγνίνωση από 43% σε 60%. Αυτό οφείλεται στο ότι αφαιρέθηκαν άμορφες δομές, δηλαδή λιγνίνη και ημικυτταρίνη. Η αφαίρεση της λιγνίνης αυξάνει την αποτελεσματικότητα του ενζύμου εξαλείφοντας τις μη παραγωγικές θέσεις προσρόφησης και αυξάνοντας την πρόσβαση του ενζύμου στην κυτταρίνη και την ημικυτταρίνη.

Το υδροξείδιο του ασβεστίου έχει χρησιμοποιηθεί για την προκατεργασία του καλαμποκιού στους 100 °C για 13 ώρες με αποτέλεσμα την αύξηση της ενζυμικής υδρόλυσης του αραβοσίτου. Άλλα σε έρευνα που κάλυψε διαφορετικές θερμοκρασίες, από 100 έως 140 °C οι βέλτιστες συνθήκες προκατεργασίας του καλαμποκιού προσδιορίστηκαν ως συγκέντρωση υδροξειδίου του ασβεστίου 0,075 g Ca(OH)<sub>2</sub>/ g ξηρής βιομάζας, νερού 5 g H<sub>2</sub>O/g ξηρής βιομάζας και η θέρμανση για 4 h για 120°C. Αυτή η προκατεργασία μπορεί να οδηγήσει σε αποδώσεις που πλησιάζουν το 100%.

Όσον αφορά την προκατεργασία της λιγνοκυτταρινούχου βιομάζας με αραιό υδροξείδιο του νατρίου NaOH έχει βρεθεί ότι προκαλεί διόγκωση, οδηγώντας σε αύξηση της εσωτερικής επιφάνειας, μείωση του βαθμού πολυμερισμού, μείωση της κρυσταλλικότητας, διαχωρισμό των δεσμών μεταξύ λιγνίνης και υδατανθράκων και αποδομή της δομής της λιγνίνης(Kumar et al., 2009).

#### 2.2.3.6 Προκατεργασία με χρήση ιοντικών υγρών

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. Ανήκουν στους πράσινους διαλύτες. Τα κύρια πλεονεκτήματα της προκατεργασίας με ιοντικά υγρά είναι η χαμηλή πίεση ατμών, η υψηλή θερμική σταθερότητα, η χημική σταθερότητα, η μη αναφλεξιμότητα, η ικανότητα διατήρησης της υγρής φάσης σε ένα ευρύ πεδίο θερμοκρασιών και ο μη σχηματισμός τοξικών και εκρηκτικών αερίων. Στα ιοντικά υγρά διαλύονται οι υδατάνθρακες και η λιγνίνη, γιατί δημιουργούνται δεσμοί υδρογόνου μεταξύ των άνυδρων χλωριούχων ιόντων των ιοντικών υγρών και των πρωτονίων υδροξυλίου των σακχάρων σε

στοιχειομετρική αναλογία 1:1 και έτσι διαταράσσονται οι μη ομοιοπολικές αλληλεπιδράσεις μεταξύ της κυτταρίνης, της ημικυτταρίνης και της λιγνίνης, ενώ ελαχιστοποιείται ο σχηματισμός παραπροϊόντων. Για την μεγάλης κλίμακας εφαρμογή αυτού του είδους προκατεργασίας θα πρέπει να αναπτυχθούν μέθοδοι ανακύκλωσης των ιοντικών υγρών και η απομάκρυνση των υπολειμμάτων τους. Οικονομικά δεν είναι ακόμα αποδοτική διαδικασία (Alvira et al., 2010; Li et al., 2022).

#### 2.2.4 Βιολογικές προκατεργασίες

Η βιολογική προκατεργασία της λιγνοκυτταρινούχου βιομάζας είναι μια φιλική προς το περιβάλλον διεργασία, κατά την οποία δεν παράγονται τοξικές ουσίες ή παρεμποδιστές της ζύμωσης. 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. Το αρνητικό αυτής της μεθόδου είναι ο μεγάλος χρόνος προκατεργασίας, 30 με 60 ημέρες, ώστε να επιτευχθεί η απολιγνοποίηση και η χαμηλή τελική συγκέντρωση της γλυκόζης. Από την άλλη τα θετικά της βιολογικής προκατεργασίας είναι η χαμηλή ενεργειακή κατανάλωση, το χαμηλό κόστος κεφαλαίου, η μηδενική απόρριψη τοξικών ουσιών στο περιβάλλον, η χαμηλή παραγωγή παρεμποδιστών και οι ήπιες συνθήκες αντίδρασης. Σημαντικό είναι να αναφερθούν οι παράμετροι που επηρεάζουν την βιολογική προκατεργασία. Οι παράγοντες αυτοί είναι σύσταση της βιομάζας, οι μικροοργανισμοί που χρησιμοποιούνται, η θερμοκρασία, η τιμή του pH και ο χρόνος της διεργασίας καθώς και το ποσοστό της υγρασίας και ο ρυθμός αερισμού. Ο συνδυασμός βιολογικής προκατεργασίας με άλλα είδη προκατεργασίας είναι πιο αποδοτικός συγκριτικά με την κάθε μέθοδο χωριστά. Συγκεκριμένα ο συνδυασμός βιολογικής και ήπιας φυσικής ή χημικής προκατεργασίας απαιτεί μικρότερο χρόνο προκατεργασίας (Alvira et al., 2010; Sindhu et al., 2016; Zhang et al., 2021b).

#### 2.2.5 Άλλες μέθοδοι

##### 2.2.5.1 Πυρόλυση

Η πυρόλυση επίσης χρησιμοποιείται για την προκατεργασία της λιγνοκυτταρινούχου βιομάζας. Όταν η προκατεργασία της βιομάζας γίνεται σε θερμοκρασίες μεγαλύτερες από 300 °C η κυτταρίνη αποσυντίθεται γρήγορα σε αέρια προϊόντα και υπολειπόμενο εξανθράκωμα. Σε πιο χαμηλές θερμοκρασίες πέφτει η απόδοση της διεργασίας και τα προϊόντα είναι πιο ασταθή (Kumar et al., 2009).

##### 2.2.5.2 Οξειδωτική απολιγνιτοποίηση

Μέσω της συνδυαστικής προκατεργασίας της οξειδωτικής απολιγνιτοποίησης αποικοδομείται η λιγνίνη. Στη συγκεκριμένη προκατεργασία χρησιμοποιείται το ένζυμο υπεροξειδάση παρουσία υπεροξειδίου του υδρογόνου H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. Σε προκατεργασία της βιομάζας με 2% υπεροξείδιο του υδρογόνου και με υπεροξειδάση στους 30 °C και χρόνο 8 h, το 50% της λιγνίνης και το μεγαλύτερο ποσοστό της ημικυτταρίνης υδρολύθηκε, ενώ η παραγωγή της γλυκόζης από την κυτταρίνη στην επακόλουθη υδρόλυση είχε απόδοση 95% σε συνθήκες 45°C για 24 h με την ύπαρξη κυτταρινάσης (Kumar et al., 2009).

#### 2.2.5.3 Προκατεργασία με παλμικά ηλεκτρικά πεδία

Κατά προκατεργασία με παλμικά ηλεκτρικά πεδία (PEF) εφαρμόζεται υψηλή τάση μικρής ριπής σε δείγμα, το οποίο είναι τοποθετημένο μεταξύ δύο ηλεκτροδίων. Με τη δημιουργία ηλεκτρικού πεδίου μεταξύ δύο παράλληλων ηλεκτροδίων, η ένταση πεδίου ( $E$ ) δίνεται με βάση την εξίσωση  $E=V/d$ , όπου  $V$  είναι η τάση του ηλεκτρικού πεδίου και  $d$  η απόσταση ανάμεσα σε δυο ηλεκτρόδια.

Η προκατεργασία με PEF μπορεί να επηρεάσει τη δομή των φυτικών ιστών. Όταν εφαρμόζεται ένα εξωτερικό ηλεκτρικό πεδίο υψηλής τάσης, επάγεται ένα ηλεκτρικό δυναμικό κατά μήκος της κυτταρικής μεμβράνης, το οποίο οδηγεί σε ραγδαία ηλεκτρική διάσπαση και τοπικές δομικές αλλαγές της κυτταρικής μεμβράνης και του κυτταρικού τοιχώματος και επομένως συνολικά του φυτικού ιστού. Η εφαρμογή του ηλεκτρικού πεδίου αυξάνει την διαπερατότητα μάζας και, σε ορισμένες περιπτώσεις, οδηγεί στη μηχανική ρήξη του φυτικού ιστού. Άρα η εφαρμογή παλμικών ηλεκτρικών πεδίων διαρρηγνύει την κυτταρική μεμβράνη και μεταβάλλει τη δομή στο σημείο εφαρμογής με αυτό τον τρόπο καθιστά ευκολότερη την ανταλλαγή ουσιών μεταξύ του κυτταρικού περιβάλλοντος. Το γεγονός αυτό διευκολύνει την είσοδο των υδρολυτικών ενζύμων ή οξέων στα κύτταρα της βιομάζας, τα οποία χρησιμοποιούνται για τη διάσπαση της κυτταρίνης. Έχει βρεθεί ότι η εφαρμογή παλμικών ηλεκτρικών πεδίων σε λιγνοκυτταρινούχο βιομάζα σε 2000 παλμούς και ηλεκτρικής ισχύος 10 kV/cm βελτιώνει την υδρόλυση της κυτταρίνης.

Η προκατεργασία με παλμικά ηλεκτρικά πεδία αποτελείται από μια συσκευή χωρίς κινούμενα μέρη. Η βιομάζα που προκατεργάζεται βρίσκεται ανάμεσα σε δυο ηλεκτρόδια, τα οποία εκπέμπουν παλμούς δημιουργώντας ένα ηλεκτρικό πεδίο ισχύος 0,1–80 kV/cm για χρονικό διάστημα  $10^{-2}$  και  $10^{-9}$ s. Αξίζει να σημειωθεί ότι είναι μη θερμική μέθοδος, έτσι αποφεύγεται η μετουσίωση των ενζύμων. Πειραματικά ο φυτικός ιστός τοποθετείται μεταξύ δύο ηλεκτροδίων και η ηλεκτρική εκκένωση εφαρμόζεται με τη μορφή παλμών. Μια τυπική εγκατάσταση παλμικών ηλεκτρικών πεδίων αποτελείται από γεννήτρια παλμών, θάλαμο επεξεργασίας, σύστημα λήψης και ελέγχου δεδομένων και εξοπλισμό χειρισμού του υλικού. Το ηλεκτρικό πεδίο που εφαρμόζονται για μη αναστρέψιμη διαπερατότητα φυτικού κυττάρου είναι συνήθως πάνω από 1,0 kV/cm, συγκεκριμένα χρησιμοποιώντας υψηλά ηλεκτρικά πεδία δηλαδή 5-20 kV/cm, τα φυτικά κύτταρα φαίνεται να διασπώνται σε σημαντικό ποσοστό. Η διάρκεια των ηλεκτρικών παλμών είναι της τάξης των  $10^{-6}$  s.

Τα κύρια πλεονεκτήματα της προκατεργασίας με παλμικά ηλεκτρικά πεδία είναι το γεγονός ότι εφαρμόζεται σε συνθήκες περιβάλλοντος, η χρήση ενέργειας είναι χαμηλή επειδή η χρονική διάρκεια των ηλεκτρικών παλμών είναι πολύ μικρή και η χρήση μη περίπλοκου εξοπλισμού (Hassan et al., 2018; Kumar et al., 2009).

#### 2.2.5.4 Διαλυτόλυση με τη βοήθεια μικροκυμάτων(Microwave-assisted solvolysis)

Η Διαλυτόλυση με τη βοήθεια μικροκυμάτων(Microwave-assisted solvolysis) χρησιμοποιείται για την προκατεργασία της λιγνοκυτταρινούχου βιομάζας.

Στις συμβατικές μεθόδους θέρμανσης η βιομάζα διαλύεται σε μικρά κομμάτια για να αποφευχθεί η δημιουργία μεγάλης διαβάθμισης στις τιμές της θερμοκρασίας. Η θέρμανση γίνεται με επαγωγή ή ατμό υψηλής πίεσης και θερμοκρασίας 160-250 °C.



Η θέρμανση με ακτινοβολία έχει αποδειχθεί ότι ενισχύεται η ενζυματική σακχαροποίηση, διότι διογκώνονται και του κατακερματίζονται οι ίνες της βιομάζας αποτέλεσμα την ομοιόμορφη και ταχεία θέρμανση. Βέβαια δεν έχει κανένα αποτέλεσμα για θερμοκρασίες ίσες και κάτω των 100 °C. Η αποδοτικότητα της διεργασίας αυτής εξαρτάται από την βιομάζα, συγκεκριμένα από τις διηλεκτρικές ιδιότητες της. Η βιομάζα δεν απορροφά σε μεγάλο ποσοστό την ακτινοβολία με μικροκύματα, για να βελτιωθεί αυτό αυξάνεται η υγρασία και προστίθενται στο διάλυμα ανόργανες ουσίες (Hassan et al., 2018).

#### 2.2.5.5 Πυρόλυση με τη βοήθεια μικροκυμάτων (Microwave-assisted pyrolysis)

Στην Πυρόλυση με τη βοήθεια μικροκυμάτων η βιομάζα μετατρέπεται σε βιοκαύσιμα ή άλλες χημικές ουσίες. Μέσω της πυρόλυσης η μετατροπή γίνεται σε με μεγαλύτερη απόδοση και σε μικρότερο χρόνο. Υπό την επίδραση μικροκυμάτων μέσω της πυρόλυσης το 50% της βιομάζας μετατρέπεται σε βιοαέριο. Το έλαιο το οποίο προκύπτει από αυτή τη διεργασία περιέχει φαινολικές ουσίες που προέρχονται από την λιγνίνη της βιομάζας.

Η θέρμανση με μικροκύματα απαιτεί λιγότερο χρόνο για να πιάσει την θερμοκρασία στόχο. αφού ο ρυθμός θέρμανσης με μικροκύματα ήταν 42% μεγαλύτερος από τις συμβατικές μεθόδους (Hassan et al., 2018).

#### 2.2.5.6 Προκατεργασία με Ακτινοβολία δέσμης ηλεκτρονίων (Electron beam irradiation)

Στην Προκατεργασία με Ακτινοβολία δέσμης ηλεκτρονίων χρησιμοποιούνται επιταχυνόμενες δέσμες ηλεκτρονίων, οι οποίες προέρχονται από έναν γραμμικό επιταχυντή. Η ακτινοβολία διαταράσσει η δομή των πολυμερών (λιγνίνη, κυτταρίνη, ημικυτταρίνη) μέσω παραγωγής ελεύθερων ριζών, σχηματισμό σταυροειδών συνδέσμων ή σχάση αλυσίδας και μείωση του βαθμού πολυμερισμού.

Η προκατεργασία αυτή συνδυάζεται συνηθώς με άλλες μεθόδους γιατί ενώ είναι αποδοτική στον αποπολυμερισμό της κυτταρίνης απαιτείται μια ακόμα προκατεργασία ώστε να υδρολυθούν οι ημικυτταρίνη και η λιγνίνη (Hassan et al., 2018).

#### 2.2.5.7 Προκατεργασία με Υψηλή υδροστατική πίεση (High hydrostatic pressure HHP)

Η υψηλή υδροστατική πίεση εφαρμόζεται κυρίως στη βιομηχανία τροφίμων για μην θερμική παστερίωση. Η λειτουργία της βασίζεται στην εφαρμογή υψηλής πίεσης 100–600 MPa. Η κατεργασία με υψηλή υδροστατική πίεση βασίζεται σε δύο θεμελιώδεις αρχές, ότι η πίεση κατανέμεται ομοιόμορφα σε όλη την βιομάζα, ανεξάρτητα από το σχήμα και το μέγεθός και ότι η πίεση βοηθά όλες τις δομικές αντιδράσεις και αλλαγές, οι οποίες οδηγούν στην μείωση του όγκου. Η μέθοδος αυτή πλεονεκτεί συγκριτικά με τις θερμικές, διότι είναι ανεξάρτητη της μάζας αλλά και του χρόνου της διεργασίας. Ακόμη επηρεάζονται μόνο οι δεσμοί υδρογόνου και δεν επηρεάζονται οι ομοιοπολικοί δεσμοί, με αποτέλεσμα την μείωση του χρόνου επεξεργασίας. Η εφαρμογή της περιορίζεται επειδή η εφαρμογή πίεσης μπορεί να μεταβάλλει την δομή ενός ενζύμου, άρα να επηρεάσει τον μηχανισμό της αντίδρασης αλλά και την ενεργότητα του.

Με αυτή τη μέθοδο δεν αλλοιώνονται τα τρόφιμα και δεν διακινδυνεύεται η ασφάλεια. Η εφαρμογή αυτής της μεθόδου γίνεται και βιομηχανικά για παστερίωση τροφίμων, με μειωμένο λειτουργικό κόστος αλλά με αυξημένο κόστος αγοράς του κατάλληλου εξοπλισμού.

Η προκατεργασία με Υψηλή υδροστατική πίεση μπορεί να εφαρμοστεί στη λιγνοκυτταρινούχο βιομάζα, καθώς η αλλαγή την πίεσης αλλά και του χρόνου προκατεργασίας επηρεάζει την ενζυμική υδρόλυση.

Με εφαρμογή πίεσης 300–400 MPa για 15–45 min σε πολύ ευκαλύπτου ο ρυθμός της ενζυμικής υδρόλυσης του ενζύμου ξυλανάσης αυξήθηκε 5-10 φορές. Επίσης, εφαρμόστηκε υψηλή υδροστατική πίεση ύψους 400–800MPa σε συνδυασμό με χημικών ενώσεων για την προκατεργασία σακχαροκάλαμου, με αυτόν τον τρόπο αυξήθηκε η ευαισθησία της βιομάζας στην ενζυματική υδρόλυση και η τελική συγκέντρωση της γλυκόζης.

Η συγκεκριμένη μέθοδος εφαρμόζεται για την προκατεργασία της βιομάζας, διότι δεν επηρεάζεται η ενεργότητα και η σταθερότητα των υδρολυτικών ενζύμων(Hassan et al., 2018).

#### 2.2.5.8 Προκατεργασία με ομογενοποίηση υπό υψηλή πίεση (High-pressure homogenization HPH)

Η ομογενοποίηση υπό υψηλή πίεση είναι μια μηχανική μέθοδος που εφαρμόζεται για την ρήξη των κυττάρων και την ανάκτηση βιοπροϊόντων από το εσωτερικό του κυττάρου. Σε αυτή την μέθοδο χρησιμοποιείται μια αντλία, η οποία ασκώντας πίεση αναγκάζει το διάλυμα να περάσει μέσω μιας βαλβίδας, έτσι πραγματοποιείται η ομογενοποίηση. Ονομάζεται ομογενοποίηση υπό υψηλή πίεση εφόσον η τιμή της πίεσης είναι μέχρι και 150–200 MPa και ομογενοποίηση υψηλής πίεσης στην περίπτωση που η πίεση έχει τιμή στο εύρος 350–400 MPa. Όσον αφορά την εφαρμογή της ομογενοποίησης υπό υψηλή πίεση σε προκατεργασία βιομάζας, αποδομεί την διάταξη της λιγνοκυτταρινούχου βιομάζας με αποτέλεσμα να δημιουργείται η απαραίτητη επιφάνεια ώστε να λειτουργήσουν τα υδρολυτικά ένζυμα.

Σε προκατεργασία βιομάζας με ομογενοποίηση υπό υψηλή πίεση παρατηρήθηκε ότι μειώθηκε το μέγεθος των σωματιδίων της βιομάζας, επομένως αυξήθηκε και η διαθέσιμη επιφάνεια επαφής της βιομάζας με τα υδρολυτικά ένζυμα, κάτι που οδήγησε στην αύξηση της απόδοσης της διεργασίας. Συγκεκριμένα εφαρμόστηκε πίεση 10 MPa (Hassan et al., 2018).

#### 2.2.6 Σύνοψη

Η προκατεργασία με μηχανική καταπόνηση μειώνει την κρυσταλλικότητα της κυτταρίνης αλλά απαιτεί υψηλά ποσά ενέργειας, μεγαλύτερη από αυτήν που μπορούμε να εξάγουμε από την βιομάζα. Η προκατεργασία με την έκρηξη ατμού αποδομείται η ημικυτταρίνη και μετασχηματίζεται η λιγνίνη, επίσης είναι αποτελεσματική οικονομική διεργασία. Αλλά δεν μπορεί να αποδομήσει πλήρως την λιγνίνη και παράγονται ενώσεις ανασταλτικές για τους μικροοργανισμούς. Ακόμη η προκατεργασία με έκρηξη ιών με παρουσία αμμωνίας αυξάνει την ελεύθερη επιφάνεια, αφαιρεί τη λιγνίνη και την ημικυτταρίνη σε ένα ποσοστό, δεν παράγει αναστολείς για τις κατάντη διεργασίες. Αντίθετα όμως δεν είναι αποτελεσματική για βιομάζα υψηλή σε επίπεδα λιγνίνης. Ακόμη η προκατεργασία της βιομάζας με την έκρηξη διοξειδίου του άνθρακα αυξάνει την ελεύθερη επιφάνεια, είναι οικονομικά αποδοτική και δεν προκαλεί σχηματισμό ανασταλτικών ενώσεων, αλλά δεν τροποποιεί τη λιγνίνη ή τις ημικυτταρίνες. Η οζονόλυση μειώνει το ποσοστό της λιγνίνης χωρίς να παράγει τοξικές ενώσεις, αλλά είναι μια ακριβή διεργασία λόγω του μεγάλης ποσότητας όζον που απαιτείται. Η όξινη υδρόλυση υδρολύει την ημικυτταρίνη σε ξυλόζη και άλλα σάκχαρα, καθώς και αλλάζει τη δομή της λιγνίνης, αλλά έχει υψηλό κόστος, διαβρώνεται ο εξοπλισμός και σχηματίζονται τοξικές ουσίες. Η

αλκαλική υδρόλυση αφαιρεί την ημικυτταρίνη και την λιγνίνη και αυξάνει την ελεύθερη επιφάνεια αλλά απαιτούνται μεγάλοι χρόνοι παραμονής, σχηματίζονται μη ανακτήσιμα άλατα και ενσωματώνονται στη βιομάζα. Η προκατεργασία με οργανικό διαλύτη υδρολύει την ημικυτταρίνη και την λιγνίνη, αλλά οι διαλύτες πρέπει να συλλεχθούν από τον αντιδραστήρα, να εξατμιστούν, να συμπυκνωθούν και να ανακυκλωθούν. Επίσης έχει υψηλό κόστος. Η πυρόλυση παράγει αέρια και υγρά προϊόντα. Το αρνητικό είναι ότι παράγεται τέφρα και απαιτεί υψηλές θερμοκρασίες. Η προκατεργασία με παλμικά ηλεκτρικά πεδία λαμβάνει χώρα σε συνθήκες περιβάλλοντος, διαταράσσει τα φυτικά κύτταρα και απαιτεί απλό εξοπλισμό. Βέβαια αυτή η μέθοδος δεν έχει αρκετή έρευνα ακόμα. Η βιολογική προκατεργασία αποδομεί την λιγνίνη και την ημικυτταρίνη και απαιτεί μικρά ποσά ενέργειας, αλλά οι αποδόσεις της υδρόλυσης είναι μικρές (Kumar et al., 2009).

Συχνά εφαρμόζεται και ο συνδυασμός διεργασιών προκατεργασίας. Για παράδειγμα Η ενζυματική υδρόλυση σε τρίματα λεύκας είχε απόδοση 90% σε 24 h όταν τα τρίματα λεύκας είχαν προκατεργαστεί με τον συνδυασμό οξέων και έκρηξης ατμού. Ενώ σε μη προκατεργασμένα τρίματα λεύκας η απόδοση της ενζυματικής υδρόλυσης ήταν 15% (Kumar et al., 2009).

Οι παράγοντες που περιορίζουν την απόδοση της προκατεργασίας είναι η ειδική επιφάνεια, ο βαθμός κρυσταλλικότητας της κυτταρίνης, ο βαθμός πολυμερισμού, το περίβλημα της κυτταρίνης από την ημικυτταρίνη, το ποσοστό της λιγνίνης και η περιεκτικότητα σε ακετύλιο. Η αποικοδόμηση της λιγνίνης και η ενζυματική υδρόλυση, που ακολουθεί, επηρεάζονται από το ποσοστό υγρασίας, το μέγεθος των σωματιδίων της βιομάζας, τον χρόνο προκατεργασίας και τη θερμοκρασία. Έχει αποδεχθεί ότι είναι πιο αποτελεσματικός ο συνδυασμός μεθόδων προκατεργασίας. Ένα παράδειγμα αποτελεί η προκατεργασία με οξύ και με αλκαλικό διάλυμα. Η προκατεργασία με διάλυμα οξέος απολιγνοποιεί την κυτταρίνη, με αποτέλεσμα να αυξάνεται η επιφάνεια. Αυτό το βήμα όμως απαιτεί μεγάλη ποσότητα οξέος. Για να μειωθεί προηγείται προκατεργασία με αλκαλικό διάλυμα. Επίσης η σακχαροποίηση βελτιώνεται με την χρήση αραιού οξέος και έκρηξη ατμού, διότι το αραιό οξύ βελτιώνει την υδρόλυση και την μετατροπή της ξυλόζης, ενώ ταυτόχρονα η έκρηξη ατμού αποικοδομεί την δομή της λιγνοκυτταρινούχου βιομάζας. Σε όλους όμως τους συνδυασμούς προκατεργασιών συγκριτικά με την κάθε προκατεργασία μεμονωμένα, είναι πιο αποδοτική η διάσπαση της κυτταρίνης και της ημικυτταρίνης. Βέβαια, ο χρόνος της προκατεργασίας θα πρέπει να μειωθεί ώστε να είναι βιώσιμη η εφαρμογή της διεργασίας εμπορικά (de Bhowmick et al., 2018).

Τα κυρία προβλήματα που προκύπτουν σχετικά με τις προκατεργασίες είναι να σχεδιαστούν διεργασίες που να είναι οικονομικά αποδοτικές, σε βιομηχανική κλίμακα και φιλικές προς το περιβάλλον. Οι παραδοσιακοί τύποι προκατεργασίας απαιτούν ισχυρές χημικές ουσίες και συμβατικούς μεθόδους θέρμανσης υψηλής ισχύος, οι οποίοι με την σειρά τους απαιτούν υψηλά ποσοστά ενέργειας, κάτι που καταστεί αυτές τις μεθόδους μη φιλικές με το περιβάλλον. Το κόστος της προκατεργασίας μπορεί να φτάσει πάνω και από το 40% του κόστους της συνολικής διεργασίας. Για αυτό το λόγο η έρευνα προσανατολίζεται από τις συμβατικές μεθόδους προκατεργασίας, που θεωρούνται ότι είναι η χημική και η φυσικοχημική, σε βιώσιμες πράσινες προκατεργασίες, όπως η βιολογική. Η βιολογική προκατεργασία όμως χαρακτηρίζεται από μεγάλους χρόνους προκατεργασίας, χαμηλές αποδόσεις καθώς και την μείωση των υδατανθράκων. Τεχνολογίες που προέρχονται από τους τομείς της χημείας με κύριες εφαρμογές στα τρόφιμα φαίνεται να

εφαρμοστούν στην προκατεργασία της λιγνοκυτταρινούχου βιομάζας με μια πράσινη προσέγγιση. Οι διεργασίες αυτές φαίνεται να έχουν χαμηλότερα κόστη και αυξημένη αποδοτικότητα (Hassan et al., 2018).

## 2.3 Υδρόλυση

Η υδρόλυση είναι η διαδικασία με την οποία η κυτταρίνη και η ημικυτταρίνη που περιέχονται στη λιγνινοκυτταρινούχο βιομάζα μετατρέπονται σε ζυμώσιμα σάκχαρα. Συνήθως, αυτή η προκατεργασία οδηγεί στο σχηματισμό δύο κλασμάτων. Το ένα κλάσμα περιέχει αδιάλυτες στερεές ουσίες, κυρίως λιγνίνη και κυτταρίνη, ενώ το δεύτερο κλάσμα είναι υγρό και περιέχει ημικυτταρίνη. Ανάλογα με τη μέθοδο προκατεργασίας, η ημικυτταρίνη είτε έχει ήδη υδρολυθεί σε μονομερή σάκχαρα και μπορεί να μετατραπεί σε αιθανόλη χωρίς περαιτέρω υδρόλυση, είτε απαιτείται πρόσθετη υδρόλυση για να αποπολυμεριστεί πλήρως και να μπορεί να ζυμωθεί το σάκχαρο που περιέχει. Οι βασικότερες μορφές σάκχαρων που παρατηρούνται στην ημικυτταρίνη είναι η μαννόζη στα μαλακά ξύλα (softwoods) και η ξυλόζη στα σκληρά ξύλα (hardwoods) και τα υπολείμματα αγροτικών υλικών, ενώ υπάρχει και μικρή ποσότητα αραβινόζης και γαλακτόζης. Από την άλλη πλευρά, η κυτταρίνη μετατρέπεται σε γλυκόζη. Ανάλογα με τη μέθοδο προκατεργασίας, μπορεί να υδρολυθεί ένα μικρό μέρος της κυτταρίνης σε γλυκόζη, αλλά η πλειονότητα της κυτταρίνης παραμένει ανέγγιχτη και απαιτεί περαιτέρω υδρόλυση. Τα μονομερή σάκχαρα, που προκύπτουν από την υδρόλυση, μπορούν στη συνέχεια να χρησιμοποιηθούν ως πηγές άνθρακα σε διεργασίες ζύμωσης για την παραγωγή βιοκαυσίμων, όπως η αιθανόλη και το μεθάνιο, ή για την παραγωγή διάφορων πολύτιμων ενώσεων, όπως το γαλακτικό οξύ, το ηλεκτρικό οξύ και τα ωμέγα-3 λιπαρά οξέα. Επίσης, μπορούν να χρησιμοποιηθούν ως πρώτες ύλες σε χημικές ή ενζυμικές διεργασίες μετατροπής για την παραγωγή προηγμένων χημικών ενώσεων με διάφορες εφαρμογές στη βιομηχανία πολυμερών, τη σύνθεση φαρμάκων ή ως διατροφικά και φαρμακευτικά προϊόντα. Μια ιδιαίτερα ενδιαφέρουσα κατηγορία χημικής σύνθεσης είναι οι χημικές πλατφόρμες, οι οποίες μπορούν να οδηγήσουν στην παραγωγή βιο-μονομερών και βιοπλαστικών. Αυτή η συγκεκριμένη κατηγορία αποτελεί μια εναλλακτική λύση στα παραδοσιακά πετροχημικά συνθετικά πολυμερή, με στόχο την παραγωγή φουρανίων ως δομικών στοιχείων για περαιτέρω αξιοποίηση, ενώ αυτά είναι ανεπιθύμητα προϊόντα στη μικροβιακή ζύμωση. Οι δύο συνηθισμένες μέθοδοι υδρόλυσης είναι: (1) η υδρόλυση με ισχυρά οξέα και (2) η ενζυμική υδρόλυση. Η υδρόλυση με ισχυρά οξέα κυρίως πραγματοποιείται με τη χρήση ανόργανων οξέων, και το 72% θειικό οξύ χρησιμοποιείται ευρέως. Όσον αφορά την ενζυμική υδρόλυση, είναι απαραίτητη η φυσική ή χημική προκατεργασία για να μειωθεί η κρυσταλλικότητα της κυτταρίνης, να αυξηθεί το πορώδες του υλικού και να αφαιρεθεί η λιγνίνη (Dedes et al., 2020; Lavarack et al., 2002; Καλλιοπη, n.d.).

### 2.3.1 Ενζυμική υδρόλυση

Η ενζυμική υδρόλυση ως μέσο παραγωγής γλυκόζης είναι πιο στοχευμένη και αποτελεσματική μέθοδος συγκριτικά με την υδρόλυση με οξέα και είναι φιλική φιλικό προς το περιβάλλον. Ωστόσο, η πλήρης αποδόμηση της κυτταρίνης είναι μια δύσκολη διαδικασία που απαιτεί πολλά ένζυμα, όπου το καθένα έχει τον δικό του ρόλο. Η ενζυματική υδρόλυση είναι η διαδικασία διάσπασης των

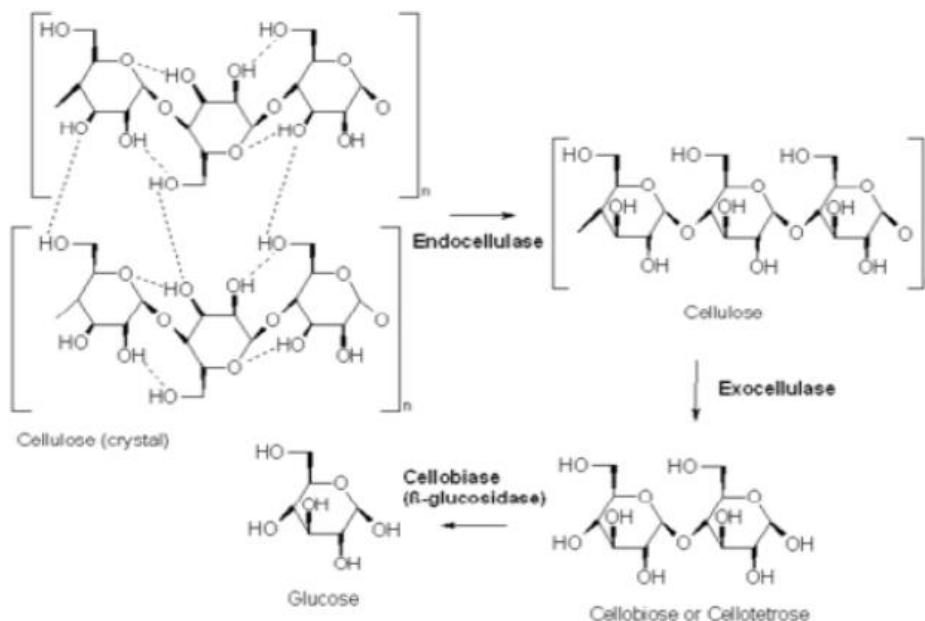
πολυμερών υδατανθράκων στα μονομερή τους σάκχαρα. Οι συνήθης συνθήκες της υδρόλυσης είναι η τιμή του pH 4,5 και η θερμοκρασία 50 °C.

Στην ενζυματική υδρόλυση χρησιμοποιούνται διαφορετικά ένζυμα. Οι κυτταρινάσες υδρολύουν τους β-1,4 δεσμούς της κυτταρίνης. Επίσης, οι ξυλανάσες είναι τα ένζυμα που διασπούν τους δεσμούς ανάμεσα στις ξυλάνες. Η πλήρη υδρόλυση της ξυλάνης απαιτεί την δράση πολλών ξυλανάσων με διαφορετική εξειδίκευση. Οι βέλτιστες συνθήκες δράσης των κυτταρινασών είναι σε θερμοκρασίες 40-50 °C και pH 4-5. Παρόμοιες συνθήκες ισχύουν και για τις ξυλανάσες.

Οι υδρολυτικές κυτταρινάσες χωρίζονται σε τρεις κατηγορίες: εξω-1,4-β-D-γλυκανάσες (κελλοβιοϋδρολάσες, CBHs, EC 3.2.1.176), ενδο-1,4-β-D-γλυκανάσες (EGs, EC 3.2.1.4) και β-γλυκοσιδάσες (BGLs, EC 3.2.1.21). Οι εξω-1,4-β-D-γλυκανάσες προσκολλώνται στα άκρα των αλυσίδων κυτταρίνης που κινούνται παράλληλα με τις μονάδες κυτταροβιόζης που απελευθερώνουν ίνες. Οι κυτταρινάσες παράγονται κυρίως από μύκητες, βακτήρια και πρωτόζωα. Επίσης οι κυτταρινάσες μπορούν να παραχθούν από φυτά και ζώα, τότε η αντίδραση μπορεί να γίνει σε θερμοκρασία σώματος. Με βάση την βιβλιογραφία η λιγνοκυτταρινούχος βιομάζα μπορεί να υδρολυθεί ενζυμικά σε ήπιες συνθήκες δηλαδή 50 °C και pH=5 και χωρίς την παραγωγή παραπροϊόντων που θα επηρέαζαν την λειτουργία του ενζύμου. Επίσης, η ενδο-1,4-β-D-γλυκανάση υδρολύει εσωτερικούς γλυκοσιδικούς δεσμούς τυχαία εντός της αλυσίδας κυτταρίνης. Ακόμη, οι β-γλυκοσιδάσες παράγουν γλυκόζη είτε μέσω της υδρόλυσης της κελλοβιόζης είτε μέσω της διάσπασης των μονάδων γλυκόζης από κελλοολιγοσακχαρίτες (Agrawal et al., 2021; Dedes et al., 2020; Kumar et al., 2009; Maitan-Alfenas et al., 2015; Sindhu et al., 2016).

Οι λυτικές μονοοξυγενάσες πολυσακχαριτών (LPMOs) είναι μια κατηγορία ενζύμων με οξειδωτική δράση που έχει αποδειχθεί ότι δρουν συνεργικά με υδρολυτικά ένζυμα για να ενισχυθεί η αποδόμηση των πολυσακχαριδικών υποστρωμάτων και να αυξηθεί η απόδοση διάσπασης των σακχάρων. Στο εμπόριο υπάρχουν πολλά διαθέσιμα κυτταρολυτικά κοκτέιλ, τα οποία υδρολύουν αποτελεσματικά την βιομάζα σε μονοσακχαρίτες και παράγονται κυρίως από θερμοφίλους νηματοειδείς μύκητες (Dedes et al., 2020).

Σε αντίθεση με την κυτταρίνη, η ημικυτταρίνη είναι ένα ετερογενές πολυμερές που απαιτεί πολλά ένζυμα για την αποδόμησή της. Οι εξω και ενδο-ξυλανάσες διασπούν την αλυσίδα ξυλάνης που παράγει ξυλοολιγοσακχαρίτες, ενώ οι β-ξυλοσιδάσες παράγουν ξυλόζη από τους διασπασμένους ξυλοολιγοσακχαρίτες. Οι μαννανάσες και οι β-μαννοσιδάσες λειτουργούν παρόμοια στη μαννάνη. Οι πλευρικές ομάδες της ημικυτταρίνης μπορούν να αφαιρεθούν από μια ποικιλία διαφορετικών ενζύμων, συμπεριλαμβανομένων των α-γαλακτοσιδασών, των α-L-αραβινοφουρανοζιδασών, των α-γλυκουρονιδασών, των εστερασών ξυλάνης και των εστεράσεων του φερουλικού και του π-κουμαρυλικού οξέος (Dedes et al., 2020).



Εικόνα 3: Απεικόνιση ενζυμικής υδρόλυσης της κυτταρίνης από τα ένζυμα : ένδο1,4-β-γλουκανάση, έξω-1,4-β-D-γλουκανάση και β-γλυκοζιδάση. (Καλλιοπη, n.d.)

Οι παράγοντες που δυσκολεύουν την ενζυμική υδρόλυση της βιομάζας είναι η κρυσταλλικότητα της κυτταρίνης, η ελεύθερη προσβάσιμη επιφάνεια και η προστασία της δομής από τη λιγνίνη και την ημικυτταρίνη. Επίσης οι παράγοντες που επηρεάζουν την υδρόλυση είναι η συγκέντρωση του ενζύμου, η απορρόφηση του ενζύμου, η παρεμπόδιση από το τελικό προϊόν, η θερμική απενεργοποίηση του ενζύμου και η μη παραγωγική σύνδεση του ενζύμου με την λιγνίνη. Η απόδοση της ενζυμικής υδρόλυσης εξαρτάται κυρίως από την κυτταρίνη, συγκεκριμένα την κρυσταλλικότητα της, τον βαθμό πολυμερισμού της, η ελεύθερη προσβάσιμη επιφάνεια και το μέγεθος των σωματιδίων, αλλά και η ύπαρξη ημικυτταρίνης και λιγνίνης. Η αφαίρεση της λιγνίνης και της ξυλάνης αυξάνει την απόδοση της διεργασίας (Sindhu et al., 2016).

### 2.3.2 Όξινη υδρόλυση

Η όξινη υδρόλυση χωρίζεται σε δυο κατηγορίες κατεργασία με αραιό οξύ σε υψηλή θερμοκρασία και πίεση για μικρό χρονικό διάστημα (από δευτερόλεπτα μέχρι λεπτά) και κατεργασία με πυκνό οξύ σε χαμηλή θερμοκρασία. Τα κύρια μειονεκτήματα της όξινης υδρόλυσης είναι οι απαιτήσεις για ανάκτηση του οξέος μετά την υδρόλυση ή η εξουδετέρωσή τους πριν τη ζύμωση και κατ' επέκταση η παραγωγή μεγάλων ποσοτήτων αποβλήτων. Τα οξέα που χρησιμοποιούνται στην όξινη υδρόλυση είναι κατά κύριο λόγο θειικό οξύ, ωστόσο μπορούν να χρησιμοποιηθούν και άλλα ανόργανα οξέα όπως υδροχλωρικό οξύ, νιτρικό οξύ, τριφθοροξικό οξύ (TFA) και φωσφορικό οξύ.

Το θειικό οξύ και το υδροχλωρικό οξύ χρησιμοποιούνται σε συγκεντρώσεις 1-10% σε μέτρια θερμοκρασία 100-150 °C. Σε αυτές τις σχετικά μέτριες συνθήκες λειτουργίας δεν σχηματίζονται εξόζες. Αυτό οφείλεται κυρίως στην αποσύνθεση των μονοσακχαριτών σε ενώσεις όπως η

φουρφουράλη, ένα προϊόν αφυδάτωσης των πεντόζων, και την υδροξυμεθυλοφουρφουράλη (HMF), ένα προϊόν της αφυδάτωσης των εξόζων. Αυτές οι ενώσεις μαζί με το οξικό οξύ που σχηματίζεται κατά την αρχική αποσύνθεση των ημικυτταρινών, ως αποτέλεσμα της υδρόλυσης των ακετυλομάδων που συνδέονται με το σάκχαρο, αναστέλλουν τη μεταγενέστερη ζύμωση, οδηγώντας σε μειωμένες αποδόσεις αιθανόλης. Η παραγωγή αυτών των αναστολέων αυξάνεται όταν η υδρόλυση τοποθετείται σε υψηλότερες θερμοκρασίες και συγκεντρώσεις οξέος.

#### 2.3.2.1 Όξινη υδρόλυση με αραιό οξύ

Η υδρόλυση με αραιό οξύ είναι μια διαδικασία δυο σταδίων κατά την οποία στο πρώτο στάδιο σε χαμηλή θερμοκρασία γίνεται περαιτέρω μετατροπή της ημικυτταρίνης σε μονομερή σάκχαρα, γιατί η ημικυτταρίνη αποπολυμερίζεται σε χαμηλότερη θερμοκρασία απ' ό,τι η κυτταρίνη λόγω της διαφοράς της δομής των δυο υδρογονανθράκων. Ενώ η ημικυτταρίνη μπορεί να υδρολυθεί γρήγορα με αραιά οξέα υπό ήπιες συνθήκες, αντίθετα για την υδρόλυση της κυτταρίνης με αραιά οξέα απαιτούνται ακραίες συνθήκες, συγκεκριμένα υψηλές πιέσεις και θερμοκρασίες. Ακόμα και σε αυτές τις συνθήκες όμως η υδρόλυση της κυτταρίνης έχει χαμηλές αποδόσεις. Η προκατεργασία με αραιά οξέα λαμβάνει χώρα σε υψηλές θερμοκρασίες 160-230 °C και πιέσεις ~106 atm. Ενώ η συγκέντρωση των οξέων είναι 10-30%. Στη συνέχεια το δεύτερο στάδιο περιλαμβάνει υψηλές θερμοκρασία από 230 °C και 240 °C για τη μετατροπή της κυτταρίνης σε γλυκόζη.

Οι κύριες αδυναμίες της μετατροπής της κυτταρίνης με χρήση οξέος είναι οι απαιτήσεις υψηλής θερμοκρασίας και ο κίνδυνος παρεμπόδισης λόγω της υποβάθμισης των σακχάρων. Οι συγκεντρώσεις θειικού οξέος που χρησιμοποιούνται συνήθως κυμαίνονται από 0,5% έως 1,5%, ενώ οι θερμοκρασίες κυμαίνονται από 120 °C έως 160 °C (Kumar et al., 2009; Lenihan et al., 2010; Zbed et al., 2016).

#### 2.3.2.2 Όξινη υδρόλυση με πυκνό οξύ

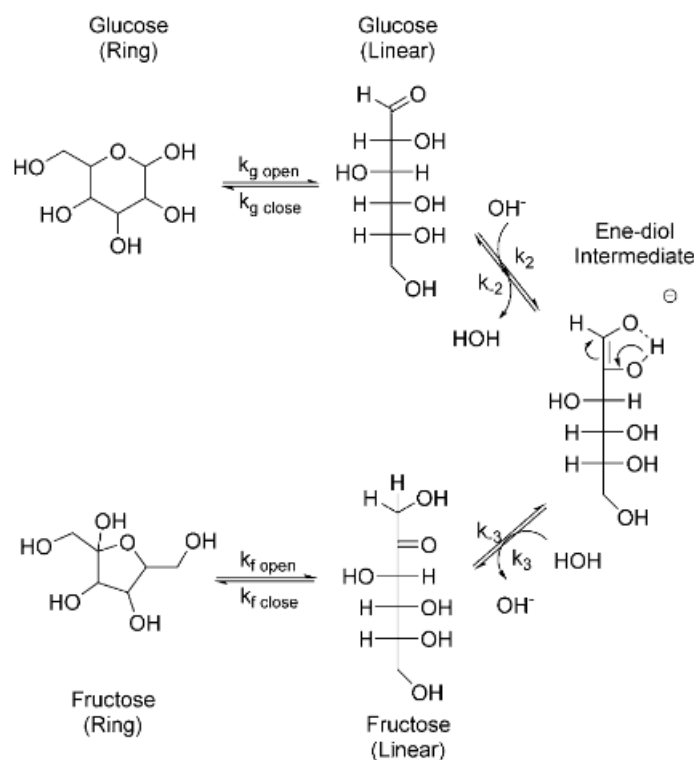
Η μέθοδος υδρόλυσης πυκνού οξέος μπορεί να εφαρμοστεί για τον αποπολυμερισμό και της ημικυτταρίνης και της κυτταρίνης. Τα οξέα που χρησιμοποιούνται είναι τα ίδια με συγκεντρώσεις περίπου στο 41% για υδροχλωρικό, 100% για TFA και 70-90% για θειικό. Η προκατεργασία με πυκνό οξύ γίνεται σε χαμηλότερες συγκριτικά θερμοκρασίες (κάτω των 50 °C) και σε ατμοσφαιρική πίεση, το αρνητικό όμως είναι ότι απαιτεί μεγαλύτερους χρόνους προκατεργασίας. Ωστόσο, η μέθοδος του πυκνού οξέος επιτυγχάνει ολοκληρωτική και γρήγορη μετατροπή της κυτταρίνης σε γλυκόζη και της ημικυτταρίνης στα πέντε μονομερή της. Το κύριο όμως μειονέκτημα αυτής της μεθόδου είναι η διάβρωση του εξοπλισμού λόγω της μεγάλης συγκέντρωσης οξέος και επίσης για να θεωρηθεί οικονομικώς βιώσιμη πρέπει να ανακυκλωθεί το μεγαλύτερο μέρος του χρησιμοποιούμενου οξέος (Kumar et al., 2009; Zbed et al., 2016).

### 3.1 Ενζυμική ισομερείωση γλυκόζης προς παραγωγή φρουκτόζης

Η φρουκτόζη, ένα ισομερές της γλυκόζης, έχει την ίδια στοιχειακή σύνθεση αλλά έχει διαφορετική χημική δομή και για αυτό παρουσιάζει διαφορετικά χαρακτηριστικά από τη γλυκόζη. Επίσης είναι ένα

εξαιρετικά ελκυστικό υπόστρωμα για βιοδιυλιστήρια με στόχο την παραγωγή βιοκαυσίμων καθώς και παραγωγή άλλων χημικών ουσιών.

Με τον μετασχηματισμό ή ισομερισμό της γλυκόζης σε φρουκτόζη έχουν ασχοληθεί στη βιβλιογραφία, επειδή η φρουκτόζη είναι ένα κρίσιμο ενδιάμεσο στη μετατροπή της γλυκόζης σε χημικά με βάση το φουράνιο, όπως της υδροξυμεθυλοφουρφουράλης (HMF). Συγκεκριμένα μέσω της φρουκτόζης παράγεται η 5-υδροξυμεθυλοφουρφουράλη (HMF), η 2,5- φουρανδικαρβοξυλικό οξύ (FDCA) και το λεβουλνικό οξύ, τα οποία είναι σημαντικά στην παραγωγή πλαστικών, πράσινων διαλυτών, λιπαντικών και βιοκαυσίμων. Ο ισομερισμός της γλυκόζης είναι η κυρίαρχη προσέγγιση για την παραγωγή φρουκτόζης. Ο ισομερισμός οδηγεί σε ένα μείγμα γλυκόζης και φρουκτόζης σε έναν διαλύτη, πιο συχνά νερό. Η ανάκτηση της φρουκτόζης από αυτό το μείγμα είναι δύσκολο λόγω των πολύ παρόμοιων φυσικοχημικών ιδιοτήτων αυτών των δυο ενώσεων που είναι πολικές, μη πτητικές. Ο ισομερισμός γλυκόζης σε φρουκτόζη καταλύεται τόσο από οξέα κατά Lewis όσο και από βάσεις κατά Brønsted. Με την χρήση οξέων κατά Lewis acid σαν καταλύτες παράγονται λιγότερα παραπροϊόντα.



Εικόνα 4: Μηχανισμός Αντίδρασης για τον Ισομερισμό της Γλυκόζης σε Φρουκτόζη με καταλύτη βάση (Liu et al., 2014)

Έχουν προταθεί διάφορα χημικά μονοπάτια για τη μετατροπή της γλυκόζης και της ξυλόζης σε 5-υδροξυμεθυλοφουρφουράλη και φουρφουράλη μέσω ενζυμικής υδρόλυσης. Αυτά τα μονοπάτια περιλαμβάνουν αλκαλικούς στερεούς καταλύτες, όπως ζεόλιθοι και υδροταλκίτες, οξέα κατά Lewis και βάσεις κατά Brønsted, βρωμιούχο λίθιο, οξείδιο μαγνησίου, φωσφορικά άλατα, ιοντικά υγρά, μη τοξικές βασικές αμινοξέες όπως η αργινίνη, η λυσίνη, η ιστιδίνη και άλλες. Ωστόσο, αυτές οι μέθοδοι έχουν μειονεκτήματα, όπως υψηλό κόστος υλικών και ανάγκη για διαχωρισμό μετά το τέλος της



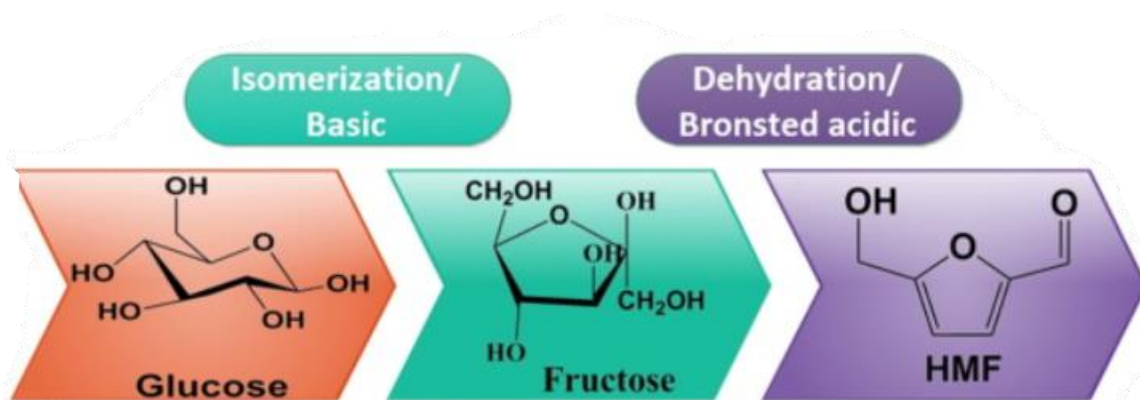
διεργασίας. Επιπλέον, η μετατροπή της γλυκόζης και της ξυλόζης σε φουράνια μπορεί να γίνει αποτελεσματικά υπό ακραίες συνθήκες, όπως υψηλή πίεση και θερμοκρασία.

Για να αποφευχθούν οι επιβλαβείς περιβαλλοντικές επιπτώσεις και να παραχθούν τα παράγωγα του φουρανίου με πιο φιλικό προς το περιβάλλον τρόπο, μπορεί να εφαρμοστεί ένα στάδιο ισομερείωσης της γλυκόζης και της ξυλόζης σε φρουκτόζη και ξυλουλόζη αντίστοιχα. Αυτό επιτυγχάνεται από τον μετασχηματισμό τους σε κετόζες, οι οποίες μπορούν να μετατραπούν απευθείας στα αντίστοιχα φουράνια με χρήση πιο ήπιων συνθηκών μέσω απλής χημικής αφυδάτωσης. Έτσι, αποφεύγονται οι ακραίες συνθήκες αντίδρασης που έχουν σοβαρές επιπτώσεις στο περιβάλλον.

Από τα μονομερή σάκχαρα, γλυκόζη και ξυλόζη, η γλυκόζη είναι πιο ενδιαφέρουσα στην αρχική φάση για την παραγωγή 5-υδροξυμεθυλοφουρφουράλης. Η μετατροπή της γλυκόζης σε φρουκτόζη επιτυγχάνεται μέσω ενζυμικής ισομεράσης, όπου χρησιμοποιείται μια ισομεράση της γλυκόζης, γνωστή ως *Sweetzyme IT* (Novozymes), που προέρχεται από τον *Streptomyces murinus*. Παρόλο που η ενζυμική αντίδραση είναι εκλεκτική, η ισορροπία περιορίζεται στο 50%, περιορίζοντας την απόδοση. Για να αντιμετωπιστεί αυτός ο περιορισμός, μπορεί να προστεθεί τετραβορικό νάτριο, το οποίο δημιουργεί σύμπλοκα με τα σάκχαρα και τα ιόντα βορίου, μη συμμετέχοντας στην αντίδραση. Αυτό μετατοπίζει την ισορροπία προς τη φρουκτόζη, αυξάνοντας τη μετατροπή της γλυκόζης έως και 80%. Πρέπει να προστεθεί τετραβορικό νάτριο σε αναλογία 50% ως προς τη γλυκόζη για την επίτευξη υψηλής απόδοσης, ενώ υψηλότερες αναλογίες μπορεί να μειώσουν τη μετατροπή. Επίσης, λόγω των διαφορών στις βέλτιστες τιμές pH για τα ενζυμικά και την ισομεράση, δεν είναι δυνατή η εκτέλεση της αντίδρασης σε ένα στάδιο για την παραγωγή φρουκτόζης από προκατεργασμένο κυτταρίνη. Τέλος, η ισομεράση του υδρολύματος που προκύπτει από την ενζυμική υδρόλυση λιγνινοκυτταρινούχων υλικών διαφέρει από την ισομεράση της καθαρής γλυκόζης λόγω των παρεμπόδιων ενώσεων που μπορούν επίσης να επηρεάσουν την αντίδραση (Dedes et al., 2020; Delidovich & Palkovits, 2016; Huang et al., 2010; Liu et al., 2014; Moreau et al., 2000; Yang et al., 2016; Yoo et al., 2017).

### 3.2 Χημική αφυδάτωση φρουκτόζης προς σχηματισμό 5-υδροξυμεθυλοφουρφουράλης (HMF)

Η 5-υδροξυμεθυλοφουρφουράλη (HMF) όπως έχει ήδη αναφερθεί έχει μεγάλη αξία διότι αποτελεί την βάση για την παραγωγή άλλων ουσιών όπως βιοπολυμερή, βιοκαύσιμα και άλλες χημικές ουσίες υψηλής προστιθέμενης αξίας. Για να παραχθεί η 5-υδροξυμεθυλοφουρφουράλη (HMF) από τη φρουκτόζη μέσω χημικής αφυδάτωσης, χρησιμοποιούνται διάφορα χημικά μέσα και καταλύτες, είτε ομογενείς είτε ετερογενείς στερεοί καταλύτες.



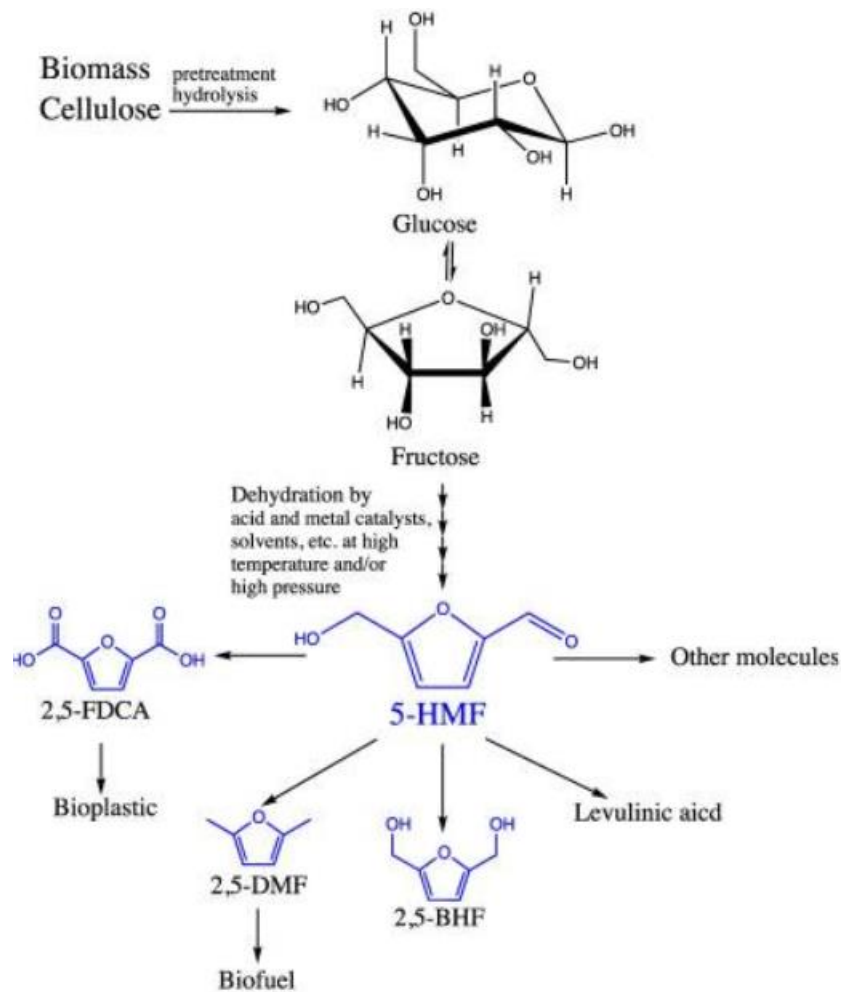
Εικόνα 5: Η μετατροπή της γλυκόζης σε HMF (Parveen & Upadhyayula, 2017)

Οι όξινοι ετερογενείς στερεοί καταλύτες που χρησιμοποιούνται περιλαμβάνουν αλουμίνιο, ζεόλιθο, φωσφορικά άλατα μετάλλων μετάπτωσης (Nb, Zr, V, Cu, Ti), ρητίνη ιοντοανταλλαγής με την ονομασία Amberlyst-15, οξείδιο γραφενίου και στερεοί σουλφονικοί καταλύτες από τιτάνιο. Ορισμένοι από αυτούς τους καταλύτες προκαλούν αυξημένη εκλεκτικότητα με την προσθήκη οργανικής φάσης.

Από την άλλη πλευρά, είναι δυνατή η αφυδάτωση της φρουκτόζης χρησιμοποιώντας ομογενείς καταλύτες, όπως φωσφορικό, θειικό, υδροχλωρικό, νιτρικό, κιτρικό, γλυκολικό και οξικό οξύ. Η χρήση ετερογενών καταλυτών μπορεί να αποτρέψει προβλήματα διάβρωσης και να διευκολύνει την ανάκτηση του καταλύτη, αλλά απαιτείται μηχανική ανάδευση για να εξασφαλιστεί η επαφή του με όλο το μέσο της αντίδρασης. Από την άλλη πλευρά, με τη χρήση ομογενών καταλυτών, καθώς διαλύονται στο μέσο, επιτυγχάνεται ομοιογενής κατανομή τους, η οποία οδηγεί σε καλύτερες καταλυτικές αποδόσεις. Επιπλέον, οι όξινοι ομογενείς 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 προκαλούν όλο και μεγαλύτερο ενδιαφέρον στην έρευνα και μπορούν επίσης να κορεστούν με ανόργανα άλατα, όπως το χλωριούχο νάτριο NaCl (Antonetti et al., 2017; Dedes et al., 2021; Ordonsky et al., 2012; Parveen & Upadhyayula, 2017; Román-Leshkov & Dumesic, 2009; Shaikh et al., 2018; Testa et al., 2020; Zhao et al., 2021).

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

Τα φουράνια και συγκεκριμένα η 5-υδροξυμεθυλοφουρφουράλη (HMF) και η 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), είναι μόρια πλατφόρμας, τα οποία προέρχονται από τη βιομάζα, και μπορούν να λειτουργήσουν ως πρόδρομες ενώσεις για διαλύτες, βιοκαύσιμα και διάφορα σημαντικά μονομερή που χρησιμοποιούνται για τη σύνθεση πολυμερών και ρητινών.



Εικόνα 6: Σύνθεση και εφαρμογές του HMF (Wang et al., 2018)

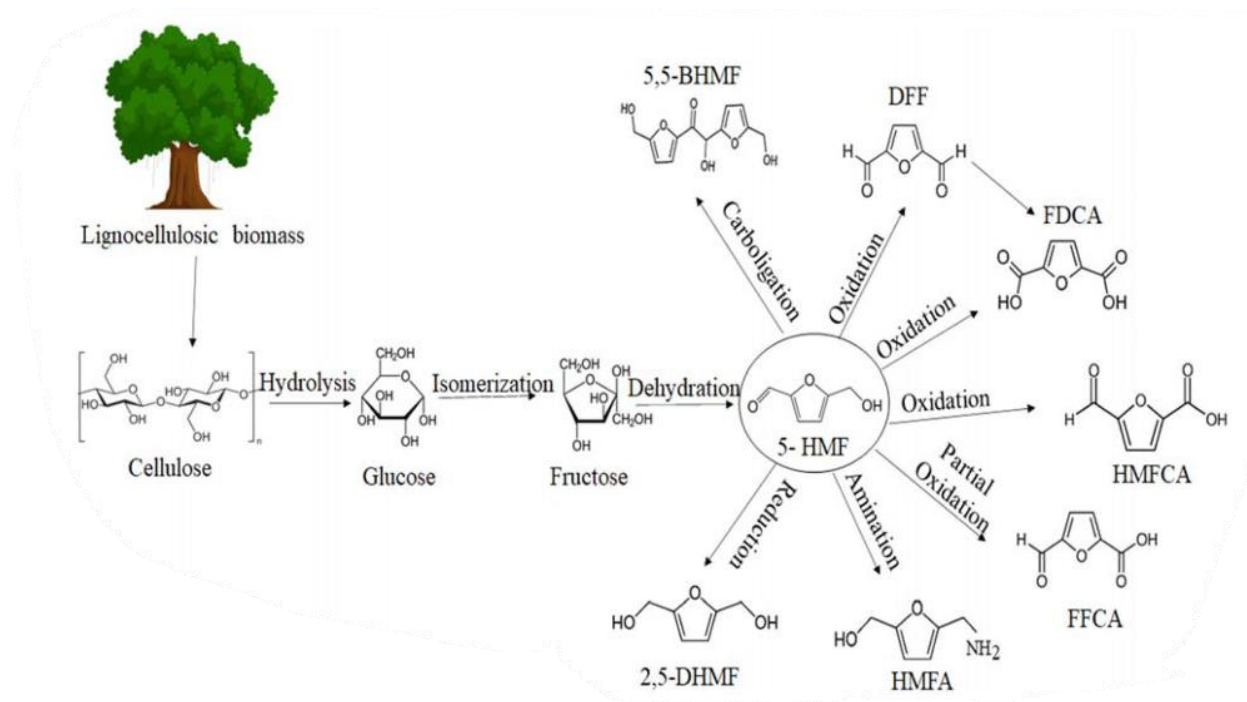
Επίσης, τα φουράνια έχουν συγκεντρώσει σημαντική προσοχή στη βιοτεχνολογική έρευνα λόγω του ρόλου τους ως αναστολείς σε διαδικασίες όπως η μικροβιακή ζύμωση. Προκειμένου αυτό να παραχθούν αυτές οι ενώσεις απαιτείται η εκλεκτική οξείδωση των φουρανίων προς έναν αριθμό ιδιαίτερα λειτουργικών ενώσεων, όπως καρβοξυλικά οξέα, διαλδεΰδες και υδροξυοξέα μεταξύ άλλων, που κατά κύριο λόγο παράγονται βιομηχανικά μέσω χημικής σύνθεσης. Ωστόσο, η χρήση μεταλλικών και οργανικών καταλυτών, ταυτόχρονα με τις υψηλές θερμοκρασίες και πιέσεις, καθιστά τις χημικές μεθόδους ανεπιθύμητες από περιβαλλοντική άποψη και πιθανώς μη οικονομικά επωφελείς. Αυτό συμβαίνει διότι για να επιτευχθεί η βέλτιστη επιλεκτικότητα και, κατ' επέκταση, η υψηλότερη δυνατή καθαρότητα του προϊόντος, απαιτούνται πολλά στάδια καθαρισμού. Όσο περισσότερα αυτά τα στάδια, τόσο μικρότερη είναι η τελική απόδοση και τόσο υψηλότερο είναι το κόστος της αντίδρασης.

Η επιστημονική έρευνα επικεντρώνεται στην ανάπτυξη διαδικασιών παραγωγής που είναι περιβαλλοντικά φιλικότερες και βασίζονται σε ένζυμα ή ολόκληρους μικροοργανισμούς. Αυτές οι βιοκαταλυτικές προσεγγίσεις, πέρα από τη σημαντική μείωση των παραπροϊόντων και των

αποβλήτων, χρησιμοποιούν πιο ήπιες συνθήκες αντίδρασης και χαρακτηρίζονται από εξαιρετική επιλεκτικότητα.

Στη βιβλιογραφία έχουν μελετηθεί η χρήση μικροοργανισμών που μεταβολίζουν τα φουράνια. Ωστόσο, οι μηχανισμοί που χρησιμοποιούνται από τους μικροοργανισμούς για το μεταβολισμό αυτό είναι περίπλοκοι, και περιλαμβάνουν την έκκριση διαφόρων ενζύμων για τη διευκόλυνση της διαδικασίας μετατροπής. Επιπλέον, η εργασία με μικροβιακές καλλιέργειες παρουσιάζει προκλήσεις όπως η διατήρηση των βέλτιστων συνθηκών pH και θερμοκρασίας για τον οργανισμό, καθώς και η αναγκαιότητα των κατόντη διεργασιών για τον καθαρισμό και την ανάκτηση του τελικού προϊόντος. Κατά συνέπεια, υπάρχει ζήτηση για καταλύτες που μπορούν να μετασχηματίσουν επιλεκτικά φουράνια με ελεγχόμενο τρόπο, να μπορούν να διαχωριστούν εύκολα από το μέσο αντίδρασης και να απαιτούν ήπιες συνθήκες. Για αυτό, έχει δοθεί μεγάλη προσοχή στην ανακάλυψη ενζύμων που μπορούν να καταλύσουν τη μετατροπή των φουρανίων. 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. Επιπλέον, το HMF είναι ένα τοξικό μόριο για τους ζωντανούς οργανισμούς. Οι φουρανικές αλδεΐδες που παράγονται από αυτό προκαλούν βλάβη στα νουκλεϊκά οξέα, στις πρωτεΐνες και στα κυτταρικά οργανίδια των μικροοργανισμών μέσω του σχηματισμού δραστικών μορφών οξυγόνου (ROS, reactive oxygen species). Αυτό οδηγεί στην αναστολή της δραστηριότητας των πρωτογενών μεταβολικών ενζύμων των μικροοργανισμών, οι οποίοι αντιμετωπίζουν αργά τη φάση του θανάτου χωρίς να προχωρούν σε περαιτέρω αναπαραγωγή. Ωστόσο, ορισμένοι μικροοργανισμοί, όπως βακτήρια, μύκητες (λευκή σήψη και μυκήλια) και φύκια, διαθέτουν φυσικούς μηχανισμούς αποτοξίνωσης για ξενοβιοτικά, αλδεΐδες και αλκοόλες. Αυτός είναι ο λόγος που χρησιμοποιούνται βακτήρια και μύκητες με χαμηλές συγκεντρώσεις υποστρώματος για την παραγωγή ενώσεων από HMF. Όπως αναφέρθηκε, 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.

Η αρχή των βιοαντιδραστήρων ημι-διαλείποντος έργου βασίζεται στη δυνατότητα προσθήκης του υποστρώματος HMF σε χαμηλές ποσότητες σε συνεχή βάση, αντί να προστίθεται ολόκληρο το υπόστρωμα από την αρχή. Αυτή η στρατηγική επιτρέπει την αποφυγή της τοξικότητας και της αναστολής ολόκληρων κυττάρων που προκαλείται από τη μεγάλη ποσότητα HMF. Επιπλέον, βοηθά στη συσσώρευση υψηλών συγκεντρώσεων προϊόντος, βελτιώνοντας έτσι την παραγωγικότητα της διαδικασίας και ευκολύνοντας τον καθαρισμό. Παρ' όλα αυτά, μέχρι στιγμής οι αποδοτικότητες βιομετασχηματισμού δεν είναι ικανοποιητικές, ειδικά σε υψηλές συγκεντρώσεις υποστρώματος που απαιτούνται για τη μαζική παραγωγή. Συνεπώς, από τεχνική άποψη, εξακολουθούν να υπάρχουν σημαντικές προκλήσεις για τη βιοκαταλυτική αναβάθμιση των βιο-φουρανίων (Dedes et al., 2020; Lalanne et al., 2021; Rajesh et al., 2020; Varjani et al., n.d.; Wen et al., 2020).



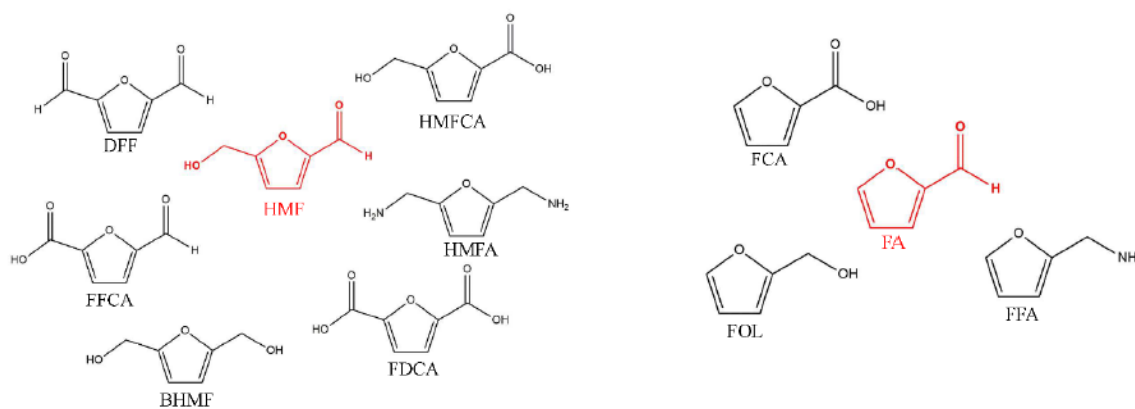
Εικόνα 7: Η παραγωγή HMF από λιγνοκυτταρινική βιομάζα και η μετατροπή του HMF στα παράγωγά του φουρανίου (Saikia et al., 2022)

### 3.4 Παράγωγα των φουρανίων

Το φουράνιο είναι μια πενταμελής ετεροκυκλική ένωση ακόρεστου δακτυλίου που περιέχει οξυγόνο. Από χημική άποψη, είναι η βασική δομή δακτυλίου που αποτελεί μια ολόκληρη κατηγορία βιομηχανικά σημαντικών προϊόντων. Οι ενώσεις που περιέχουν τον δακτύλιο φουρανίου αναφέρονται συνήθως ως φουράνια. Από κατασκευαστική άποψη, ωστόσο, η φουρφουράλη είναι η πρώτη ύλη από την οποία προέρχονται όλα τα εμπορικά παράγωγα φουρανίου, καθώς είναι η ευκολότερη και λιγότερο δαπανηρή στην παρασκευή. Επειδή είναι μια μη πολική αρωματική ένωση η παρουσία του αιθερικού οξυγόνου του προσθέτει πολικότητα καθώς και τη δυνατότητα για δεσμούς υδρογόνου (Banerjee et al., 2012; Kottke, 2000).

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)φουρφουριλαμίνη (HMFA) και 2,5-δισ(υδροξυμεθυλ)φουράνιο (BHMF). Επίσης, το αδιπικό οξύ, η 1,6-εξανοδιόλη, το λεβουλινικό 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-φουρφουριλαμίνης (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 (Dedes et al., 2020; Rajesh et al., 2020).



Εικόνα 8: Επισκόπηση των διαφορετικών μονομερών ενώσεων που παράγονται από HMF και FA (Dedes et al., 2020)

### 3.5 2,5-φουρανοδικαρβοξυλικό οξύ (FDCA)

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. Ανήκει στις πλέον ενδιαφέρουσες και πολλά υποσχόμενες ενώσεις που προέρχονται από φουράνια και κατατάσσεται ανάμεσα στα δώδεκα πιο σημαντικά χημικά-πλατφόρμες ενδιαφέροντος που προέρχονται από σάκχαρα, σύμφωνα με το Υπουργείο Ενέργειας των Ηνωμένων Πολιτειών (DOE). Παρότι η σύνθεση του FDCA έχει γίνει γνωστή εδώ και περίπου έναν αιώνα και μισό, παρατηρείται πρόσφατα έντονη ερευνητική δραστηριότητα σχετικά με τις συνθετικές οδούς παραγωγής του και τη βιομηχανική του παραγωγή (Parveen & Upadhyayula, 2017; Zhao et al., 2021).

#### 3.5.1 Κλασικοί τρόποι σύνθεσης του 2,5-φουρανοδικαρβοξυλικού οξέος (FDCA)

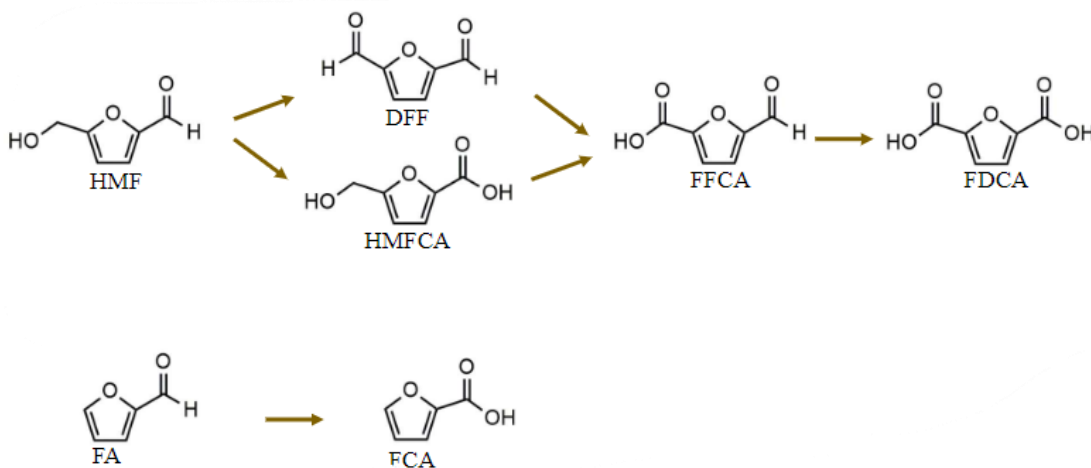
Οι Fittig and Heinzelman δημοσίευσαν την πρώτη μελέτη σχετικά με τη σύνθεση του FDCA το 1876 μέσω αφυδάτωσης του γαλακταρικού οξέος (galactaric acid) με υδροβρωμικό οξύ και λίγα χρόνια αργότερα, το 1888, οι Sohst και Tollens χρησιμοποίησαν το ισομερές σακχαρικό οξύ για τη σύνθεσή του. Η οξείδωση του 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 FeIII. 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, λεβουλινικό 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 (Dedes et al., 2020; Dijkman et al., 2014a; Lalanne et al., 2021; McKenna et al., 2015; Rajesh et al., 2020; Sousa et al., 2015).

### 3.5.2 Οξειδωτικές αντιδράσεις του HMF και παραγωγή του 2,5-φουρανοδικαρβοξυλικού οξέος (FDCA)

Η πιο ενδιαφέρουσα ένωση που προέρχεται από φουράνια είναι το 2,5-φουρανοδικαρβοξυλικό οξύ FDCA, το οποίο χρησιμεύει ως εναλλακτική λύση στο πετροχημικά συντιθέμενο τereφθαλικό οξύ. Το FDCA μπορεί να ληφθεί από το HMF μέσω δύο διαφορετικών οδών όπως απεικονίζεται στη παρακάτω εικόνα.



Εικόνα 9: Σχηματική αναπαράσταση της οξείδωσης των φουρανίων. Πάνω φαίνεται η οξείδωση του HMF σε FDCA. Κάτω φαίνεται η οξείδωση του FA σε FCA (Dedes et al., 2020).

Στην πρώτη οδό, το HMF μετατρέπεται σε 5-υδροξυμεθυλ-2-φουρανοδικαρβοξυλικό οξύ (HMFCA), ενώ στη δεύτερη οδό το HMF μετατρέπεται σε φουρανο-2,5-δικαρβαλδεΐδη (DFF). Και οι δύο οδοί οδηγούν τελικά στον σχηματισμό του 2,5-φορμυλοφουρανοκαρβοξυλικού οξέος (FFCA), το οποίο μπορεί περαιτέρω να μετατραπεί σε FDCA. Όλα τα στάδια αυτής της διαδικασίας, συμπεριλαμβανομένων των αντιδράσεων οξείδωσης, απαιτούν καταλύτες ικανούς να οξειδώνουν αλκοόλες και αλδεΐδες.

Για την οξείδωση μπορούν να χρησιμοποιηθούν ένζυμα ή και ολόκληροι μικροοργανισμοί. Πρέπει να ληφθεί υπόψη ότι ο καθαρισμός των απομονωμένων ενζύμων είναι χρονοβόρος και ακριβός, ενώ συχνά απαιτούν ακινητοποίηση για να αυξήσουν τη σταθερότητα ή/και τη δραστηριότητά τους. Για αυτό και για να αντιμετωπιστούν αυτά τα μειονεκτήματα γίνεται 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. Η αποικοδόμηση της φουρφουράλης και του HMF έχει μελετηθεί στον *Cupriavidus basilensis* HMF14 με την εξαρτώμενη από FAD HMF/φουρφουραλική οξειδοοδουκτάση (HmfH) που μετατρέπει το HMF σε HMFCA. Συγκεκριμένα, 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 *Methylophilus* sp. και την HMF/φουρφουραλική οξειδοοδουκτάση (HmfH) από *C. basilensis* HMF14 και η γραμμομοριακή αναλογία μετατροπής του HMF σε FDCA αυξήθηκε από 51.0 σε 93.6%. Τα προβλήματα στη χρήση ολόκληρων μικροοργανισμών είναι 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.

Για να αντιμετωπιστούν αυτά τα προβλήματα μελετάται ιδιαίτερα η βιομετατροπή του HMF από απομονωμένα ένζυμα, τα οποία χαρακτηρίζονται από υψηλή παραγωγικότητα, χρήση υψηλής συγκέντρωσης ενζύμων και μικρότερο χρόνο αντίδρασης. Το πρόβλημα αυτής της μεθόδου έγκειται στην απουσία μιας HMF οξειδάσης και της πολυπλοκότητας της οξείδωσης. Τα περισσότερα ένζυμα περιορίζονται είτε στην οξείδωση των αλκοολών είτε στην οξείδωση των αλδευδών, ενώ η πλήρης οξείδωση του HMF προς FDCA απαιτεί ένα ένζυμο που δρα τόσο στις αλκοολικές όσο και στις αλδεϋδικές 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<sup>+</sup>. Οι βασικές ενζυμικές ομάδες περιλαμβάνουν οξειδάσες αλκοόλης, οξειδάσες γαλακτόζης (GOs), οξειδάσες 5-υδροξυμεθυλοφουρφουράλης, λακάσες, καταλάσες και υπεροξυγενάσες (Dedes et al., 2020; Dijkman et al., 2014b; Lalanne et al., 2021; Wu et al., 2020).

Στη βιβλιογραφία έχει παρουσιαστεί ένα σύστημα ενός δοχείου που χρησιμοποιούσε 2,2,6,6-τετραμεθυλπιπεριδινο-1-οξύλιο (TEMPO) και λιπάση για τη μετατροπή του HMF σε FDCA. Αυτό το



σύστημα συνδύασε έναν χημικό καταλύτη (TEMPO) για να οξειδώσει το HMF σε DFF με τη δράση μιας λιπάσης, η οποία διευκόλυνε τον σχηματισμό ενός υπεροξέος για περαιτέρω οξείδωση σε FDCA. Σε μία άλλη έρευνα έγιναν προσπάθειες για να παραχθεί FDCA μέσω μιας πλήρως ενζυμικής αλυσιδωτής αντίδρασης. Χρησιμοποίησαν μια οξειδάση αρυλικής αλκοόλης (AAO) για να εκτελεστούν όλα τα απαραίτητα οξειδωτικά βήματα. Ωστόσο, αν και το AAO κατέλυσε επιτυχώς την παραγωγή HMFCFA με υψηλές αποδόσεις, το επόμενο στάδιο οξείδωσης σε FDCA παρεμποδίστηκε από το υπεροξείδιο του υδρογόνου που παρήχθη κατά τη διάρκεια της αντίδρασης. Για να ξεπεραστεί αυτό, χρησιμοποιήθηκε μια μη ταυτοποιημένη υπεροξυγενάση (UPO) ως επόμενο βήμα μετά την AAO, με αποτέλεσμα μια απόδοση 91% για το FDCA. Σε μία άλλη έρευνα μελετήθηκε η επίδραση ενός AAO από το *Pleurotus eryngii* στο HMF για την παραγωγή FDCA. Ενώ το AAO οξειδώνει αποτελεσματικά το HMF σε HMFCFA, η περαιτέρω οξείδωση σε FDCA αναστέλλεται. Ωστόσο, χρησιμοποιώντας το HMFCFA ως αρχικό υπόστρωμα για το AAO, το ένζυμο μεταμόρφωσε επιτυχώς το υπόστρωμα σε FDCA. Η ανασταλτική δράση του υπεροξειδίου  $H_2O_2$  που δημιουργήθηκε κατά τη διάρκεια της αντίδρασης μετριάστηκε με την προσθήκη καταλάσης, οδηγώντας σε πλήρη μετατροπή του HMF σε FDCA μετά από 12 ημέρες.

Όλα τα παραπάνω υποδεικνύουν την ικανότητα των ενζύμων AAO που ανήκουν στην οικογένεια AA3 CAZy (EC 1.1.3.7) να οξειδώνουν το HMF. Ωστόσο, αυτά τα ένζυμα έχουν περιορισμένη ικανότητα να εκτελούν και τα τρία στάδια οξείδωσης που απαιτούνται για την παραγωγή FDCA. Επομένως, άλλα ένζυμα από την οικογένεια AA3, όπως οι οξειδάσες γλυκόζης (EC 1.1.3.4), οι οξειδάσες αλκοόλης (EC 1.1.3.13) και οι οξειδάσες πυρανόζης (EC 1.1.3.10), έχουν αναφερθεί ότι παρουσιάζουν οξειδωτική δράση. Οι Dijkman et al. αναζήτησαν ομόλογα ένζυμα με την οξειδοοξειδοκτάση HMF/FA που ονομάζεται HmfH και οδηγήθηκαν στην ανακάλυψη μιας οξειδάσης HMF (HMFO) από το *Methylovorus sp.*, στέλεχος MP688. Το HMFO παρήγαγε σημαντικές ποσότητες FFCA, αλλά ο χαμηλός βαθμός ενυδάτωσής του εμπόδιζε την περαιτέρω μετατροπή σε HMF. Για να αντιμετωπίσουν αυτό το ζήτημα, οι ερευνητές έλυσαν την κρυσταλλική δομή και εισήγαγαν μια διπλή μετάλλαξη, με αποτέλεσμα μια 1000-πλάσια αύξηση της καταλυτικής αποτελεσματικότητας του ενζύμου στο FFCA. Αυτή η τροποποίηση τελικά απέδωσε υψηλότερες ποσότητες FDCA. Σε άλλη έρευνα, εφαρμόστηκε παρόμοια μεταλλαξιγόνο προσέγγιση σε μια αλληλουχία αμινοξέων AAO, ώστε να μπορέσει να εκτελέσει και τα τρία βήματα οξείδωσης που απαιτούνται για την παραγωγή FDCA. Με την εισαγωγή ενός υπολείμματος τρυπτοφάνης σε ένα μετάλλαγμα που φέρει μια μετάλλαξη H91N, η οποία έμοιαζε με την ενεργή θέση και τη δομή του HMFO, πέτυχαν εξαπλάσια αύξηση στην παραγωγή FDCA από το HMF. Αν και η πραγματική απόδοση του FDCA ήταν σχετικά χαμηλή (3%), αυτή η μελέτη σηματοδότησε την πρώτη αναφορά ενός ενζύμου ικανού να μετατρέψει πλήρως το HMF σε FDCA, ανοίγοντας δυνατότητες για νέους βιοκαταλύτες στην αξιοποίηση του φουρανίου (Dedes et al., 2020).

### 3.5.2.1 Ένζυμα της οικογένειας Auxiliary Activity Family 5 (AA5)

Τα ένζυμα που ανήκουν στην οικογένεια Auxiliary Activity Family 5 AA5 της Carbohydrate-Active Enzymes (CAZy) βάσης δεδομένων (<http://www.cazy.org/AA5.html>) έχουν προσελκύσει το ενδιαφέρον των ερευνητών, διότι είναι πιθανό να μπορούν να καταλύουν την οξείδωση των φουρανίων στα παράγωγα τους. Συγκεκριμένα σε αυτή την ομάδα υπάρχουν οξειδάσες που

απαιτούν σαν υποδοχέα οξυγόνο (EC 1.1.3.-), συμπεριλαμβανομένων γαλακτοξειδασών GOs (EC 1.1.3.9), οξειδάσες γλυοξάλης (GIOs) (EC 1.2.3.15), οξειδάσες αλκοόλης (EC 1.1.3.13) οξειδάσες ανδραφινόζης (EC 1.1.3.-). Μεταξύ άλλων οξειδωτικών ενζύμων, τα GOs και GIOs έχουν αναφερθεί ότι καταλύουν τη μετατροπή των φουρανίων, παρόμοια με τα AAO και HMFO. Για αυτό το λόγο στην βιβλιογραφία εξετάζεται το δυναμικό αυτών των ενζύμων σε διαδοχικές διεργασίες για τη μετατροπή-οξείδωση του HMF.

Στη βιβλιογραφία έχει μελετηθεί η χρήση οξειδάσης της γαλακτόζης και οξειδάσης της γλυοξάλης σε συνδυασμό και με άλλα ένζυμα με στόχο την μετατροπή του HMF σε FDCA. Η πρώτη αναφορά ενός ενζύμου AA5 που δρα στο HMF ήταν από την ομάδα των McKenna et al., όπου εξετάστηκε η ικανότητα μιας προσαρμοσμένης παραλλαγής μιας οξειδάσης της γαλακτόζης (GO) από τον μικροοργανισμό *Fusarium graminearum* να παράγει FDCA. Αυτή η οξειδάση κατάφερε να μετατρέψει το HMF σε DFF, αλλά όχι να το οξειδώσει περαιτέρω σε FDCA.

Για να αντιμετωπιστεί αυτή η δυσκολία χρησιμοποιήθηκε μια οξειδάση της κολιτεριπλασματικής αλδεΐδης (PaoABC) από *Escherichia coli*. Η οξειδάση αυτή ήταν ενεργή σε HMF, DFF και FFCA και μελετήθηκε αν ήταν ενεργή για την παραγωγή του FDCA. Για το λόγο αυτό, *Escherichia* (PaoABC) που αποδείχθηκε ενεργή σε HMF, DFF και FFCA για να μελετηθεί εάν ήταν δυνατή η παραγωγή FDCA. Με βάση τα αποτελέσματα παρατηρήθηκε παραγωγή FDCA παρατηρήθηκε, αν και ημιτελής, επειδή ο PaoABC παρήγαγε επιπλέον HMFCA από HMF, το οποίο είναι ένα φτωχό υπόστρωμα για τη GO. Το βασικό πλεονέκτημα του PaoABC στη διαδικασία έγκειται στο γεγονός ότι δεν απαιτούσε την ένυδρη μορφή του FFCA, σε αντίθεση με άλλους καταλύτες που χρησιμοποιούνται στη διαδικασία. Σε ένα άλλο πείραμα, η οξειδάση της γαλακτόζης αφέθηκε να οξειδώσει πλήρως το HMF σε DFF πριν από την προσθήκη του PaoABC στο σύστημα, επιτυγχάνοντας έτσι τον πλήρη μετασχηματισμό σε FDCA. Επίσης προστέθηκε καταλάση στο σύστημα για να ανακουφίσει τα οξειδωτικά ένζυμα από το υπεροξείδιο  $H_2O_2$  που παράγεται καθ' όλη τη διάρκεια της διαδικασίας και να παρέχει το απαιτούμενο οξυγόνο. Με βάση αυτά τα πειράματα σχεδιάστηκε μια διαδικασία ενός δοχείου. Μια υπεροξειδάση χρένου (HRP) προστέθηκε στο σύστημα καταλάσης-HMF-GO-PaoABC και βρέθηκε ότι ενισχύει σημαντικά τη δράση της GO προς την παραγωγή του DFF. Με αυτόν τον τρόπο, η παραγωγή HMFCA μετατοπίστηκε, οδηγώντας σε 100% απόδοση παραγωγής FDCA.

Σε μία άλλη έρευνα, το 2015 οι Qin et al., εξέτασαν την οξείδωση του HMF χρησιμοποιώντας μια σειρά ενζύμων. Αρχικά, χρησιμοποιήθηκε οξειδάση ξανθίνης (XO) από *E. coli* που παράγει HMFCA σε απόδοση 94% μετά από 7 ημέρες, χωρίς πρόοδο σε περαιτέρω στάδια οξείδωσης. Δεύτερον, χρησιμοποιήθηκαν τρεις λακκάσες για την ενίσχυση της παραγωγής FFCA χρησιμοποιώντας το TEMPO (2,2,6,6,-τετραμεθυλπiperιδίνυλο οξύ) ως μεσολαβητή. Η υψηλότερη μετατροπή που επιτεύχθηκε ήταν απόδοση 82%, ενώ χαμηλότερες αποδόσεις 4% και 10% παρατηρήθηκαν για το DFF και το FDCA, αντίστοιχα. Τέλος, αναπτύχθηκε ένας συνδυασμός ενζύμων GO, HRP και καταλάσης για την παραγωγή DFF από HMF. Το τελικό βήμα περιελάμβανε τη χρήση μιας λιπάσης B (CAL-B). Με αποτέλεσμα τη μετατροπή του DFF σε FDCA με απόδοση 88%. Συνολικά αυτή η μέθοδος δεν ήταν ιδιαίτερα αποτελεσματική.

Πρόσφατα, οι Karich et al. προσπάθησαν να σχεδιάσουν ένα κοκτέιλ ενζύμων για να επωφεληθεί και από τις δύο οδούς της διαδικασίας σύνθεσης FDCA. Για αυτό το λόγο χρησιμοποιήθηκαν ένα UPO (unspecific peroxxygenase), ένα GO και ένα AAO. Συγκεκριμένα επιλέχθηκε αυτός ο συνδυασμός γιατί τα GO χρησιμοποιήθηκαν για να οξειδώσουν το HMF προς HMFCa και DFF και τα AAO να παράγουν υπεροξείδιο  $H_2O_2$ , ενώ ο ρόλος της UPO ήταν διπλός, καθώς χρησιμοποιήθηκε ως οξειδωτικός παράγοντας στο HMF και τα οξειδωμένα παράγωγά του, καθώς και ως ανακουφιστικός παράγοντας του  $H_2O_2$  που παρήχθη σε όλη την αντίδραση. Με αυτό το πείραμα, αποδείχθηκε ότι η παραγωγή FFCA ήταν γρήγορη, ενώ η μετατροπή FFCA σε FDCA ήταν το πιο απαιτητικό βήμα της διαδικασίας. Ωστόσο, μετά από 24 ώρες, επιτεύχθηκε μια απόδοση FDCA 80%, ενώ το HMF μετατράπηκε σχεδόν εξ ολοκλήρου στα οξειδωμένα παράγωγά του.

Οι Daou et al. μελέτησε την οξείδωση του HMF με τρία GIO από τον *Rychnororus cinnabarus*. Παρόλο που κανένα από αυτά τα ένζυμα δεν εμφάνισε απόδοση μετατροπής HMF πάνω από 40%, η απόδοση των PciGIO2 και PciGIO3 διπλασιάστηκε με την προσθήκη καταλάσης. Το κύριο οξειδωμένο προϊόν της μετατροπής HMF ήταν το HMFCa. Προκειμένου να παρακαμφθεί η αδυναμία οξείδωσης περαιτέρω HMFCa, ένα AAO χρησιμοποιήθηκε παράλληλα με GIO. Τελικά, αφού το AAO οξείδωσε το HMF σε FFCA, το GIO προστέθηκε στην αντίδραση παρουσία καταλάσης, παράγοντας μικρές, αλλά σημαντικές ποσότητες FDCA.

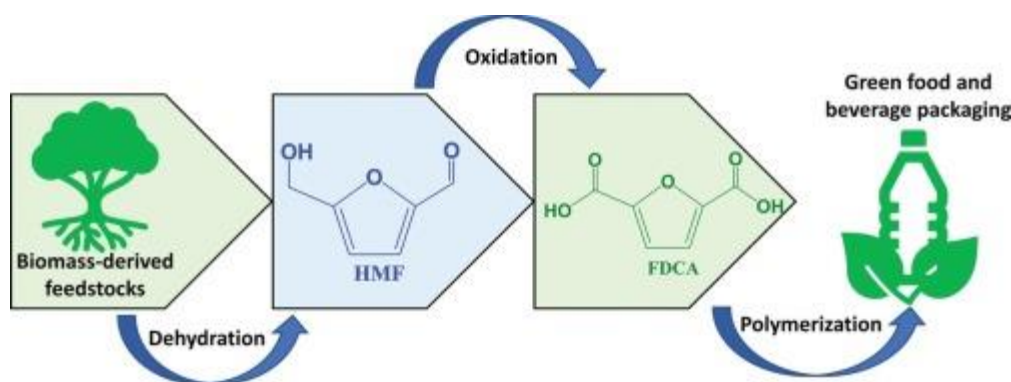
Οι Mathieu et al. πρόσφατα ανακάλυψε ένα νέο AAO από το *Colletotrichum graminicola* που είναι σε θέση να καταλύει αποτελεσματικά την οξείδωση των αρυλαλκοολών αλλά επιδεικνύει ασθενή δραστηριότητα έναντι των υδατανθράκων. Ως εκ τούτου, το AAO (EC 1.1.3.7) αναφέρθηκε ως το πρώτο μέλος της οικογένειας AA5.

Στην ίδια εργασία, αποδείχθηκε ότι το AAO ήταν σε θέση να οξειδώσει το HMF πιο αποτελεσματικά από άλλους βιοκαταλύτες που αναφέρθηκαν προηγουμένως. Ωστόσο, το ένζυμο θα μπορούσε να οξειδώσει αποτελεσματικά το HMF προς το DFF, αλλά θα μπορούσε να μετατρέψει μόνο εν μέρει το HMFCa σε FFCA, με απόδοση 54%. Στην οικογένεια αυτή των ενζύμων η πλειονότητα των ενζύμων εξαρτώνται μόνο από τον χαλκό, γεγονός που τα καταστά εύκολο να παραχθούν και να καθαριστούν, χωρίς να έχουν κάποια άλλη απαίτηση για την εκτέλεση της οξείδωσης. Σε αντίθεση με τα περισσότερα ένζυμα απαιτούν εξωτερικούς συμπαράγοντες για την εκτέλεση της αντίδρασης οξείδωσης, όπως οι εξαρτώμενες από NADPH/NADP+ οξειδάσες. Για αυτό και θεωρείται ότι αυτά τα ένζυμα μπορεί να είναι πολύ αποτελεσματικά στην οξείδωση φουρανίων.

Με τα μέχρι τώρα δεδομένα, είναι προφανές ότι απαιτείται ένας συνδυασμός ενζύμων για να μπορέσει να ολοκληρωθεί η οξείδωση του HMF σε FDCA, με υψηλές αποδόσεις. Στις περισσότερες περιπτώσεις, απαιτείται η χρήση βιοκαταλυτών, όπως οι καταλάσες ή οι υπεροξυγενάσες, προκειμένου να ανακουφιστεί το σύστημα από τις αρνητικές επιπτώσεις του  $H_2O_2$  που παράγεται, ειδικά στην περίπτωση των ενζύμων της οικογένειας AA5. Βέβαια μέσω της μηχανικής πρωτεϊνών μπορούν θεωρητικά τουλάχιστον να παρασκευαστούν ένζυμα που μπορούν να εκτελέσουν ολόκληρη την οξειδωτική οδό (Dedes et al., 2020).

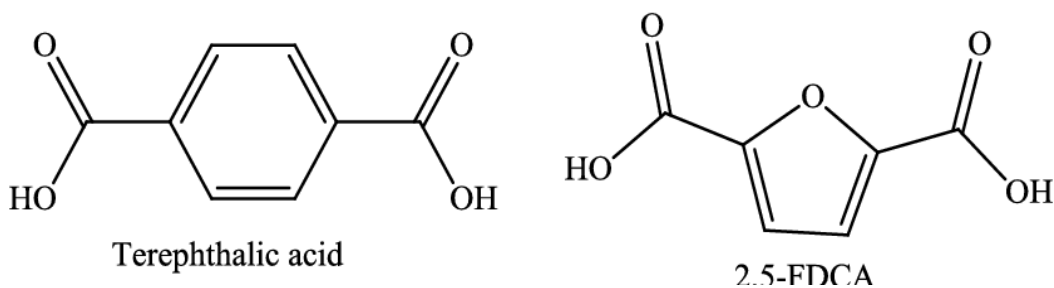
### 3.5.3 Εφαρμογές του 2,5-φουρανοδικαρβοξυλικού οξέος (FDCA)

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. Αυτή η εφαρμογή του φαίνεται και στην παρακάτω εικόνα, όπου φαίνεται η αξιοποίηση της βιομάζας για την παραγωγή του HMF και στη συνέχεια την οξείδωση αυτού για την παραγωγή του FDCA, το οποίο με τη σειρά του μέσω πολυμερισμού παρασκευάζει μπουκάλια.



Εικόνα 10: αξιοποίηση της βιομάζας για την παραγωγή του HMF και στη συνέχεια την οξείδωση αυτού για την παραγωγή του FDCA, το οποίο με τη σειρά του μέσω πολυμερισμού παρασκευάζει μπουκάλια (Pandey et al., 2021)

Η ομοιότητα στη δομή μεταξύ του FDCA και του TPA οφείλεται κυρίως στον αρωματικό φουρανικό δακτύλιο που περιλαμβάνει δύο καρβοξυλικές ομάδες σε αντίθετες θέσεις, όπως φαίνεται και στη παρακάτω εικόνα. Ωστόσο, η αντικατάσταση του φαινυλικού δακτυλίου του TPA με τον φουρανικό δακτύλιο του FDCA έχει ως αποτέλεσμα τη μείωση της αρωματικότητας και του προσανατολισμού κατά μήκος της αλυσίδας του πολυμερούς. Αυτό έχει ως αποτέλεσμα τη μείωση της ισχύος που προκύπτει από τις παρόμοιες πολικές δυνάμεις κατά μήκος του άξονα της αλυσίδας.

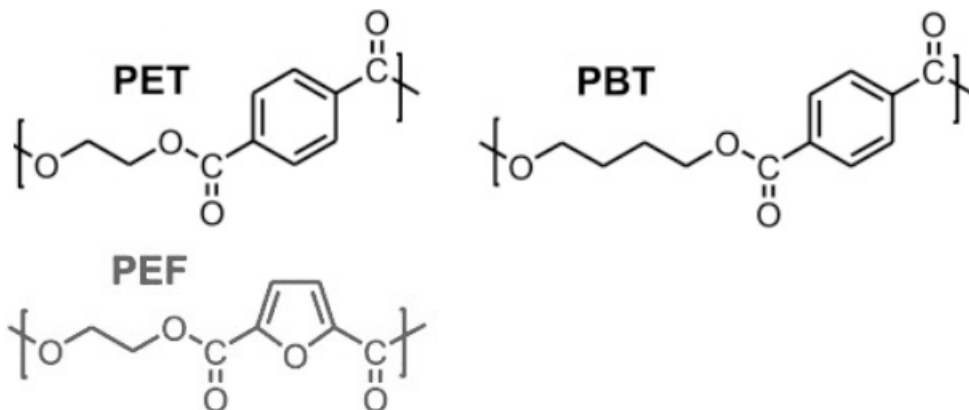


Εικόνα 11: Δομή του FDCA και του TPA

Όμως, η πολικότητα του πολυμερούς αυξάνεται λόγω της παρουσίας οξυγόνου με δύο μονά ηλεκτρονικά ζεύγη, προκαλώντας αυξημένες αλληλεπιδράσεις μεταξύ διαφορετικών αλυσίδων και επηρεάζοντας αναπόφευκτα τις ιδιότητες των παραγόμενων υλικών. Σε σύγκριση με το PET, το PEF εμφανίζει βελτιωμένες ιδιότητες φραγμού του CO<sub>2</sub> και του O<sub>2</sub>, καθώς παρουσιάζει διαπερατότητα

O<sub>2</sub> που είναι 10 φορές χαμηλότερη και διαπερατότητα CO<sub>2</sub> που είναι 20 φορές χαμηλότερη από το αντίστοιχο τereφθαλικό πολυεστέρα. Επιπλέον, το PEF διαθέτει βελτιωμένες θερμικές και μηχανικές ιδιότητες για διάφορες εφαρμογές, όπως τρόφιμα, συσκευασίες, μπουκάλια και ρούχα. Η χαμηλή θερμοκρασία τήξης T<sub>m</sub> (210 - 215°C) επιτρέπει την επεξεργασία του σε χαμηλές θερμοκρασίες, ενώ η υψηλή θερμοκρασία υαλώδους μετάπτωσης T<sub>g</sub> (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 τereφθαλικό πολυβουτυλένιο (PBT) πέρα από το PET για την παραγωγή φιλμ, ίνων, υλικών συσκευασίας και μπουκαλιών αναψυκτικών.



Εικόνα 12: Η δομή του PET, του PEF και του PBT (Carlos Morales-Huerta et al., 2016)

Για να παραχθεί το PEF και το PBF (φουρανοϊκό πολυβουτυλένιο), το FDCA πρέπει να συνδυαστεί με αιθυλενογλυκόλη. Η στρατηγική που εφαρμόζεται σήμερα από ορισμένες εταιρείες βασίζεται στη χρήση βιοαιθυλενογλυκόλης (EG) και μη ανανεώσιμου TPA. Ένα παράδειγμα αυτής της μεθόδου είναι η εταιρεία Coca Cola, που παρήγαγε το PlantBottle, ένα 30% ανανεώσιμο PET. Το PEF συνθέτεται αποτελεσματικά μέσω πολυμερισμού μεταξύ του FDCA και της βιοαιθυλενογλυκόλης (EG), με ποσοστό απόδοσης που υπερβαίνει το 90%. Ένα πλεονέκτημα αυτής της μεθόδου είναι ότι βασίζεται αποκλειστικά σε ανανεώσιμους πόρους. Παρά το γεγονός ότι η βιομηχανική παραγωγή του PEF δεν ήταν μεγάλη λόγω της χαμηλότερης καθαρότητάς του και των δυσκολιών στη διαδικασία παραγωγής του FDCA, αναμένεται να κυριαρχήσει πλήρως τις υπάρχουσες αγορές ως ένα εντελώς νέο πολυμερές με υψηλές ιδιότητες απόδοσης. Υπάρχει πραγματική προσπάθεια για την ταχεία βιομηχανική ανάπτυξη του FDCA, και για αυτό η Avantium έχει συνεργαστεί με την Swire Pacific, The Coca-Cola Company, Danone και Alpla, μεταξύ άλλων, και έχει λάβει χρηματοδότηση κοντά στα 36 εκατομμύρια ευρώ με στόχο την εμπορευσιμότητα του PEF (Hwang et al., 2020; Lalanne et al., 2021; Rajesh et al., 2020; Sousa et al., 2015).

Επιπλέον, το FDCA περιλαμβάνει δύο ομάδες δικαρβοξυλικού οξέος που μπορούν να χρησιμοποιηθούν σε αντιδράσεις πολυσυμπύκνωσης. Με την εστεροποίησή του, μπορεί να παράγει 2,5-φουρανοδικαρβοξυλικό διμεθύλιο (DMFDCA) ή 2,5-φουρανοδικαρβοξυλικό διαιθύλιο, τα οποία ευρέως χρησιμοποιούνται σε πολυμερισμούς λόγω της βελτιωμένης αντιδραστικότητας και διαλυτότητάς τους, καθώς και της χαμηλότερης θερμοκρασίας τήξης σε σύγκριση με το FDCA (Lalanne et al., 2021).

Ακόμη το FDCA μπορεί να χρησιμοποιηθεί για τη σύνθεση άλλων πολυεστέρων, πολυαμιδίων και σημαντικών φουρανικών χημικών ενώσεων. Συγκεκριμένα 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 επίσης χρησιμοποιείται στην παραγωγή εξανοϊκού οξέος, μακροκυκλικών υποκαταστατών, μυκητοκτόνων, αναστολέων διάβρωσης και φιλμ θειολενίου. Ορισμένα παράγωγα του FDCA, όπως το 2,5-διυδροξυμεθυλοφουράνιο και το 2,5-δισ (υδροξυμεθυλο) τετραϋδροφουράνιο, μπορούν να χρησιμοποιηθούν ως συστατικά αλκοόλης στην παραγωγή νέων πολυεστέρων. Το FDCA μπορεί επίσης να λειτουργήσει ως μονομερές στην παραγωγή διαφόρων παραγώγων, όπως το διχλωριδίου-(FDCDCI), το διμεθυλο-(DMFDC) και το δισ (υδροξυαιθυλο)-(BHEFDC), που χρησιμοποιούνται στην παραγωγή πλαστικοποιητών, πολυαμιδίων και πολυεστέρων. Τέλος, το FDCA έχει χηλικές ιδιότητες με ιόντα όπως το  $Ca^{2+}$ , το  $Cu^{2+}$  και το  $Pb^{2+}$  και χρησιμοποιείται ως φάρμακο για την αφαίρεση της πέτρας από τα νεφρά (McKenna et al., 2015; Rajesh et al., 2020).

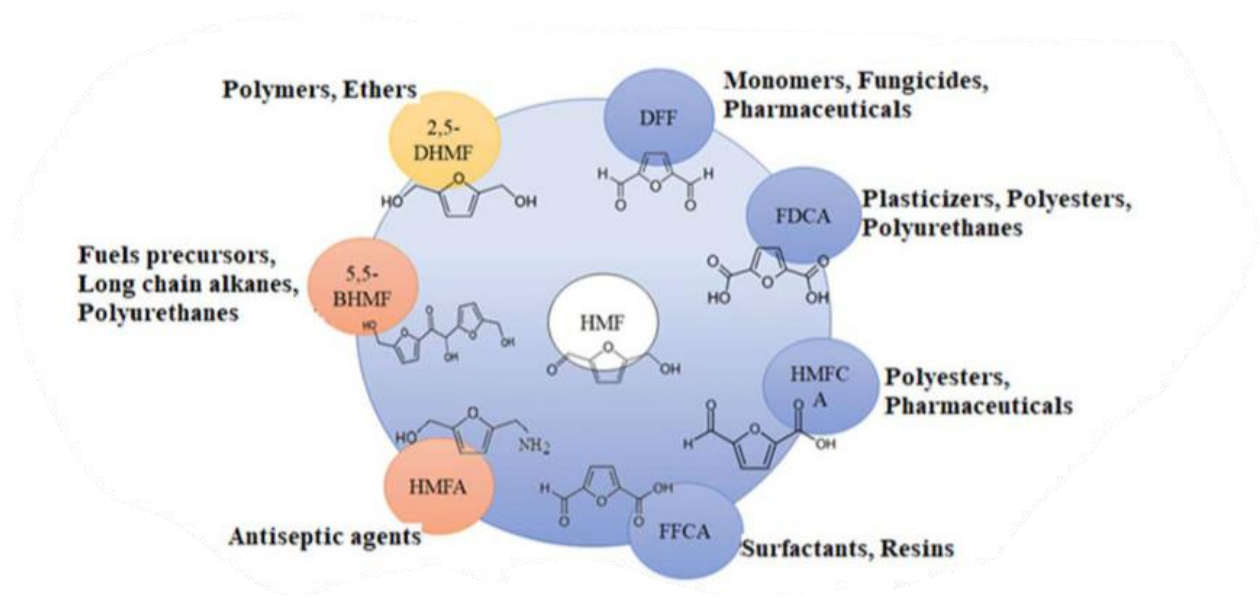
#### 3.5.4 Εφαρμογές άλλων παραγώγων ενώσεων του HMF

Το 2,5-δισ(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 (HMFCOA) 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 (FFCOA) είναι το προϊόν δύο διαδοχικών οξειδώσεων του HMF μέσω DFF ή μέσω HMFCOA και αποτελεί μια ενδιαφέρουσα ενδιάμεση ένωση για τη σύνθεση τασιενεργών, βιοκαυσίμων και ρητινών (Lalanne et al., 2021).



Εικόνα 13: Βιομετατροπή του HMF σε διαφορετικά παράγωγα προστιθέμενης αξίας (FDCA, DFF, HMFC, FFCA, DHMF, BHMF, HMFA) και βιομηχανικές εφαρμογές αυτών (Saikia et al., 2022)

## 4. Πειραματικό μέρος

### 4.1 Υλικά και στήλες Χρωματογραφίας

Για τη μέθοδο της υγρής χρωματογραφίας υψηλής απόδοσης (HPLC, High Performance Liquid Chromatography) χρησιμοποιήθηκε η στήλη Animex HPX-87H Ion Exclusion Column (300x7.8 mm, particle size 9 nm; Bio-rad, Hercules, CA, USA) για τον προσδιορισμό των φουρανίων. Η θερμοκρασία του φούρνου ήταν 65 °C και το μήκος κυματος του ανιχνευτή 273 nm.

### 4.2 *Pichia Pastoris*

Στην παρούσα διπλωματική εργασία παράχθηκε η οξειδάση της γαλακτόζης, η οποία ανήκει στην οικογένεια AA5 της CAZy. Το γονίδιο για την παραγωγή της οξειδάσης της γαλακτόζης απομονώθηκε αρχικά από τον μικροοργανισμό *Fusarium oxysporum*. Για την παραγωγή του μέσω ετερόλογης έκφρασης, χρησιμοποιήθηκε ο ζυμομύκητας *Pichia pastoris*. Ο μονοκύτταρος μεθυλότροφος μικροοργανισμός *P. Pastoris* έχει παραδοσιακά αποτελέσει σύστημα ετερόλογης έκφρασης γονιδίων από ευκαρυωτικούς οργανισμούς, καθώς χαρακτηρίζεται από τα ειδικά λειτουργικά πλεονεκτήματα των ανώτερων συστημάτων έκφρασης, όπως είναι οι μετα-μεταφραστικές τροποποιήσεις (δημιουργία δισουλφιδικών δεσμών και γλυκοζυλίωση πρωτεϊνών).

Η εκτεταμένη χρήση του συστήματος αυτού, οφείλεται στην εύκολη χρήση του και στους υψηλούς ρυθμούς ανάπτυξης, ακόμα και σε θεραπευτικά μέσα ιδιαίτερα χαμηλού κόστους. Επίσης ο μικροοργανισμός *P. pastoris* έχει την ικανότητα να εκφράζει πρωτεΐνες με μεγάλο μοριακό βάρος και αναπτύσσεται είτε σε ανακινούμενες φιάλες είτε σε αντιδραστήρα, γεγονός που το καθιστά κατάλληλο τόσο για μικρής, όσο και για μεγάλης κλίμακας παραγωγή. Συγκεκριμένα, το ένζυμο αλκοολική οξειδάση, το οποίο κωδικοποιείται από δυο γονίδια με υψηλή ομολογία (97% ομολογία), το *AOX1* και το *AOX2*, καταβολίζει τη μεθανόλη σε φορμαλδεΰδη παρουσία οξυγόνου. Υψηλότερα επίπεδα ενζύμου παράγονται με την έκφραση του γονιδίου *AOX1*, εν αντιθέσει με την έκφραση του *AOX2* που οδηγεί σε χαμηλότερα επίπεδα. Τα κύτταρα στα οποία εκφράζονται και τα δυο γονίδια αυξάνονται σε υψηλές συγκεντρώσεις μεθανόλης (φαινότυπος Mut+, methanol utilization plus), ενώ εκείνα στα οποία εκφράζεται μόνο το *AOX2* γονίδιο, έχουν τη δυνατότητα να αυξάνονται σε μικρές της συγκεντρώσεις (φαινότυπος Muts, methanol utilization slow). Τέλος, στο συγκεκριμένο ζυμομύκητα διευκολύνεται η απομόνωση υψηλών συγκεντρώσεων ετερόλογων πρωτεϊνικών μορίων, λόγω έκκρισης περιορισμένων ποσοτήτων ενδογενών πρωτεϊνών.

### 4.3 Εμπορικά ένζυμα

Για την υδρόλυση της κυτταρίνης χρησιμοποιήθηκε 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 στα 137 mg/mL.

Για την ισομερίωση της γλυκόζης σε φρουκτόζη χρησιμοποιήθηκαν η ακινητοποιημένη ισομεράση της γλυκόζης Sweetzyme (Novozymes, Δανία) που προέρχεται από τον μικροοργανισμό *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 την διατήρηση της ενεργότητάς της.

#### 4.4 Ρυθμιστικά διαλύματα

Τόσο για τις υδρολύσεις και τις ισομεριώσεις των λιγνινοκυτταρινούχων υλικών όσο και για τις αντιδράσεις ήταν απαραίτητη η χρήση διαφορετικών ρυθμιστικών διαλυμάτων για την κάλυψη όλου του εύρους τιμών pH. Η χρήση των ρυθμιστικών διαλυμάτων γίνεται για να παραμείνει σταθερό το pH κατά τη διάρκεια της αντίδρασης και να μην επηρεαστεί από τα προϊόντα της αντίδρασης. Η ενεργότητα του ενζύμου ελέγχθηκε ως προς τις διαφορετικές pH, έτσι ώστε να βρεθεί το βέλτιστο. Προς αποφυγή της παρεμπόδισης του ενζύμου λόγω υψηλής αλατότητας, επιλέχθηκε μια συγκέντρωση αλάτων 0,1 M.

##### 4.4.1 Ρυθμιστικό διάλυμα φωσφορικών-κιτρικών (Citrate phosphate buffer)

Το ρυθμιστικό διάλυμα φωσφορικών-κιτρικών έχει εύρος pH=3-7,5.

Για αυτό το ρυθμιστικό διάλυμα αρχικά παρασκευάστηκε διάλυμα όξινου φωσφορικού νατρίου (sodium phosphate dibasic anhydrous)  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$ , όπου για συγκέντρωση διαλύματος 0,1 M και  $M_r = 141,96 \text{ g/mol}$  υπολογίστηκε ότι στα 300 mL απιονισμένου νερού έπρεπε να διαλυθούν 8.52 g όξινου φωσφορικού νατρίου. Ακόμη, παρασκευάστηκε 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  $M_r = 210.14 \text{ g/mol}$  υπολογίστηκε ότι στα 300 mL απιονισμένου νερού έπρεπε να διαλυθούν 6,30 g κιτρικού οξέος. Στη συνέχεια τα δυο διαλύματα αναμείχθηκαν σε κατάλληλες ποσότητες διαλυμάτων έως ότου το pH του προκύπτοντος ρυθμιστικού διαλύματος έλαβε την τιμή pH=3, 3,5, 4, 4,5, 5, 5,5, 6, 6,5, 7, 7,5. Για τις υδρολύσεις των λιγνινοκυτταρινούχων υλικών χρησιμοποιήθηκε ρυθμιστικό διάλυμα φωσφορικών-κιτρικών με pH=5, που αποτελεί τη βέλτιστη τιμή pH για το ένζυμο. Σε 300 mL αυτού του διαλύματος προστέθηκαν 0,06 g αζιδίου του νατρίου (sodium azide) (0,02-0,03 % w/v) που αποτελεί μια ένωση ιδιαίτερα τοξική για μικροοργανισμούς, ώστε να αποτραπούν τυχόν επιμολύνσεις. Ενώ για τις αντιδράσεις χρησιμοποιήθηκαν όλες οι τιμές pH που αναφέρθηκαν χωρίς την προσθήκη αζιδίου του νατρίου.

##### 4.4.2 Ρυθμιστικό διάλυμα φωσφορικών καλίου (Potassium phosphate buffer)

Το ρυθμιστικό διάλυμα φωσφορικού καλίου έχει εύρος pH=6-8.

Αρχικά, παρασκευάστηκε το ρυθμιστικό διάλυμα φωσφορικών καλίου με pH=8. Για αυτό το ρυθμιστικό διάλυμα αρχικά παρασκευάστηκε διάλυμα διβασικού φωσφορικού νατρίου (Potassium phosphate dibasic)  $\text{K}_2\text{HPO}_4$ , όπου για συγκέντρωση διαλύματος 0,1 M και  $M_r = 174,18 \text{ g/mol}$  υπολογίστηκε ότι στα 200 mL απιονισμένου νερού έπρεπε να διαλυθούν 3,27 g διβασικού

φωσφορικού νατρίου. Στο ίδιο διάλυμα διαλύθηκε και μονοβασικό φωσφορικό κάλιο (Potassium phosphate monobasic)  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ , όπου για συγκέντρωση διαλύματος 0.1 M και  $M_r = 136,09 \text{ g/mol}$  υπολογίζεται ότι στα 200 mL απιονισμένου νερού έπρεπε να διαλυθούν 0,18 g διβασικού φωσφορικού νατρίου. Επίσης, παρασκευάστηκε το ρυθμιστικό διάλυμα φωσφορικών καλίου με  $\text{pH}=6$ . Για αυτό το ρυθμιστικό διάλυμα αρχικά παρασκευάστηκε διάλυμα διβασικού φωσφορικού νατρίου (Potassium phosphate dibasic)  $\text{K}_2\text{HPO}_4$ , όπου για συγκέντρωση διαλύματος 0,1 M και  $M_r = 174,18 \text{ g/mol}$  υπολογίστηκε ότι στα 100 mL απιονισμένου νερού έπρεπε να διαλυθούν 0,24 g διβασικού φωσφορικού νατρίου. Στο ίδιο διάλυμα διαλύθηκε και μονοβασικό φωσφορικό κάλιο (Potassium phosphate monobasic)  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ , όπου για συγκέντρωση διαλύματος 0.1 M και  $M_r = 136,09 \text{ g/mol}$  υπολογίστηκε ότι στα 100 mL απιονισμένου νερού έπρεπε να διαλυθούν 1,17 g διβασικού φωσφορικού νατρίου. Στη συνέχεια, τα δυο διαλύματα αναμείχθηκαν σε κατάλληλες ποσότητες διαλυμάτων έως ότου το  $\text{pH}$  του προκύπτοντος ρυθμιστικού διαλύματος λάβει την τιμή  $\text{pH}=6, 6,5, 7, 7,5, 8$ .

#### 4.4.3 Ρυθμιστικό διάλυμα Γλυκίνης -υδροξείδιο του νατρίου (NaOH)

Το ρυθμιστικό διάλυμα γλυκίνης υδροξειδίου του νατρίου έχει εύρος  $\text{pH}=8,6-10,6$ .

Για αυτό το ρυθμιστικό διάλυμα αρχικά παρασκευάστηκε διάλυμα γλυκίνης (glycine)  $\text{NH}_2\text{CH}_2\text{COOH}$ , όπου για συγκέντρωση διαλύματος 0,1 M και  $M_r = 75,07 \text{ g/mol}$  υπολογίστηκε ότι στα 350 mL απιονισμένου νερού έπρεπε να διαλυθούν 3,0028 g γλυκίνης. Ακόμη, παρασκευάστηκε διάλυμα καυστικού νατρίου (Sodium hydroxide)  $\text{NaOH}$ , όπου για συγκέντρωση 0,1 M και  $M_r = 40 \text{ g/mol}$  υπολογίστηκε ότι στα 300 mL απιονισμένου νερού έπρεπε να διαλυθούν 30 mL καυστικού νατρίου συγκέντρωσης 1M. Στη συνέχεια, τα δυο διαλύματα αναμείχθηκαν σε κατάλληλες ποσότητες διαλυμάτων έως ότου το  $\text{pH}$  του προκύπτοντος ρυθμιστικού διαλύματος λάβει την τιμή  $\text{pH}= 8,6, 9, 9,4, 9,8, 10, 10,4, 10,6$ . Για κάθε διάλυμα αναμείχθηκαν 50 ml διαλύματος γλυκίνης με τον αντίστοιχο όγκο διαλύματος καυστικού όπως φαίνεται στον παρακάτω πίνακα:

pH	8.6	9.0	9.4	9.8	10.0	10.4	10.6
Sodium Hydroxide (mL)	4.0	8.8	16.8	27.2	32.0	38.6	45.5

#### 4.5 Χημικά αντιδραστήρια

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

Τα πλαστικά και γυάλινα εργαστηριακά είδη που χρησιμοποιήθηκαν 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).

#### 4.6 Συσκευές και όργανα

Παρακάτω αναφέρονται οι συσκευές και τα όργανα που χρησιμοποιήθηκαν 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
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)

#### 4.7 Παραγωγή οξειδάσης της γαλακτόζης από τον ζυμομύκητα *Pichia pastoris*

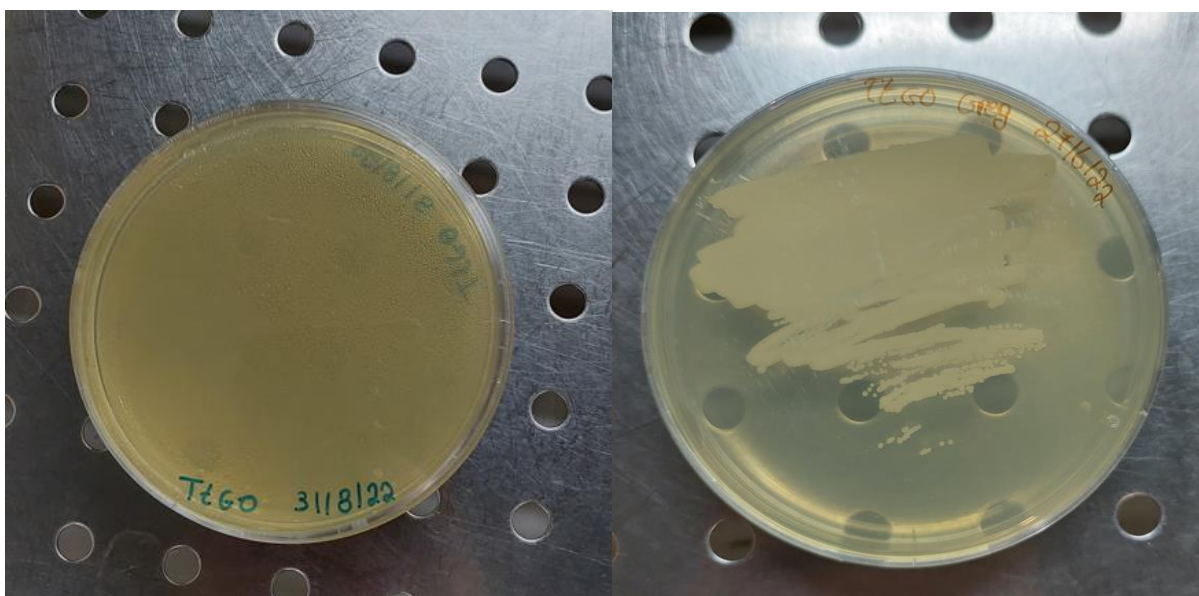
Για την ενζυμική κατάλυση των οξειδωτικών αντιδράσεων της 5-υδροξυμεθυλοφουρφουράλης (HMF) προς τον σχηματισμό σημαντικών δομικών ενώσεων όπως 2,5-Φουρανδικαρβοξυλικό οξύ (FDCA), φουρανδικαρβοξαλδεΐδη (DFF), 5-Υδροξυμεθυλο-2-φουρανκαρβοξυλικό οξύ (HMFCFA) και 5-φορμύλ-2-φουρανκαρβοξυλικό οξύ (FFCA) αναφέρονται διάφορα ένζυμα στη βιβλιογραφία. Επιλέχθηκε να μελετηθεί για την οξειδωτική της δράση στο HMF η οξειδάση της γαλακτόζης. Η οξειδάση της γαλακτόζης ανήκει στην οικογένεια AA5 της CAZy βάσης δεδομένων και τυπικά δρα σε γαλακτόζη. Ωστόσο, ορισμένα ένζυμα αυτής της οικογένειας εντάσσονται σε μία δεύτερη υποοικογένεια λόγω της ενεργότητας τους πάνω σε ενώσεις φουρανίων. Το συγκεκριμένο ένζυμο επιλέχθηκε λόγω της υψηλής ομολογίας του με άλλα αυτής της υποοικογένειας μέσα από βιοπληροφορική ανάλυση.

Για αυτό το σκοπό απομονώθηκε το γονίδιο που εκφράζει την οξειδάση της γαλακτόζης από τον μύκητα *Fusarium oxysporum*. 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 και στη συνέχεια εισαγωγή αυτού στον ζυμομύκητα *Pichia pastoris*. Το μετασχηματισμένο στέλεχος *P. Pastoris* αναπτύχθηκε σε στερεό και στη συνέχεια σε υγρό μέσο.

#### 4.7.1 Ανάπτυξη του μετασχηματισμένου μικροοργανισμού σε τρυβλία

Ο στόχος αυτού του βήματος είναι η ανάπτυξη του μετασχηματισμένου στελέχους *P. pastoris* σε στερεό μέσο. Το θρεπτικό μέσο που χρησιμοποιήθηκε για αυτή την ανάπτυξη ήταν το YPD ( Yeast Extract–Peptone–Dextrose Medium) σύστασης 1% yeast extract, 2% peptone, 2% agar και 2% dextrose.

Οι κατάλληλες ποσότητες ζυγίστηκαν σε αναλυτικό ζυγό και τοποθετήθηκαν σε μπουκάλι αποστείρωσης μαζί με απιονισμένο νερό. Για κάθε τρυβλίο παρασκευάστηκαν 25 ml διαλύματος θρεπτικού. Ο στόχος ήταν η δημιουργία δυο τρυβλίων, άρα τελικός όγκος ήταν 50 ml. Το διάλυμα αυτό τοποθετήθηκε για αποστείρωση στους 109°C για 40 min. Οι συνθήκες αυτές χρησιμοποιήθηκαν αντί των συμβατικών (120 °C, 20 min) προς αποφυγή καραμελοποίησης της γλυκόζης. Μετά την αποστείρωση τοποθετήθηκε το θρεπτικό στα τρυβλία και αφήνεται να στερεοποιηθεί σε θερμοκρασία δωματίου. Στη συνέχεια, με χρήση αποστειρωμένης ράβδου απλώθηκαν στην επιφάνεια του τρυβλίου κύτταρα από το διάλυμα γλυκερόλης στο οποίο είναι αποθηκευμένα. Τα τρυβλία τοποθετήθηκαν ανάποδα στον επωαστήρα, όπου η θερμοκρασία είναι 30°C, ώστε η ανάπτυξη των κυττάρων να γίνει στην επιφάνεια του θρεπτικού και όχι προς τον κύριο όγκο του. Τα τρυβλία παρέμειναν στον επωαστήρα για 48 ώρες.



Εικόνα 14: Στη πρώτη φωτογραφία φαίνεται το θρεπτικό στο τρυβλίο και στη δεύτερη το τρυβλίο μετά από 48 ώρες

#### 4.7.2 Προκαλλιέργεια

Ο στόχος αυτού του βήματος ήταν η ανάπτυξη του μετασχηματισμένου στελέχους *P. pastoris* σε υγρό μέσο. Στις υγρές προκαλλιέργειες ο αριθμός των κυττάρων αυξάνεται. Εφόσον, όμως, δεν προστίθεται μεθανόλη δε μπορεί να πραγματοποιηθεί επαγωγή του γονιδίου για παραγωγή του ενζύμου.

Για τη δημιουργία των προκαλλιεργειών χρησιμοποιήθηκε το θρεπτικό μέσο Buffered Glycerol Complex Medium (BMGY). Παρασκευάστηκαν τέσσερα διαλύματα σε μπουκάλια αποστείρωσης. Το πρώτο περιείχε Yeast extract και peptone διαλυμένα σε απιονισμένο νερό. Συγκεκριμένα διαλύθηκαν 2 gr yeast extract και 4 gr peptone σε 140 ml απιονισμένο νερό. Το δεύτερο διάλυμα περιείχε Buffer Potassium Phosphate buffer με pH=6. Για την παρασκευή αυτού του buffer χρησιμοποιήθηκαν 17,42 gr  $K_2HPO_4$  σε 100 ml απιονισμένο νερό και 54,44 gr  $KH_2PO_4$  σε 400 ml απιονισμένο νερό και τα δυο αυτά διαλύματα αναμίχθηκαν. Το τρίτο διάλυμα περιείχε YNB και ammonium sulfate. Διαλύθηκαν 2 gr ammonium sulfate και 0,68 gr YNB σε 20 ml απιονισμένο νερό. Το τέταρτο διάλυμα είναι αυτό της γλυκερόλης. Διαλύθηκαν 2 ml glycerol σε 20 ml απιονισμένου νερού. Αρχικά τα 2 ml glycerol τοποθετήθηκαν σε ογκομετρικό μαζί με 15 ml απιονισμένου νερού και αφού κλείστηκε με parafilm αναδεύτηκε ώστε να διαλυθεί. Στη συνέχεια συμπληρώθηκε με νερό μέχρι όγκο 20 ml.



Εικόνα 15: Κωνικές φιάλες 250 ml με το θρεπτικό

Επίσης στην αποστείρωση τοποθετήθηκαν και δυο φιάλες έναν κύλινδρο 100 ml και tips γιατί χρησιμοποιούνται στη συνέχεια της διαδικασίας. Η αποστείρωση θα λειτουργήσει στους 121°C για 20 min. Μετά το πέρας, της αποστείρωσης και αφότου τα διαλύματα φτάσουν σε θερμοκρασία δωματίου, θα αναμειχθούν και θα προστεθούν 400 μL βιοτίνης. Το θρεπτικό τότε μοιράστηκε σε κωνικές φιάλες των 250 ml. Κάθε κωνική φιάλη περιείχε 100 ml θρεπτικού, στο οποίο διαλύθηκαν κύτταρα τα οποία απομονώθηκαν από την επιφάνεια του τρυβλίου.

#### 4.7.3 Καλλιέργεια

Ο στόχος αυτού του βήματος ήταν η παραγωγή της οξειδάσης της γαλακτόζης. Με την προσθήκη μεθανόλης γίνεται επαγωγή του γονιδίου της οξειδάσης του μετασχηματισμένου στελέχους *P. Pastoris*, το οποίο είναι υπεύθυνο για την παραγωγή της οξειδάσης της γαλακτόζης.

Για τη δημιουργία των καλλιιεργειών χρησιμοποιήθηκε το θρεπτικό μέσο Buffered Methanol Complex Medium (BMMY). Παρασκευάστηκαν τρία διαλύματα σε μπουκάλια αποστείρωσης. Αρχικά, το διάλυμα Yeast extract και peptone σε απιονισμένο νερό. Για την παρασκευή αυτού του διαλύματος διαλύθηκαν 10 gr yeast extract και 20 gr peptone σε 800 ml απιονισμένο νερό. Μετά παρασκευάστηκε το δεύτερο διάλυμα που περιέχει Yeast nitrogen base without amino acids (YNB) και ammonium sulphate, για το οποίο διαλύθηκαν 3,4 gr YNB και 10 gr ammonium sulphate σε 100 ml απιονισμένο νερό. Τέλος, χρησιμοποιήθηκε και buffer Potassium Phosphate με pH=6. Για την παρασκευή αυτού αναμείχθηκαν τα επιμέρους διαλύματα 17,42 gr  $K_2HPO_4$  σε 100 ml απιονισμένο νερό και 54,44 gr  $KH_2PO_4$  σε 400 ml απιονισμένο νερό.

Τα διαλύματα αυτά τοποθετήθηκαν για αποστείρωση μαζί με έναν ογκομετρικό των 500 mL και δυο 2 L κωνικές φιάλες. Η αποστείρωση λειτούργησε στους 121 °C για 20 min. Στη συνέχεια θα αναμείχθηκαν τα διαλύματα που αναφέρθηκαν μαζί με 2 mL βιοτίνης. Το θρεπτικό τότε μοιράστηκε σε κωνικές φιάλες των 2 L. Κάθε κωνική φιάλη περιείχε 500 mL θρεπτικού, στο οποίο διαλύθηκαν κύτταρα τα οποία απομονώθηκαν από τις προκαλλιέργειες.

Η απαιτούμενη τιμή οπτικής πυκνότητας στις κύριες καλλιέργειες είναι ίση με 1. Για αυτόν το λόγο είναι απαραίτητος ο υπολογισμός του όγκου των κυττάρων που πρέπει να απομονωθούν από τις προκαλλιέργειες. Ο όγκος αυτός θα υπολογιστεί με βάση το νόμο της αραιώσης από την οπτική πυκνότητα των προκαλλιεργειών. Έτσι, για τη μέτρηση της οπτικής πυκνότητας των προκαλλιεργειών έγινε λήψη 100 μL από τον όγκο της καλλιέργειας, τα οποία αραιώθηκαν 40 φορές προκειμένου η ανίχνευση στα 600 nm να είναι εντός ορίων της καμπύλης. Με βάση τα παραπάνω, ο απαιτούμενος όγκος της προκαλλιεργειας υπολογίζεται από την παρακάτω σχέση.

$$V = \frac{OD \cdot 500ml}{40 \cdot \text{μέτρηση φωτομέτρου}} = \frac{1 \cdot 500ml}{40 \cdot \text{μέτρηση φωτομέτρου}}$$

Λήφθηκε ο όγκος που δίνεται από αυτόν τον τύπο, τοποθετήθηκε σε φάλκον και οδηγήθηκε για φυγοκέντρηση, ώστε να κατακαθίσουν τα κύτταρα. Μετά την φυγοκέντρηση απομακρύνθηκε όλο το παλιό θρεπτικό, διότι ο στόχος ήταν η διακοπή της ανάπτυξης των κυττάρων, καθώς δεν θα διέθεταν άλλη πηγή άνθρακα, εκκινώντας, έτσι, την έκφραση του γονιδίου που είναι επιθυμητό για την παραγωγή του ενζύμου. Επειδή με βάση τον σχεδιασμό αυτού του γονιδίου ο υποκινητής ήταν η μεθανόλη, προστίθετο κάθε μέρα μεθανόλη στις καλλιέργειες. Κατά τη μεταφορά, μετά τη φυγοκέντρηση και αφού είχε απομακρυνθεί το παλιό θρεπτικό στο φάλκον, τοποθετήθηκε το θρεπτικό BMMY, επαναιωρήθηκαν τα κύτταρα και μεταφέρθηκαν στη κωνική φιάλη.



Εικόνα 16: Μετά την φυγοκέντριση οι δυο φάσεις, των κυττάρων και του παλιού θρεπτικού

Οι φιάλες τοποθετήθηκαν στον επωαστήρα, όπου οι συνθήκες λειτουργίας του είναι 30 °C και 180 rpm. Κάθε μέρα προστίθεντο στις καλλιέργειες με 2,5 ml μεθανόλη. Οι καλλιέργειες παρέμειναν στον επωαστήρα για 5 d (120 h).



Εικόνα 17: Οι φιάλες της καλλιέργειας μετά από 5 μέρες

#### 4.7.4 Απομόνωση ενζύμου

Κατά τη διάρκεια της καλλιέργειας λαμβάνει χώρα η κυτταρική αύξηση και ανάπτυξη των μετασηματισμένων κυττάρων της *P. Pastoris* σε υγρό μέσο καθώς και η ετερόλογη έκφραση του ενζύμου της οξειδάσης της γαλακτόζης. Έπειτα πρέπει να ακολουθήσει η απομόνωση του ενζύμου, διότι κατά τη παραμονή του στον κύριο όγκο της καλλιέργειας οι πρωτεάσες της *P. Pastoris* το αποδιοργανώνουν (ή τεμαχίζουν). Η δομή και η ενεργότητα των ενζύμων διατηρείται κάτω από αυστηρές συνθήκες. Ο στόχος της απομόνωσης της οξειδάσης της γαλακτόζης είναι ο βιοχημικός και λειτουργικός χαρακτηρισμός της.

#### 4.7.5 Φυγοκέντρηση

Αρχικά τοποθετήθηκε όλη η ποσότητα της καλλιέργειας στα falcon και οδηγήθηκαν για φυγοκέντρηση για 20 min και σε ταχύτητα στροφών 12000 rpm, με στόχο την καθίζηση των κυττάρων και των κυτταρικών θραυσμάτων. Στη συνέχεια το υπερκείμενο, στο οποίο ήταν διαλυμένο το ένζυμο, τοποθετήθηκε σε πάγο και ακολούθησε φιλτράρισμα προκειμένου να καθαριστεί περαιτέρω το διάλυμα από κυτταρικά θραύσματα. Ακόμη το ίζημα των κυττάρων μετά τη φυγοκέντρηση επαναιωρήθηκε και τοποθετήθηκε στην αποστείρωση προς καταστροφή.



Εικόνα 18: Η καλλιέργεια στα falcon μέσα στη φυγόκεντρο

#### 4.7.6 Φιλτράρισμα

Κατά την διήθηση υπό κενό έγινε διαχωρισμός θραυσμάτων κυττάρων και κύτταρων που παρέμειναν στο υπερκείμενο διάλυμα από την φυγοκέντρηση, καθώς και άλλων μεταβολικών ουσιών της *P. Pastoris*, με στόχο την απομόνωση του ενζύμου. Για τον σκοπό αυτό χρησιμοποιήθηκαν πορώδη υλικά. Στο πρώτο βήμα χρησιμοποιήθηκε διηθητικό χαρτί. Στο δεύτερο φίλτρα με δυο διαφορετικές διαμέτρους, συγκεκριμένα φίλτρα διαμέτρου 0,45 μm και μετά φίλτρα 0,22 μm. Όσον αφορά την πειραματική διαδικασία να τονιστεί ότι όλα τα διαλύματα κατά το φιλτράρισμα ήταν τοποθετημένα



σε πάγο. Επίσης, για την δημιουργία κενού χρησιμοποιήθηκε αντλία κενού. Από την διάταξη της διήθησης υπό κενό πέρασε αρχικά το υπερκείμενο διάλυμα της καλλιέργειας που προέκυψε από την φυγοκέντρηση.



Εικόνα 19: Διήθηση υπό κενό στο υπερκείμενο διάλυμα από την φυγοκέντρηση

Στη συνέχεια ακολούθησε υπερδιήθηση με χρήση μοριακών φίλτρων. Στη διήθηση μέσω μεμβρανών ορισμένα σωματίδια διέρχονται, υπό την επίδραση υδροστατικής πίεσης, μέσα από τους πόρους της μεμβράνης, ενώ άλλα συγκρατούνται επάνω στη μεμβράνη. Για αυτό τον σκοπό χρησιμοποιήθηκε η διάταξη της υπερδιήθησης με μοριακά φίλτρα 30 kDa. Ο διαχωρισμός γίνεται βάσει του μοριακού μεγέθους. Η συσκευή λειτουργεί υπό πίεση, συγκεκριμένα 0,4 MPa, αναγκάζοντας το υγρό να διέλθει μέσω της μεμβράνης (MWCO), δεσμεύοντας και συγκεντρώνοντας τα μακρομόρια. Επίσης, λειτουργεί υπό ανάδευση και όλο το σύστημα βρισκόταν μέσα σε πάγο. Τα μόρια με μέγεθος μικρότερο του MWCO διασχίζουν ελεύθερα τις μεμβράνες. Με αυτό τον τρόπο καθαρίζεται το διάλυμα από άλλα μακρομόρια και πρωτεΐνες. Άρα επιτυγχάνεται τόσο ο καθαρισμός όσο και η συμπύκνωση του διαλύματος της οξειδάσης της γαλακτόζης. Εν τέλει το 1 L της αρχικής καλλιέργειας συμπυκνώθηκε σε 50 ml.



Εικόνα 20: υπερδιήθηση με χρήση μοριακών φίλτρων

#### 4.7.7 Αλλαγή ρυθμιστικού διαλύματος (Dialysis)

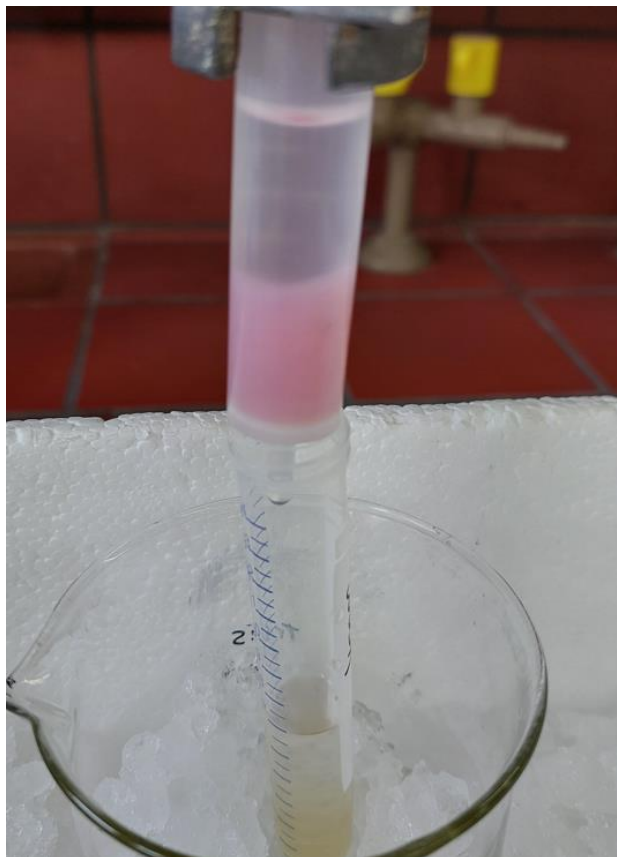
Συχνά είναι επιθυμητό να βρίσκεται το ενζύμο σε ένα συγκεκριμένο σύστημα ρυθμιστικού διαλύματος. Η μέθοδος αυτή στηρίζεται στην αρχή της ώσμωσης. Ακόμη, η τεχνική αυτή είναι μια τεχνική διαχωρισμού που διευκολύνει την απομάκρυνση μικρών, ανεπιθύμητων ενώσεων από μακρομόρια σε διάλυμα με επιλεκτική και παθητική διάχυση μέσω μιας ημιπερατής μεμβράνης. Χρησιμοποιήθηκαν πορώδεις μεμβράνες με συγκεκριμένο μοριακό βάρος αποκοπής (cut-off MWCO). Η οξειδάση της γαλακτόζης παρέμεινε μέσα στη μεμβράνη. Μόρια με μικρότερο μέγεθος από το MWCO ήταν ελεύθερα να διασχίσουν τη μεμβράνη.

Ο στόχος ήταν το σύστημα ρυθμιστικού διαλύματος στο οποίο θα υπάρχει η πρωτεΐνη να έχει το ίδιο pH με την στήλη TALON. Για την αλλαγή ρυθμιστικού διαλύματος μετά την διαδικασία του φιλτραρίσματος παρασκευάστηκε το ρυθμιστικό διάλυμα Τρις(υδροξυμεθυλο)αμινομεθάνιου και χλωριούχου νατρίου με pH=8. Για αυτό το ρυθμιστικό αρχικά παρασκευάστηκε το διάλυμα Τρις(υδροξυμεθυλο)αμινομεθάνιου (Tris base)  $\text{NH}_2\text{C}(\text{CH}_2\text{OH})_3$ , όπου για συγκέντρωση διαλύματος 0,5 M και  $M_r = 121,14 \text{ g/mol}$  υπολογίστηκε ότι στο 1 L απιονισμένου νερού έπρεπε να διαλυθούν 60,57 g Τρις(υδροξυμεθυλο)αμινομεθάνιου. Στο ίδιο διάλυμα διαλύθηκε και χλωριούχο νάτριο (Sodium chloride) NaCl, όπου για συγκέντρωση διαλύματος 3 M και  $M_r = 58 \text{ g/mol}$  υπολογίστηκε ότι στο 1 L απιονισμένου νερού έπρεπε να διαλυθούν 174 g χλωριούχου νατρίου. Για την χρήση αυτού του ρυθμιστικού διαλύματος στην αλλαγή ρυθμιστικού διαλύματος (dialysis) αραιώθηκε σε αναλογία 1:10, δηλαδή 500 mL διαλύθηκαν σε τελικό όγκο 5 L. Επειδή η βασική αρχή είναι ότι το διάλυμα πρέπει να έχει όγκο δεκαπλάσιο από αυτό που θα εισέλθει στην μεμβράνη για τα 50 ml παρασκευάστηκε διάλυμα τελικού όγκου 5 L. Το διάλυμα που περιείχε το ένζυμο της οξειδάσης της γαλακτόζης από τα φιλτραρίσματα τοποθετήθηκε σε μεμβράνες. Οι μεμβράνες αυτές πρώτα είχαν

ενυδατωθεί, καθώς τοποθετήθηκαν σε βραστό νερό για 30 min. Τέλος τοποθετήθηκε το δοχείο με το dialysis στο cold room για 24 hr.

Η τεχνική αλλαγή ρυθμιστικού διαλύματος (Dialysis) χρησιμοποιήθηκε και μετά την στήλη TALON έτσι ώστε να βρίσκεται το διάλυμα του απομονωμένου ενζύμου στο βέλτιστο σύστημα ρυθμιστικού διαλύματος για την αποθήκευση του. Για την αλλαγή ρυθμιστικού διαλύματος μετά την διαδικασία του φιλτραρίσματος παρασκευάστηκε το ρυθμιστικό διάλυμα Τρις(υδροξυμεθυλο)αμινομεθάνιου και υδροχλωρίου με pH=8. Για αυτό το ρυθμιστικό αρχικά παρασκευάστηκε το διάλυμα Τρις(υδροξυμεθυλο)αμινομεθάνιου (Tris base)  $\text{NH}_2\text{C}(\text{CH}_2\text{OH})_3$ , όπου για συγκέντρωση διαλύματος 20 mM υπολογίστηκε ότι στο 1 L απιονισμένου νερού έπρεπε να διαλυθούν 2,42 g Τρις(υδροξυμεθυλο)αμινομεθάνιου. Στο ίδιο διάλυμα προστέθηκε υδροχλώριο (Hydrochloric acid) HCl με Mr= 36,46 g/mol έτσι ώστε η τιμή του pH του διαλύματος να είναι 8. Επειδή η βασική αρχή είναι ότι το διάλυμα πρέπει να έχει όγκο δεκαπλάσιο από αυτό που θα εισέλθει στην μεμβράνη για τα 10 ml παρασκευάστηκε διάλυμα τελικού όγκου 1 L. Το διάλυμα που περιείχε το ένζυμο της οξειδάσης της γαλακτόζης τοποθετήθηκε σε μεμβράνες. Οι μεμβράνες αυτές πρώτα είχαν ενυδατωθεί, καθώς τοποθετήθηκαν σε βραστό νερό για 30 min. Τέλος τοποθετήθηκε το δοχείο με το dialysis στο cold room για 24 h.

#### 4.7.8 Χρωματογραφία συγγένειας (TALON Metal Affinity Chromatography)



Εικόνα 21: Χρωματογραφία συγγένειας

Στη χρωματογραφία προσρόφησης οι πρωτεΐνες δεσμεύονται στη στατική φάση και στη συνέχεια εκλούνται με τη μεταβολή της κινητής φάσης. Τα είδη της χρωματογραφίας προσρόφησης είναι συγγένειας, υδροφοβικές αλληλεπιδράσεις, ιοντικής ανταλλαγής και χρωματοεστίαση. Σε αυτή την εργασία χρησιμοποιήθηκε η μέθοδος της χρωματογραφίας συγγένειας (TALON Metal Affinity Chromatography). Το πρωτεϊνικό διάλυμα εισάγεται σε μία στήλη. Η στήλη αποτελείται από στερεή πορώδη μήτρα, η οποία είναι η στατική φάση και υγρό, το οποίο είναι η κινητή φάση. Η πρωτεΐνη συγκρατείται από την ρητίνη λόγω των ιόντων ιστιδίνης που προσκολλούνται στα ιόντα κοβαλτίου της ρητίνης. Για το σκοπό αυτό, προστέθηκε στο τέλος της αλληλουχίας του γονιδίου μία σύντομη αλληλουχία έξι αμινοξέων ιστιδίνης (His tag). Αρχικά ξεπλύθηκε μία φορά η στήλη της χρωματογραφίας με απιονισμένο νερό και 3 φορές με ρυθμιστικό διάλυμα Τρις(υδροξυμεθυλο)αμινομεθάνιου και χλωριούχου νατρίου με pH=8 για να παρασυρθούν και να ξεπλυθούν τυχόν άλλες άσχετες πρωτεΐνες μέσω της στήλης. Στη συνέχεια προστέθηκε το δείγμα δηλαδή το διάλυμα που περιέχει το ένζυμο στη στήλη. Έπειτα προστέθηκαν στη στήλη 10 ml ρυθμιστικού διαλύματος Τρις(υδροξυμεθυλο)αμινομεθάνιου και χλωριούχου νατρίου με pH=8 (Talon buffer) και το διάλυμα που εκλούεται (wash) αποθηκεύεται. Στη συνέχεια προστέθηκαν στη στήλη 5 ml ρυθμιστικού διαλύματος Τρις(υδροξυμεθυλο)αμινομεθάνιου και χλωριούχου νατρίου με (Talon buffer) και 5 mM ιμιδαζολίου σε ρυθμιστικό διάλυμα Τρις(υδροξυμεθυλο)αμινομεθάνιου και χλωριούχου νατρίου. Σε αυτή τη μέθοδο η πρωτεΐνη του ενδιαφέροντος που είχε δεσμευτεί από την στήλη εκλούεται με την προσθήκη διαλύματος υψηλής συγκέντρωσης ιμιδαζολίου. Για αυτό το σκοπό προστέθηκαν στη στήλη δυο φορές 7,5 ml 100 mM ιμιδαζολίου σε ρυθμιστικό διάλυμα Τρις(υδροξυμεθυλο)αμινομεθάνιου και χλωριούχου νατρίου. Σε αυτό το βήμα συλλέχθηκε και αποθηκεύτηκε το κλάσμα έκλυσης, καθώς περιείχε το ένζυμο. Τέλος για να καθαριστεί η στήλη προστέθηκε 4 φορές στη στήλη απιονισμένο νερό και αποθηκεύτηκε η στήλη σε διάλυμα 20% v/v αιθανόλη.

Για την παρασκευή του διαλύματος 100 mM ιμιδαζολίου σε ρυθμιστικού διαλύματος Τρις(υδροξυμεθυλο)αμινομεθάνιου και χλωριούχου νατρίου pH=8 διαλύθηκαν 0,204 gr ιμιδαζολίου (Imidazole) με μοριακό βάρος  $M_r = 68,08 \text{ g / mol}$  σε 30 ml ρυθμιστικού διαλύματος Τρις(υδροξυμεθυλο)-αμινομεθάνιου και χλωριούχου νατρίου.

Για παρασκευή του διαλύματος 5 mM ιμιδαζολίου σε ρυθμιστικού διαλύματος Τρις(υδροξυμεθυλο)αμινομεθάνιου και χλωριούχου νατρίου pH=8 διαλύονται 0,5 ml 100 mM ιμιδαζολίου σε ρυθμιστικού διαλύματος Τρις(υδροξυμεθυλο)αμινομεθάνιου και χλωριούχου νατρίου σε 9,5 ml ρυθμιστικού διαλύματος Τρις(υδροξυμεθυλο)αμινομεθάνιου και χλωριούχου νατρίου.

Μετά από αυτή τη διαδικασία φωτομετρήθηκαν τα εκλουόμενα διαλύματα από την χρωματογραφία συγγένειας σε UV plate στα 280 nm δείγμα από τα κλάσματα wash, ιμιδαζόλιο 100 mM καθώς και ιμιδαζόλιο 5 mM. Για τυφλό χρησιμοποιήθηκε το διάλυμα ρυθμιστικού διαλύματος Τρις(υδροξυμεθυλο)αμινομεθάνιου και χλωριούχου νατρίου. Ο στόχος αυτής της φωτομέτρησης ήταν να γίνει μια πρώτη μέτρηση για την παρουσία ή μη πρωτεϊνών στο διάλυμα.

#### 4.8 Bradford

Η μέθοδος Bradford (Bradford 1976) αφορά την ανίχνευση πρωτεϊνών. Είναι μια φωτομετρική μέθοδος που βασίζεται στην αλλαγή χρώματος της βαφής Coomassie Brilliant Blue G-250 κατά την πρόσδεσή της στις πρωτεΐνες. Η βαφή είναι καφέ στην ελεύθερη μορφή της όμως μετατρέπεται σε σκούρο μπλε κατά την πρόσδεσή της στις πρωτεΐνες. Το σύμπλοκο που δημιουργείται ανιχνεύεται στα 595 nm και αντιστοιχεί στη ποσότητα πρωτεΐνης που υπάρχει στο διάλυμα. Η μέθοδος αυτή μπορεί να χρησιμοποιηθεί ποιοτικά για την ανίχνευση πρωτεϊνών σε ένα διάλυμα ενώ μπορεί να χρησιμοποιηθεί και ποσοτικά για τον ακριβή προσδιορισμό της συγκέντρωσης πρωτεϊνών με χρήση καμπύλης αναφοράς.

Στο πείραμά μας χρησιμοποιήθηκαν αραιώσεις 1:100, 1:50, 1:20 του ενζύμου που παράχθηκε, ενώ για τη μέτρηση προστέθηκαν 25  $\mu\text{L}$  από κάθε δείγμα σε 1000  $\mu\text{L}$  διαλύματος Bradford. Ακολούθησε έντονη ανάδευση και φωτομέτρηση στα 595 nm.



Εικόνα 22: Μέθοδος Bradford, δείγμα με πρωτεΐνη (δεξιά) και χωρίς (αριστερά)

#### 4.9 Δοκιμασία προσδιορισμού ενεργότητας ενζύμου (Enzyme Assay)

Σημαντικό είναι να εξεταστεί πέρα από την συγκέντρωση του ενζύμου στο διάλυμα και η ενεργότητα του. Για αυτό το σκοπό χρησιμοποιήθηκε ένα τεστ ενεργότητας. Η αντίδραση που χρησιμοποιήθηκε είναι αυτή του ενζύμου της οξειδάσης της γαλακτόζης με το φυσικό του υπόστρωμα, το οποίο είναι η γαλακτόζη. Από την οξείδωση της γαλακτόζης παράγεται υπεροξείδιο του υδρογόνου (Hydrogen peroxide)  $\text{H}_2\text{O}_2$  το οποίο διασπάει η υπεροξειδάση του χρένου HRP (Horseradish peroxidase) και αυτή με τη σειρά του δημιουργεί ένα σύμπλοκο με το ερυθρό της φαινόλης (phenol red) το οποίο δίνει απορρόφηση στα 610nm.

Για την δοκιμασία προσδιορισμού ενεργότητας του ενζύμου χρησιμοποιήθηκε το ρυθμιστικό διάλυμα φωσφορικών καλίου με την τιμή του pH να είναι 6, διότι αυτό βρέθηκε ότι ήταν το βέλτιστο για αυτή την αντίδραση. Επίσης, παρασκευάστηκε διάλυμα γαλακτόζης (galactose)  $\text{C}_6\text{H}_{12}\text{O}_6$ , όπου για

συγκέντρωση διαλύματος 50 mM και  $M_r = 180,16 \text{ g/mol}$  υπολογίστηκε ότι στο 1,5 ml απιονισμένου νερού έπρεπε να διαλυθούν 0,0135 g γαλακτόζης. Ακόμη, παρασκευάστηκε το διάλυμα υπεροξειδάσης του χρένου HRP (Horseradish peroxidase), όπου για συγκέντρωση διαλύματος 0,6 mg/ml υπολογίστηκε ότι στο 1,5 ml απιονισμένου νερού έπρεπε να διαλυθούν 0,9 mg υπεροξειδάσης του χρένου. Στο ίδιο διάλυμα διαλύθηκε και ερυθρό της φαινόλης PR (phenol red)  $C_{19}H_{14}O_5S$ , όπου για συγκέντρωση διαλύματος 1mg/ml υπολογίστηκε ότι στο 1,5 ml απιονισμένου νερού έπρεπε να διαλυθούν 1,5 mg ερυθρού της φαινόλης. Τέλος, παρασκευάστηκε διάλυμα υδροξειδίου του νατρίου (sodium hydroxide), όπου για συγκέντρωση διαλύματος 1 M και  $M_r = 40 \text{ g/mol}$  υπολογίστηκε ότι στο 1,5 ml απιονισμένου νερού έπρεπε να διαλυθούν 60 mg.

Πιο αναλυτικά, έλαβε χώρα αντίδραση σε ειδική κυβέττα (microplate) στο πολυφωτόμετρο SpectraMAX 250 στους 35 °C για 15 min. Στη συνέχεια τοποθετήθηκαν 30 μl διαλύματος καυστικού νατρίου 1M, με σκοπό τον τερματισμό της αντίδρασης και ακολούθησε φωτομέτρηση στα 610 nm. Ο όγκος της αντίδρασης ήταν 220 μl από τα οποία τα 158 μl αποτελούσαν το ρυθμιστικό διάλυμα φωσφορικών καλίου, τα 20 μl γαλακτόζη 50 mM, τα 20 μl ένζυμο και τα 22 μl διάλυμα υπεροξειδάσης του χρένου με ερυθρό της φαινόλης HRP-PR. Συνεπώς, ο τελικός όγκος του φωτομετρούμενου δείγματος, δηλαδή μαζί με τα 30 μl διαλύματος καυστικού νατρίου, ήταν 250 μl.

Για να μπορεί να χρησιμοποιηθεί το αποτέλεσμα από αυτή την φωτομέτρηση τοποθετήθηκαν στο ίδιο microplate τυφλά δείγματα. Το ένα περιέχει buffer, HRP-HR και ένζυμο αλλά αντί για την γαλακτόζη περιείχε νερό. Το δεύτερο τυφλό περιείχε buffer, γαλακτόζη και HRP-HR αλλά αντί για ένζυμο περιείχε νερό. Ο στόχος των τυφλών ήταν να μετρήσουν την απορρόφηση που έχει το buffer, το ένζυμο και η γαλακτόζη ώστε να μην επηρεάσουν την μέτρηση.

Ως μονάδα ενζυμικής ενεργότητας (Unit), ορίστηκε η ποσότητα του ενζύμου που καταλύει το σχηματισμό 1 μmol προϊόντος από το υπόστρωμα ανά λεπτό υπό τις συνθήκες του πρωτοκόλλου της ενζυμικής αντίδρασης.

#### 4.10 Συμπύκνωση

Η συμπύκνωση του διαλύματος του ενζύμου εφαρμόζεται όταν στόχος είναι να αυξηθεί η συγκέντρωση του ενζύμου είτε για να αυξηθεί η ενζυμική ενεργότητα είτε για να οδηγηθεί σε ηλεκτροφόρηση, ώστε να γίνει ο χαρακτηρισμός της πρωτεΐνης. Καθώς μια από τις βασικότερες εφαρμογές της υπερδιήθησης είναι η συμπύκνωση θα χρησιμοποιηθεί αυτή η μέθοδος. Στη συμπύκνωση, το νερό από τα υδατικά διαλύματα αφαιρείται με μεμβράνες και η διαλυμένη ουσία, στην περίπτωση αυτή η οξειδάση της γαλακτόζης, συμπυκνώνεται. Η αρχή λειτουργίας των μεμβρανών περιεγράφηκε και στην υπερδιήθηση. Για την συμπύκνωση του ενζύμου με υπερδιήθηση χρησιμοποιήθηκαν δυο διατάξεις.

Στην περίπτωση που ήταν διαθέσιμη για συμπύκνωση μεγάλη ποσότητα ενζύμου, δηλαδή πάνω από 15 ml, χρησιμοποιήθηκε η διάταξη υπερδιήθησης της Amicon Stirred Cell με μοριακά φίλτρα 30 kDa για μικρότερους όγκους που μπορεί να συμπυκνώσει μέχρι και αρχικό όγκο 50 ml. Η συσκευή λειτουργεί υπό πίεση, συγκεκριμένα 0,4 MPa, αναγκάζοντας το υγρό να διέλθει μέσω της μεμβράνης (MWCO), δεσμεύοντας και συγκεντρώνοντας τα μακρομόρια. Επίσης, λειτουργεί υπό ανάδευση και όλο το σύστημα βρισκόταν μέσα σε πάγο. Η έξοδος του συστήματος κατέληγε σε ογκομετρικό

κύλινδρο ώστε να μπορεί να υπολογιστεί ο τελικός όγκος του ενζυμικού διαλύματος με ακρίβεια. Εφόσον είχε φτάσει στο επιθυμητό επίπεδο συμπύκνωσης ακολούθησε δοκιμασία προσδιορισμού ενεργότητας ενζύμου (Enzyme Assay) τόσο διάλυμα του ενζύμου μετά τη συμπύκνωση όσο και στο διήθημα (flowthrough) για να επιβεβαιωθεί η επιτυχία της συμπύκνωσης.



Εικόνα 23: Διάταξη υπερδιήθησης της Amicon Stirred Cell συνολικού όγκού 50 ml με μοριακά φίλτρα 30 kDa

Η δεύτερη διάταξη συμπύκνωσης με υπερδιήθηση εφαρμόστηκε όταν οι όγκοι ήταν μικρότεροι και συνήθως χρησιμοποιήθηκε όταν ο στόχος ήταν η συμπύκνωση του διαλύματος του ενζύμου ώστε να ακολουθήσει ηλεκτροφόρηση της πρωτεΐνης σε πήκτωμα πολυακρυλαμιδίου υπό αποδιατακτικές συνθήκες (SDS-PAGE). Για αυτό το σκοπό χρησιμοποιήθηκε ειδική διάταξη με δυο falcon και τα αντίστοιχα φίλτρα που τοποθετήθηκαν μέσα σε αυτά. Επίσης χρησιμοποιήθηκαν δυο falcon 15 ml για την συλλογή των διαλυμάτων του συμπυκνωμένου ενζύμου και του διηθήματος (flowthrough). Επίσης και αυτή τη διάταξη βρίσκονταν σε πάγο. Με πιπέτα μεταφέρθηκαν 500 μl από το διάλυμα του ενζύμου στο falcon με το φίλτρο. Στη συνέχεια τοποθετήθηκαν τα falcon στη ψυχόμενη φυγόκεντρο, η θερμοκρασία έπρεπε να είναι κάτω από 10 °C, και οι συνθήκες λειτουργίας ήταν 10 min σε 10000 rpm. Λόγω της φυγόκεντρου ασκούνταν η κατάλληλη πίεση ώστε να περάσει από το φίλτρο και να γίνει η συμπύκνωση. Έπειτα αφαιρούνταν από τη φυγόκεντρο τα δείγματα και το διήθημα (flowthrough) το οποίο είχε μείνει στο φίλτρο τοποθετήθηκε στο κατάλληλο falcon. Ενώ το συμπύκνωμα παρέμενε στο falcon. Στη συνέχεια τοποθετήθηκε ξανά το φίλτρο στο ειδικό falcon και προστέθηκαν 400 μl από το διάλυμα με το ένζυμο και επαναλήφθηκε η ίδια διαδικασία. Μετά ακολουθούθηκε η ίδια διαδικασία αλλά αυτή τη φορά θα προστέθηκαν 400 μl από το διάλυμα με το ένζυμο και επαναλήφθηκε η ίδια διαδικασία. Στο τέλος το συμπυκνωμένο διάλυμα του ενζύμου φωτομετρήθηκε σε ειδική κυβέττα (microplate) UV στο πολυφωτόμετρο SpectraMAX 250 στα 280 nm. Με στόχο τον υπολογισμό της συγκέντρωσης των πρωτεϊνών.

#### 4.11 Ηλεκτροφόρηση Πρωτεϊνών σε πήκτωμα Πολυακρυλαμιδίου υπό Αποδιατακτικές Συνθήκες SDS-Page gel (sodium dodecyl sulfate–polyacrylamide gel electrophoresis)

Η ηλεκτροφόρηση (electrophoresis) εφαρμόζεται για τον χωρισμό φορτισμένων βιομορίων, ανάλογα με το φορτίο και το μέγεθός τους σε ηλεκτρικό πεδίο. Η ταχύτητα κίνησης της πρωτεΐνης κατά την ηλεκτροφόρηση καθορίζεται από το καθαρό φορτίο της, το οποίο εξαρτάται από το pH. Επειδή το σχήμα και το φορτίο διαφορετικών πρωτεϊνών είναι διαφορετικά σε μια συγκεκριμένη τιμή του pH, η ταχύτητα τους στο ηλεκτρικό πεδίο θα είναι επίσης διαφορετική με αποτέλεσμα τον διαχωρισμό τους σε ένα ηλεκτρικό πεδίο. Για αυτό το λόγο το μοριακό βάρος του ενζύμου προσδιορίστηκε πειραματικά με τη βοήθεια ηλεκτροφορητικών τεχνικών. Αυτό βοήθησε στη διαδικασία πιστοποίησης ότι το ένζυμο που έχει απομονωθεί ήταν αυτό που ήταν ο στόχος της καλλιέργειας, δηλαδή η οξειδάση της γαλακτόζης και σε υψηλή καθαρότητα. Ακολουθεί περιγραφή των μεθόδων ηλεκτροφόρησης και των προτύπων διαλυμάτων που χρησιμοποιήθηκαν για τη βαθμονόμηση.

Η ηλεκτροφόρηση πρωτεϊνών σε πήκτωμα πολυακρυλαμιδίου σε αποδιατακτικές συνθήκες χρησιμοποιείται ως μέθοδος για το διαχωρισμό πρωτεϊνικών μορίων. Το πήκτωμα προκύπτει από τον πολυμερισμό του ακρυλαμιδίου σε μακριές αλυσίδες αλλά και σε εγκάρσιες διακλαδώσεις, ο οποίος πραγματοποιείται με την προσθήκη καταλύτη (υπερθεϊκό αμμώνιο-APS) και ενεργοποιητή (N,N,N',N'-τετραμεθυλο-αιθυλενο-διαμίνη- TEMED) και δημιουργείται ανάμεσα σε δυο γυάλινες πλάκες.

Οι αποδιατακτικές συνθήκες εξασφαλίζονται με χρήση διαλύματος δωδεκακυλοθειικού νατρίου (SDS), ενός ανιονικού απορρυπαντικού, και β-μερκαπτοαιθανόλης η οποία ανάγει τους δισουλφιδικούς δεσμούς. Η αποδιάταξη ολοκληρώνεται με θέρμανση. Τα ανιόντα του SDS δεσμεύονται στις πρωτεΐνες σε αναλογία ένα μόριο ανά 2 αμινοξέα, δίνοντας στο σύμπλοκο ισχυρό αρνητικό φορτίο. Σαν αποτέλεσμα, το αρχικό φορτίο της φυσικής πρωτεΐνης καθίσταται αμελητέο και τα σύμπλοκα SDS-αποδιαταγμένης πρωτεΐνης μετακινούνται με κατεύθυνση από την κάθοδο προς την άνοδο. Κατά αυτόν τον τρόπο η απόσταση που διανύει η πρωτεΐνη εντός του πήκτωματος εξαρτάται αποκλειστικά από τη μάζα της.

Η ηλεκτροφόρηση πολυακρυλαμιδίου με SDS επιτελείται σε ένα πολύ-ρυθμιστικό σύστημα (Multi Buffer System, MBS) διαμέσου δύο πήκτωμάτων (επιστοιβάσης και διαχωρισμού), με το ένα να επιστοιβάζεται του άλλου. Το πήκτωμα επιστοιβάσης επιτρέπει τη δημιουργία μεγάλων πόρων, με αποτέλεσμα τα πολυπεπίδια μικρού και μεγάλου μοριακού βάρους να μετατοπίζονται με τη ίδια κινητικότητα και να παρατάσσονται στη γραμμή διαχωρισμού των δυο πήκτωμάτων. Στη συνέχεια, οι μικρότεροι πόροι του πήκτωματος διαχωρισμού επιβάλλουν διαφορετική κινητικότητα στα πολυπεπίδια ανάλογα με τη μάζα τους.

Η συσκευή ηλεκτροφόρησης που χρησιμοποιήθηκε ήταν η Mini-Protean 3 (Biorad, Η.Π.Α.).

Για την ηλεκτροφόρηση του ενζύμου σε πήκτωμα πολυακρυλαμιδίου υπό αποδιατακτικές συνθήκες (SDS – PAGE) παρασκευάστηκε πήκτωμα που αποτελούνταν από δύο τμήματα. Για τη σταθεροποίηση των δύο πήκτωμάτων χρησιμοποιήθηκε ζεύγος γυάλινων πλακών (10,1 cm × 7,3 cm και 10,1 cm × 8,3 cm) που στερεώθηκαν με τη βοήθεια πλαστικών σφικτήρων και σταθεροποιήθηκαν σε κάθετη θέση



με τη βοήθεια κατάλληλης βάσης. Πρώτα έπρεπε να κατασκευαστεί η διάταξη και να ελεγχθεί πως δεν υπήρχε κάποια διαρροή. Εφόσον δεν υπήρχε πρόβλημα το νερό αφαιρούνταν.

Το διάλυμα του υπερθειικού αμμωνίου (ammonium persulfate)  $(\text{NH}_4)_2\text{S}_2\text{O}_8$  κατασκευαζόταν κάθε φορά νέο. Η συγκέντρωσή του ήταν 10% υπερθειικού αμμωνίου σε νερό.

Αρχικά, ο χώρος ανάμεσα στις γυάλινες πλάκες πληρώθηκε κατά 70% με το μίγμα του πηκτώματος διαχωρισμού 12,5% (resolving gel) και αφέθηκε περίπου 20 min για να ολοκληρωθεί ο πολυμερισμός και να σταθεροποιηθεί. Η σύσταση του πηκτώματος διαχωρισμού φαίνεται στον παρακάτω πίνακα:

Πίνακας 2: Σύσταση πηκτώματος διαχωρισμού 12,5% (Resolving gel) για την ηλεκτροφόρηση σε πηκτώμα πολυακρυλαμιδίου υπό αποδιατακτικές συνθήκες (SDS – PAGE)

Πήκτωμα διαχωρισμού 12,5% (Resolving gel)	
Αντιδραστήρια	Προστιθέμενος όγκος
ddH <sub>2</sub> O	3,5
0,75 M Tris, 0,2%w/v SDS, pH=8,8	9,4
40% bis-acrylamide	5,8
TEMED	0,03
10% w/v APS	0,09

Στη συνέχεια ο κενός χώρος πάνω από το πηκτώμα διαχωρισμού πληρώθηκε με το πηκτώμα επιστοίβασης (Stacking gel) 4% , στο οποία τοποθετήθηκε και ειδικό χτενάκι για το σχηματισμό θηκών φόρτωσης δειγμάτων και αφέθηκε επίσης να πολυμεριστεί. Η σύσταση του πηκτώματος διαχωρισμού φαίνεται στον παρακάτω πίνακα:

Πίνακας 3: Σύσταση πηκτώματος επιστοίβασης 12,5% (Stacking gel) για την ηλεκτροφόρηση σε πηκτώμα πολυακρυλαμιδίου υπό αποδιατακτικές συνθήκες (SDS – PAGE)

Πήκτωμα επιστοίβασης 4% (Stacking gel)	
Αντιδραστήρια	Προστιθέμενος όγκος
ddH <sub>2</sub> O	3
0,25 M Tris, 0,2%w/v SDS, pH=6,8	3,75
40% bis-acrylamide	0,75
TEMED	0,02
10% w/v APS	0,06

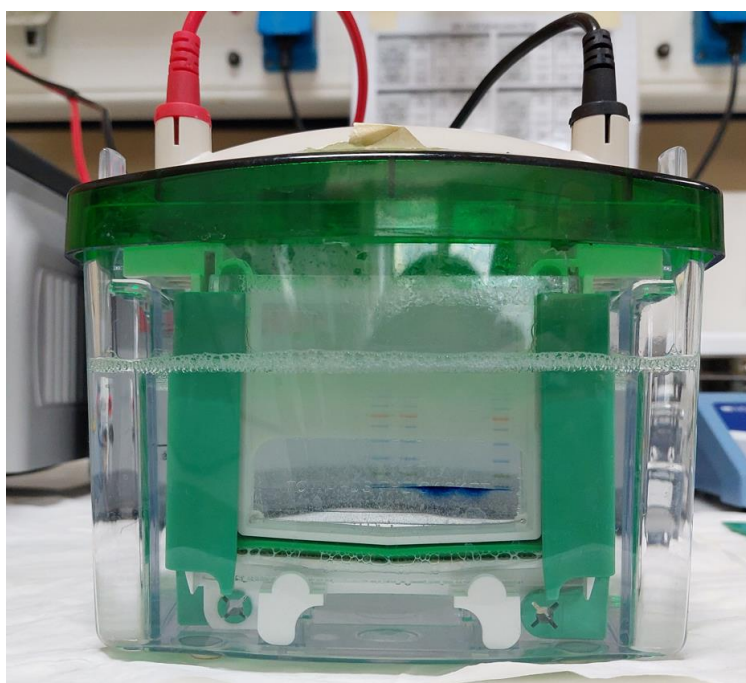
Αφού είχε ολοκληρωθεί και ο πολυμερισμός του πηκτώματος επιστοίβασης το σύστημα των γυάλινων πλακών τοποθετήθηκε στη συσκευή κάθετης ηλεκτροφόρησης, στην οποία προστέθηκαν περίπου 500 ml ρυθμιστικού διαλύματος Running buffer και αφαιρέθηκε προσεκτικά το χτενάκι. Για την παρασκευή του ρυθμιστικού διαλύματος SDS-PAGE Ηλεκτροφόρησης (Running buffer) με τιμή pH 8,3 διαλύθηκαν Τρις(υδροξυμεθυλο)αμινομεθάνιου (Tris base)  $\text{NH}_2\text{C}(\text{CH}_2\text{OH})_3$  με συγκέντρωση 3,03

g/L, γλυκίνη (glycine)  $C_2H_5NO_2$  με συγκέντρωση 14,4 g/L και δωδεκακυλοθειικό νάτριο (SDS) σε συγκέντρωση 1 g/L. Κατά την προσθήκη του ρυθμιστικού διαλύματος τοποθετήθηκε πρώτα το διάλυμα στο κελί που δημιουργήθηκε από τις δυο γυάλινες πλάκες (chamber) και μετά και έξω από αυτό μέχρι το κατάλληλο ύψος.

Για την προετοιμασία των δειγμάτων προς ανάλυση ανάλογα με τον όγκο του δείγματος κατασκευαζόταν άλλο σύστημα πηκτωμάτων (επιστοιβάσης και διαχωρισμού) χονδρό ή λεπτό gel. Για χονδρό χρησιμοποιήθηκαν 40 μl από το δείγμα και 10 μl από το δείκτη που ήταν αυτό που χρωματίζει τη μπάντα. Ενώ για λεπτό χρησιμοποιήθηκαν 20 μl από το δείγμα και 5 μl από το δείκτη (bromophenol blue). Συγκεκριμένα, τα προς ανάλυση δείγματα όγκου 20 μl αναμίχθηκαν με 5 μl διαλύματος φόρτωσης δείγματος SDS-PAGE (Sample buffer) και ακολούθησε βρασμός για 5 min. Με τη διαδικασία του βρασίματος οι πρωτεΐνες έχασαν την τριτοταγή δομή τους. Εκτός από τα δείγματα, στο πήκτωμα τοποθετήθηκαν και 7 μl πρότυπου διαλύματος πρωτεϊνών γνωστού μοριακού βάρους ladder (Pink Prestained Protein Marker Nippon Genetics Europe), για τον προσδιορισμό του βάρους των πρωτεϊνών των δειγμάτων.

Συνήθως τα δείγματα και η σειρά τους επιλέγονταν έτσι ώστε να μπορεί να δωθεί μια συνολική εικόνα και για τις διαδικασίες καθαρισμού και φιλτραρίσματος του ενζύμου. Τα δείγματα αυτά ήταν τα εκλουόμενα διαλύματα από την χρωματογραφία συγγένειας, δηλαδή δείγματα από τα κλάσματα wash, ιμιδαζόλιο 100 mM, καθώς και ιμιδαζόλιο 5 mM σε ρυθμιστικό διάλυμα Τρις(υδροξυμεθυλο)αμινομεθάνιου και χλωριούχου νατρίου αλλά και δείγμα από διάλυμα της καλλιέργειας που προέκυψε μετά από το φιλτράρισμα.

Ακολούθησε ηλεκτροφόρηση υπό 35 mA/πήκτωμα για περίπου 90 min. Αρχικά εφαρμόστηκε τάση 50 V, η οποία ήταν πιο μικρή από ότι ήταν στην υπόλοιπη διεργασία και συνέβη γιατί όταν είναι πιο μικρή η τάση στοιβάζονται καλύτερα οι μπάντες των δειγμάτων. Μόλις έφταναν στο πήκτωμα διαχωρισμού (Resolving gel) η τάση που εφαρμοζόταν ορίστηκε στα 100 V. Λόγω του μοριακού του βάρους, ο δείκτης (bromophenol blue) κινούταν πιο γρήγορα από τις πρωτεΐνες. Για αυτό το λόγο όταν έφτανε στο κάτω άκρο του πηκτώματος σταματούσε να εφαρμόζεται τάση.



Εικόνα 24: Συσκευή ηλεκτροφόρησης Mini-Protean 3

Μετά την ολοκλήρωση της ηλεκτροφόρησης, αποδιοργανώθηκε η διάταξη και το πήκτωμα απομακρύνθηκε από τις γυάλινες πλάκες. Έπειτα απομονώθηκε το πήκτωμα διαχωρισμού (Resolving gel) και εμβαπτίσθηκε σε διάλυμα χρώσης (staining solution) για 24 h υπό ήπια ανάδευση. Στη συνέχεια πραγματοποιήθηκε αποχρωματισμός του πηκτώματος με εμβάπτιση σε διάλυμα αποχρωματισμού (destaining solution) μέχρι τον αποχρωματισμό του πηκτώματος και την εμφάνιση των πρωτεϊνικών ζωνών.

#### 4.12 Εύρεση βέλτιστων συνθηκών δράσης του απομονωμένου ενζύμου της οξειδάσης της γαλακτόζης

Για τον προσδιορισμό των βέλτιστων συνθηκών δράσης του απομονωμένου ενζύμου της οξειδάσης της γαλακτόζης χρησιμοποιήθηκε στις αντιδράσεις υδατικό διάλυμα του συνθετικού υποστρώματος γαλακτόζης (galactose) συγκέντρωσης 50 mM. Η αντίδραση που χρησιμοποιήθηκε είναι αυτή του ενζύμου της οξειδάσης της γαλακτόζης με το φυσικό του υπόστρωμα, το οποίο είναι η γαλακτόζη. Από την οξείδωση της γαλακτόζης παράγεται υπεροξειδίο του υδρογόνου (Hydrogen peroxide)  $H_2O_2$ , το οποίο διασπάει η υπεροξειδάση του χρένου HRP (Horseradish peroxidase) και αυτή με τη σειρά του δημιουργεί ένα σύμπλοκο με το ερυθρό της φαινόλης (phenol red) το οποίο δίνει απορρόφηση στα 610 nm. Οι απορροφήσεις της μέτρησης ενεργότητας της ενεργότητας της οξειδάσης της γαλακτόζης μετατρέπονται σε ενεργότητα του ενζύμου σε Units/ml. Με βάση την ενεργότητα προσδιορίστηκαν οι βέλτιστες τιμές για την θερμοκρασία, την τιμή του pH, το ρυθμιστικό διάλυμα, καθώς και το χρόνο αντίδρασης.

Η αντίδραση πραγματοποιήθηκε όπως περιγράφεται στην Παράγραφο Δοκιμασία προσδιορισμού ενεργότητας ενζύμου (Enzyme Assay). Ο προσδιορισμός της απορρόφησης έγινε με το πολυφωτόμετρο microplate Spectra Max 250 (Molecular Devices) στα 610 nm. Οι αντιδράσεις

επωάστηκαν εντός του φωτόμετρου στους 35 °C για 15 min. Ως μηδενική απορρόφηση θεωρείται η απορρόφηση του τυφλού διαλύματος (blank) το οποίο είχε σύσταση ίδια με εκείνη της αντίδρασης αλλά αντί για το ένζυμο είχε προστεθεί στην αντίδραση νερό.

Συγκεκριμένα για τον προσδιορισμό της βέλτιστης θερμοκρασίας της αντίδρασης χρησιμοποιήθηκε το ρυθμιστικό διάλυμα φωσφορικών καλίου με την τιμή του pH να είναι 6, Επίσης, παρασκευάστηκε διάλυμα γαλακτόζης (galactose)  $C_6H_{12}O_6$  συγκέντρωσης 50 mM. Ακόμη, παρασκευάστηκε το διάλυμα υπεροξειδάσης του χρένου HRP (Horseradish peroxidase) συγκέντρωσης 0,6 mg/ml. Στο ίδιο διάλυμα διαλύθηκε και ερυθρό της φαινόλης PR (phenol red)  $C_{19}H_{14}O_5S$  συγκέντρωσης 1mg/ml. Τέλος, παρασκευάστηκε διάλυμα υδροξειδίου του νατρίου (sodium hydroxide) συγκέντρωσης 1 M. Πιο αναλυτικά, έλαβε χώρα αντίδραση σε ειδική κυβέττα (microplate) στο πολυφωτόμετρο SpectraMAX 250 στους 35 °C για 15 min. Στη συνέχεια τοποθετήθηκαν 30 μl διαλύματος καυστικού νατρίου 1M, με σκοπό τον τερματισμό της αντίδρασης και ακολούθησε φωτομέτρηση στα 610 nm. Ο όγκος της αντίδρασης ήταν 220 μl από τα οποία τα 158 μl αποτελούσαν το ρυθμιστικό διάλυμα φωσφορικών καλίου, τα 20 μl γαλακτόζη 50 mM, τα 20 μl ένζυμο και τα 22 μl διάλυμα υπεροξειδάσης του χρένου με ερυθρό της φαινόλης HRP-PR. Συνεπώς, ο τελικός όγκος του φωτομετρούμενου δείγματος, δηλαδή μαζί με τα 30 μl διαλύματος καυστικού νατρίου, ήταν 250 μl. Οι αντιδράσεις αυτές λάμβαναν χώρα σε διαφορετικούς χρόνους και θερμοκρασίες. Η βέλτιστη θερμοκρασία δράσης της οξειδάσης της γαλακτόζης διερευνήθηκε υπολογίζοντας την ενεργότητά της για θερμοκρασιακές τιμές 20-25-30-35-40-45-50-55°C. Αλλά και διαφορετικές τιμές pH και διαφορετικά ρυθμιστικά διαλύματα. Η τιμή pH στην οποία το ένζυμο παρουσιάζει βέλτιστη δράση μελετήθηκε για το ρυθμιστικό σύστημα που αποτελείτο από τα ρυθμιστικά διαλύματα φωσφορικών-κιτρικών, φωσφορικών καλίου και Γλυκίνης -υδροξείδιο του νατρίου. Το εύρος τιμών pH που διερευνήθηκε ήταν μεταξύ των τιμών 3-10,6.

#### 4.13 Υγρή χρωματογραφία υψηλής απόδοσης (HPLC, High Performance Liquid Chromatography)

Για τον υπολογισμό του βέλτιστου χρόνου αντίδρασης καθώς και για τον προσδιορισμό των προϊόντων της αντίδρασης χρησιμοποιήθηκε Υγρή χρωματογραφία υψηλής απόδοσης (HPLC) με ανιχνευτή υπεριώδους ακτινοβολίας UV. Η Υγρή χρωματογραφία υψηλής απόδοσης βασίζεται στην ύπαρξη δυο φάσεων, μιας στατικής φάσης και μιας κινητής φάσης που διατρέχει την στατική. Ο διαχωρισμός επιτυγχάνεται λόγω της διαφορετικής ταχύτητας μετακίνησης των συστατικών του μίγματος επί της στατικής φάσεως υπό την επίδραση της κινητής. Η απορρόφηση ακτινοβολίας από μια χημική ένωση εξαρτάται από το μήκος κύματος της ακτινοβολίας και τις ομάδες της χημικής ένωσης. Σύμφωνα με το νόμο του Lambert-Beer, η απορρόφηση της ακτινοβολίας (A) είναι ανάλογη της συγκέντρωσης (C) της ένωσης στη κυψελίδα και του πάχους της κυψελίδας (d)  $A = \epsilon Cd$ , όπου ( $\epsilon$ ) ο μοριακός συντελεστής απορρόφησης. Μια δέσμη φωτός περνάει μέσα από ένα μονοχρωμάτορα και κατευθύνεται στην κινητή φάση η οποία εξέρχεται από τη στήλη. Η ποσότητα του προσπίπτοντος φωτός μετράται με τη βοήθεια ενός φωτοανιχνευτή. Οι ανιχνευτές αυτοί είναι κατάλληλοι για την ανίχνευση οργανικών μορίων που απορροφούν φως στην περιοχή συχνοτήτων, του υπεριώδους και ορατού. Σε αυτή τη πειραματική διαδικασία χρησιμοποιείται ανιχνευτής υπεριώδους ακτινοβολίας (ultraviolet absorption-UV), διότι με αυτόν ανιχνεύονται τα φουράνια τα οποία αποτελούν τα κύρια προϊόντα της αντίδρασης της οξειδάσης της γαλακτόζης με υπόστρωμα το

υδροξυμεθυλοφουρφουράλη (HMF). Στη χρωματογραφία στήλης η πληροφορία η οποία αφορά τον διαχωρισμό περιέχεται στο χρωματογράφημα, το οποίο αποτελεί την καταγραφή της ποσότητας του εκλουόμενου συστατικού ως συνάρτηση της μετακίνησης της κινητής φάσης. Αυτό επιτυγχάνεται με τη χρήση ειδικής διάταξης, τον ανιχνευτή, ο οποίος αποκρίνεται στην ποσότητα (μάζα ή συγκέντρωση) του εκλουόμενου συστατικού. Το χρωματογράφημα αποτελεί το διάγραμμα του σήματος του ανιχνευτή ως συνάρτηση του χρόνου έκλουσης του συστατικού ή του όγκου έκλουσης της κινητής φάσης. Συγκεκριμένα, βάσει του χρόνου κατακράτησης (Retention time) και του φάσματος απορρόφησης των προτύπων ουσιών γίνεται ο ποιοτικός προσδιορισμός των ουσιών. Άρα μέσω της απορρόφησης μπορούν να προσδιοριστούν η ταυτότητα της κάθε ένωσης που περιέχεται στο διάλυμα αλλά και η συγκέντρωσή της. Για το ποσοτικό και τον ποιοτικό προσδιορισμό κατασκευάστηκαν καμπύλες αναφοράς των προτύπων ουσιών για χαμηλές και για υψηλές συγκεντρώσεις.

Τα φιαλίδια που χρησιμοποιούνται στην Υγρή χρωματογραφία υψηλής απόδοσης συμπληρώνονται με όγκους 0,5 ή 1 ml. Για αυτό και οι αντιδράσεις θα έπρεπε να έχουν τους κατάλληλους όγκους. Με βάση την απορρόφηση προσδιορίστηκαν οι βέλτιστες τιμές για την θερμοκρασία, το ρυθμιστικό διάλυμα, το χρόνο αντίδρασης καθώς και αν επηρεάζει η ύπαρξη της υπεροξειδάσης του χρένου HRP (Horseradish peroxidase).

#### 4.13.1 Διαλύτης της Υγρής χρωματογραφίας υψηλής απόδοσης (HPLC)

Η κινητή φάση που διάτρεχε την στατική στην Υγρή χρωματογραφία υψηλής απόδοσης ήταν ο διαλύτης θειικού οξέος συγκέντρωσης 5 mM.

Για αυτό το διαλύτη αρχικά παρασκευάστηκε διάλυμα θειικού οξέος (sulfuric acid)  $H_2SO_4$ , όπου για συγκέντρωση διαλύματος 5 mM και  $M_r = 98,079 \text{ g/mol}$  υπολογίστηκε ότι στο 1 L απιονισμένου νερού έπρεπε να διαλυθούν 0,272 ml θειικού οξέος.

Για τον υπολογισμό του όγκου που ήταν απαραίτητος για την χρήση της στήλης χρωματογραφίας έπρεπε να ληφθεί υπόψιν ο αριθμός των δειγμάτων. Ο τύπος που χρησιμοποιήθηκε για τον υπολογισμό αυτό ήταν:

$$V = \text{αριθμός δειγμάτων} \cdot \text{χρόνος εκλουσης κάθε δείγματος} \cdot \text{ροή}$$

Ο χρόνος έκλουσης για το κάθε δείγμα ορίστηκε 50 min και η ροή 0,6.

$$V = \text{αριθμός δειγμάτων} \cdot 50 \text{ min} \cdot 0,6$$

#### 4.13.2 Προκατεργασία δειγμάτων

Η προκατεργασία του δείγματος είναι σημαντικό τμήμα της ανάλυσης του με HPLC. Αποσκοπεί στην παραλαβή ενός ομογενούς διαλύματος, το οποίο είναι κατάλληλο για έγχυση στη χρωματογραφική στήλη. Ο στόχος της προκατεργασίας του δείγματος είναι η λήψη ενός κλάσματος του δείγματος, το οποίο να είναι σχετικά απαλλαγμένο από παρεμποδίζουσες ουσίες, ακίνδυνο για τη στήλη και συμβατό με τη μέθοδο HPLC. Για αυτό τον σκοπό τα δείγματα πριν την τοποθέτησή τους στα ειδικά φιαλίδια φιλτράρονται.

#### 4.14 Εύρεση Βέλτιστης Θερμοκρασίας Δράσης

Όταν ο στόχος ήταν ο τελικός όγκος ίσος με 500 μl χρησιμοποιήθηκε το ρυθμιστικό διάλυμα φωσφορικών καλίου με την τιμή του pH να είναι 6. Ακόμη, παρασκευάστηκε το διάλυμα υπεροξειδάσης του χρένου HRP (Horseradish peroxidase) συγκέντρωσης 0,6 mg/mL.

Ο όγκος της αντίδρασης ήταν 500 μl τα 450 μl αποτελούσαν το ρυθμιστικό διάλυμα φωσφορικών καλίου pH=6, τα 25 μl υπόστρωμα και τα 25 μl ένζυμο. Ενώ στην περίπτωση που ο όγκος της αντίδρασης ήταν 500 μl και περιείχε και υπεροξειδάση του χρένου (HRP) από τα οποία τα 425 μl αποτελούσαν το ρυθμιστικό διάλυμα φωσφορικών καλίου, τα 25 μl υπόστρωμα, τα 25 μl ένζυμο και 25 μl υπεροξειδάση του χρένου (HRP). Χρησιμοποιήθηκαν διαφορετικά υποστρώματα και σε διαφορετικές συγκεντρώσεις. Τα διαφορετικά υποστρώματα που χρησιμοποιήθηκαν ήταν υδροξυμεθυλοφουρφουράλη (HMF) σε συγκέντρωση 8,2 mM, 2,5-Φουρανδικαρβοξυλικό οξύ (FDCA) σε συγκέντρωση 10 mM, 5-Υδροξυμεθυλο-2-φουρανδικαρβοξυλικό οξύ (HMFC) σε συγκέντρωση 10 mM και 2,5-φουρανδικαρβοξυαλδεΐδη (DFF) σε συγκέντρωση 10 mM. Συγκεκριμένα, για κάθε υπόστρωμα χρησιμοποιήθηκαν η αρχική συγκέντρωση, αραιώση 1:2 και η αρχική συγκέντρωση με προσθήκη της υπεροξειδάσης του χρένου (HRP).

Οι αντιδράσεις επώαστηκαν υπό ανάδευση (1000 rpm) εντός θερμαινόμενων επωαστήρων Eppendorf Thermomixer Comfort στις μελετώμενες θερμοκρασίες (35,40,45 °C) ταυτόχρονα για 15 min καθώς και για 24 h. Μετά το πέρας της αντίδρασης ακολούθησε βρασμός για 5 min, με στόχο την απενεργοποίηση του ενζύμου. Στη συνέχεια ο όγκος του διαλύματος της κάθε αντίδρασης μεταφέρεται στα ειδικά φιαλίδια της Υγρής χρωματογραφίας υψηλής απόδοσης, αφού πρώτα φιλτραριστούν. Ως μηδενική απορρόφηση θεωρείται η απορρόφηση των τυφλών διαλυμάτων (blank) τα οποία είχαν σύσταση ίδια με εκείνη της αντίδρασης αλλά αντί για το ένζυμο είχε προστεθεί στην αντίδραση νερό και αντί για υπόστρωμα είχε προστεθεί νερό.

#### 4.15 Εύρεση βέλτιστου χρόνου αντίδρασης (Time course)

Για να προσδιοριστεί ο βέλτιστος χρόνος αντίδρασης της οξειδάσης της γαλακτόζης με υπόστρωμα την υδροξυμεθυλοφουρφουράλη (HMF) χρησιμοποιήθηκαν αντιδράσεις όγκου 0,5 ml αλλά και 1 ml.

Όταν ο στόχος ήταν ο τελικός όγκος ίσος με 500ml εφαρμόστηκε η ίδια διαδικασία με αυτή στην παράγραφο Εύρεση Βέλτιστης Θερμοκρασίας Δράσης. Η διαφορά ήταν ότι οι αντιδράσεις επώαστηκαν υπό ανάδευση (1000 rpm) εντός θερμαινόμενων επωαστήρων Eppendorf Thermomixer Comfort στη θερμοκρασία 40 °C για 15 min καθώς και για 1, 2, 3, 4, 24 h.

Όταν ο όγκος της αντίδρασης ήταν 1 mL από τα οποία τα 700 μl αποτελούσαν το ρυθμιστικό διάλυμα φωσφορικών καλίου pH=6, τα 250 μl υπόστρωμα το οποίο ήταν υδροξυμεθυλοφουρφουράλη (HMF) συγκέντρωσης 8,2 mM και 10 mM καθώς και τα 50 μl ένζυμο. Ενώ στην περίπτωση που ο όγκος της αντίδρασης ήταν 1 mL και περιείχε και υπεροξειδάση του χρένου (HRP) τα 650 μl αποτελούσαν το ρυθμιστικό διάλυμα φωσφορικών καλίου pH=6, τα 250 μl υπόστρωμα το οποίο ήταν υδροξυμεθυλοφουρφουράλη (HMF) συγκέντρωσης 8,2 mM και 10 mM, τα 50 μl ένζυμο και 50 μl υπεροξειδάση του χρένου (HRP) συγκέντρωσης 0,6 mg/ml. Οι αντιδράσεις επώαστηκαν υπό ανάδευση (1000 rpm) εντός θερμαινόμενων επωαστήρων Eppendorf Thermomixer Comfort στη

θερμοκρασία 40 °C για 15 min καθώς και για 1, 2, 3, 4, 5, 6, 24 hr. Μετά το πέρας της αντίδρασης ακολούθησε βρασμός για 5 min, με στόχο την απενεργοποίηση του ενζύμου. Στη συνέχεια ο όγκος του διαλύματος της κάθε αντίδρασης μεταφέρεται στα ειδικά φιαλίδια της υγρής χρωματογραφίας υψηλής απόδοσης, αφού πρώτα φιλτραριστούν. Ως μηδενική απορρόφηση θεωρείται η απορρόφηση των τυφλών διαλυμάτων (blank) τα οποία είχαν σύσταση ίδια με εκείνη της αντίδρασης αλλά αντί για το ένζυμο είχε προστεθεί στην αντίδραση νερό και αντί για υπόστρωμα είχε προστεθεί νερό. Επίσης μελετήθηκαν αντιδράσεις στις οποίες στο ρυθμιστικό διάλυμα είχε προστεθεί και αζιδίου του νατρίου (sodium azide) (0,02-0,03 % w/v) που αποτελεί μια ένωση ιδιαίτερα τοξική για μικροοργανισμούς, ώστε να αποτραπούν τυχόν μολύνσεις καθώς και αντιδράσεις που δεν είχε προστεθεί.

#### 4.16 ΠΡΟΚΑΤΕΡΓΑΣΙΕΣ

##### 4.16.1 Σκοπός

Οι προκατεργασίες της λιγνινοκυτταρινούχου βιομάζας με τη χρήση οργανικών διαλυτών (oxiorganosoln pretreatment) και με τη χρήση μικροκυμάτων καθώς και με αντιστάσεις αποτελούν μια αποτελεσματική μέθοδο απολιγνινοποίησης που δίνει ένα στερεό κλάσμα υψηλής περιεκτικότητας σε κυτταρίνη και χαμηλής περιεκτικότητας σε λιγνίνη, το οποίο μπορεί να χρησιμοποιηθεί για την παραγωγή παραγώγων του φουρανίου. Με τις προκατεργασίες διαχωρίστηκαν η κυτταρίνη από την ημικυτταρίνη και λιγνίνη και διασπάστηκε η κρυσταλλικότητας της κυτταρίνης. 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. Για αυτό το σκοπό κατεργάζονται μέσω της προκατεργασίας διάφορα υλικά λιγνινοκυτταρινούχου βιομάζας υπό διαφορετικές συνθήκες όπως χρήση διαφορετικών οργανικών διαλυτών, διαφορετικό χρόνο αντίδρασης και διαφορετική θερμοκρασία που επιτυγχάνεται με θέρμανση με μικροκύματα ή αντιστάσεις σε υδατικά διαλύματα με συγκεκριμένη αναλογία οργανικού διαλύτη/νερού.

##### 4.16.2 Προκατεργασία λιγνινοκυτταρινούχων υλικών με τη χρήση μικροκυμάτων και οργανικών διαλυτών

Εξετάσθηκε η προκατεργασία στελεχών αραβοσίτου (corn stover) με τη χρήση μικροκυμάτων παρουσία οργανικών διαλυτών. Ειδικότερα, τοποθετήθηκαν σε ειδικό φιαλίδιο (vial), το οποίο ήταν αυτόκλειστο δοχείο ώστε να μπορεί να επιτευχθεί η επιθυμητή πίεση και διέθετε θερμόμετρο ώστε να καταγράφεται κάθε στιγμή η θερμοκρασία μέσα στο φιαλίδιο, 2 g υλικού και 13 ml οργανικού διαλύτη, δεδομένων των προδιαγραφών του μηχανήματος. Το ειδικό φιαλίδιο (vial) είχε όγκο 30 ml. Πρώτα τοποθετήθηκε το υλικό που προκατεργάζονταν και έπειτα ο διαλύτης και αναδεύτηκαν με μια σπάτουλα. Ο οργανικός διαλύτης που μελετάται είναι η αιθανόλη σε διαφορετικές αναλογίες με νερό, αν και αρχικά δοκιμάστηκε και η χρήση νερού αντί οργανικού διαλύτη.



Εικόνα 25: Ειδικό φιαλίδιο (vial) όγκου 30 ml στο οποίο έχουν τοποθετηθεί το υλικό που προκατεργάζονταν και ο διαλύτης

Για την προκατεργασία με μικροκύματα χρησιμοποιήθηκε 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 μετριέται 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.

Μέσω της βοήθειας λογισμικού στον αντιδραστήρα μικροκυμάτων πρώτα ορίστηκε η ισχύς και η θερμοκρασία της διεργασίας και μετά ο χρόνος που θα διαρκούσε η προκατεργασία. 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. Συγκεκριμένα, οι



θερμοκρασίες που δοκιμάστηκαν ήταν 150-160 °C και η χρονική διάρκεια της προκατεργασίας 30-120 min.

Στο τέλος, ο πολτός διηθήθηκε υπό κενό και παραλήφθηκε το στερεό κλάσμα, το οποίο ξεπλύθηκε με οργανικό διαλύτη και απιονισμένο νερό και ξηράθηκε. Συγκεκριμένα, για την διήθηση υπό κενό και χρησιμοποιήθηκε για φίλτρο διηθητικό χαρτί. Αρχικά δημιουργήθηκε κενό και βρέχτηκε το διηθητικό με νερό, σταμάτησε το κενό και απορρίφθηκε το νερό. Μετά δημιουργήθηκε ξανά κενό και τοποθετήθηκε όλο το μείγμα της προκατεργασμένης λιγνινοκυτταρινούχου βιομάζας. Από το υγρό κλάσμα αποθηκεύτηκε 1 ml για ανάλυση. Μεταφέρθηκε όλο το στερεό και ξεπλύθηκε το ειδικό φιαλίδιο με νερό. Στη συνέχεια καθαρίστηκε το στερεό κλάσμα δηλαδή ότι είχε παραμείνει στο διηθητικό με νερό και με διαλύτη ώστε να φύγουν όλα τα υπολείμματα. Το διηθητικό απομακρύνθηκε από την συσκευή διήθησης και τοποθετήθηκε στον φούρνο για ξήρανση. Επίσης τα διηθητικά είχαν ζυγιστεί πριν την διήθηση υπό κενό.



*Εικόνα 26: Το διηθητικό από την συσκευή διήθησης με το προκατεργασμένο υλικό μετά την τοποθέτησή του στον φούρνο για ξήρανση.*

#### 4.16.3 Προκατεργασία λιγνινοκυτταρινούχων υλικών με τη χρήση αντιστάσεων και οργανικών διαλυτών

Εξετάσθηκε επίσης η προκατεργασία στελεχών αραβοσίτου (corn stover) με τη χρήση αντιστάσεων παρουσία οργανικών διαλυτών. Ειδικότερα, τοποθετήθηκαν σε ειδικό φιαλίδιο (vial), το οποίο ήταν αυτόκλειστο δοχείο ώστε να μπορεί να επιτευχθεί η επιθυμητή πίεση, 21 g υλικού και 13 ml οργανικού διαλύτη, δεδομένων των προδιαγραφών του μηχανήματος. Το ειδικό φιαλίδιο (vial) είχε όγκο 139 ml. Η υπόλοιπη διαδικασία που ακολουθήθηκε ήταν ίδια με την παράγραφο Προκατεργασία λιγνινοκυτταρινούχων υλικών με τη χρήση μικροκυμάτων και οργανικών διαλυτών.

#### 4.17 Ενζυμική υδρόλυση προκατεργασμένων λιγνινοκυτταρινούχων υλικών

Πραγματοποιήθηκαν πειραματικές δοκιμές για να μελετηθεί η παραγωγή σακχάρων σε διαφορετικές συγκεντρώσεις στερεών από το δείγμα αραβοσίτου. Για τον σκοπό αυτό υδρολύθηκαν ενζυμικά τα προκατεργασμένα λιγνινοκυτταρινούχα υλικά. Μέσω της ενζυμικής υδρόλυσης, διασπάται πρωτίστως η αλυσίδα της κυτταρίνης και δευτερευόντως της ημικυτταρίνης, με αποτέλεσμα την παραγωγή των μονομερών τους, δηλαδή την γλυκόζη.

Η υδρόλυση πραγματοποιήθηκε σε συγκέντρωση ενζυμικού κοκτέιλ Cellic CTec 2 15 mg πρωτεϊνών/g ξηρής βιομάζας και σε βέλτιστο pH για τη λειτουργία του ενζυμικού σκευάσματος ίσο με 5. Για να επιτευχθεί αυτή η τιμή pH η υδρόλυση πραγματοποιήθηκε σε ρυθμιστικό διάλυμα κιτρικών-φωσφορικών που παρασκευάστηκε στο εργαστήριο. Λόγω του κινδύνου μόλυνσης των δειγμάτων μας από μικροοργανισμούς οι οποίοι πιθανώς να καταναλώνουν τη γλυκόζη με αποτέλεσμα την αλλοίωση των αποτελεσμάτων, κατά την παρασκευή του ρυθμιστικού διαλύματος προστέθηκε αζίδιο του νατρίου (sodium azide) σε συγκέντρωση 0,01% w/v. Η σειρά πειραμάτων ήταν μικρής κλίμακας και πραγματοποιήθηκε σε κωνικές φιάλες όγκου 50 ml, στις οποίες τοποθετήθηκαν 1 g στερεού από το κάθε υλικό μετά την ξήρανση και 9 ml ενζύμου και ρυθμιστικού διαλύματος για να επιτευχθεί η επιθυμητή συγκέντρωση στερεών 10% (w/v). Όσον αφορά την παρασκευή του διαλύματος ενζύμου και ρυθμιστικού διαλύματος κιτρικών-φωσφορικών αρχικά υπολογίστηκε ο όγκος του ρυθμιστικού διαλύματος που απαιτείται ανάλογα με τον αριθμό των δειγμάτων που χρειάστηκε 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. Συνεπώς η συγκέντρωση του ενζύμου ήταν 15 mg ενζύμου/9 ml ρυθμιστικού διαλύματος. Ο όγκος του ενζύμου που τοποθετήθηκε στο διάλυμα δώθηκε από τον τύπο:

$$V_{\text{ενζύμου}} = \frac{1,66 \cdot V_{\text{διαλύματος}}}{142}$$

Σε πλάκα ανάδευσης αφαιρέθηκε ο όγκος που αντιστοιχεί στον όγκο του ενζυμικού παρασκευάσματος από τον όγκο του διαλύματος του ρυθμιστικού διαλύματος και προστέθηκε το ένζυμο.

Αφού τοποθετήθηκαν στις κωνικές φιάλες τα στερεά λιγνινοκυτταρινούχα υλικά και το ενζυμικό διάλυμα με το ρυθμιστικό διάλυμα, πραγματοποιήθηκε ανάδευση με την σπαθίδα. Στην κωνική τοποθετήθηκαν τα 9 ml και το 1 g του υλικού και ανακατεύτηκαν με τη σκαφίδα. Οι κωνικές φιάλες κλείστηκαν με πλαστικό πώμα και parafilm, γιατί η υδρόλυση είναι αναερόβια διαδικασία. Στη συνέχεια τοποθετήθηκαν στον επωαστήρα στους 50 °C, με ανάδευση 180 rpm. Η ενζυμική υδρόλυση πραγματοποιήθηκε για 72 h και λήφθηκαν δείγματα μετά από 24 και 72 h, ώστε να παρακολουθείται η πορεία της υδρόλυσης για το χρονικό διάστημα των 3 ημερών που διαρκεί.

Λόγω της ύπαρξης και στερεής και υγρής φάσης στο δείγμα ήταν απαραίτητη η φυγοκέντρηση των δειγμάτων για το διαχωρισμό των στερεών από το υπερκείμενο υγρό όπου βρίσκονταν τα διαλυτά σάκχαρα. Για τον σκοπό αυτό λήφθηκε δείγμα 300 ml από την κάθε κωνική φιάλη ανά τα χρονικά διαστήματα που αναφέρθηκαν. Η ποσότητα αυτή τοποθετήθηκε σε Eppendorf και φυγοκεντρήθηκαν για 2 min. Έπειτα, έγινε απομόνωση του υπερκείμενου υγρού και κατάλληλη αραιώσή του προκειμένου η μέτρηση των σακχάρων να βρίσκεται στην περιοχή γραμμικότητας της καμπύλης αναφοράς. Οι μετρήσεις σε κάθε δείγμα πραγματοποιήθηκαν εις διπλούν. Τέλος ο υπολογισμός της συγκέντρωσης της γλυκόζης που περιέχει κάθε δείγμα έγινε μέσω της μεθόδου Glucotest.

#### 4.18 Μέτρηση γλυκόζης με τη μέθοδο Glucotest

Οι μετρήσεις συγκέντρωσης γλυκόζης πραγματοποιήθηκαν με το εμπορικό σκεύασμα GOD/PAP (glucose oxidase/oxidase assay) με τη μέθοδο Glucotest. Ο προσδιορισμός βασίζεται στη μετατροπή της γλυκόζης σε ένα προϊόν ερυθρού χρώματος το οποίο είναι αποτέλεσμα της διαδοχικής δράσης των ενζύμων οξειδάση και υπεροξειδάση της γλυκόζης και εμφανίζει μέγιστη απορρόφηση στα 510 nm. Συγκεκριμένα, παρουσία του ενζύμου της οξειδάσης της γλυκόζης (GOD) η γλυκόζη οξειδώνεται και παράγεται υπεροξείδιο του υδρογόνου ( $H_2O_2$ ) το οποίο με τη δράση της υπεροξειδάσης (POD) αντιδρά με τη χλωρο-4-φαινόλη και την 4-αμινοαντιπυρίνη (PAP) σχηματίζοντας μια κινόνη με χρώμα ερυθρό. Επομένως, η απορρόφηση στα 510 nm είναι ανάλογη της συγκέντρωσης της γλυκόζης στο δείγμα.

Στις υποδοχές (wells) της ειδικής κυβέττας (microplate) σε κατάλληλη θέση τοποθετήθηκαν 10 μl δείγματος προς μέτρηση και 240 μl του εμπορικού σκευάσματος GOD/PAP. Η ειδική κυβέττα (microplate) τοποθετήθηκε για επώαση στον θάλαμο του φωτομέτρου Microplate reader σε θερμοκρασία 37 °C για 15 min. Η απορρόφηση μετρήθηκε στα 510 nm στην επίτευξη ισορροπίας της αντίδρασης (endpoint). Η γλυκόζη μετρήθηκε με χρήση καμπύλης αναφοράς που κατασκευάστηκε από διαλύματα γνωστής συγκέντρωσης γλυκόζης και για κάθε δείγμα έγιναν οι κατάλληλες αραιώσεις προκειμένου η μέτρηση να βρίσκεται στο γραμμικό τμήμα της ευθείας. Ακόμα, για κάθε δείγμα πραγματοποιήθηκαν δύο μετρήσεις.

#### 4.19 Καμπύλες αναφοράς γλυκόζης

Για να γίνει η μέτρηση της γλυκόζης ήταν απαραίτητη η χρήση καμπύλης αναφοράς ώστε οι τιμές απορρόφησης που λήφθηκαν με τη φωτομέτρηση να αντιστοιχηθούν σε συγκέντρωση γλυκόζης.

Για την κατασκευή της παρασκευάστηκαν διαλύματα γνωστής συγκέντρωσης γλυκόζης 0,1, 0,2, 0,3, 0,4, 0,5 g/L. Αρχικά κατασκευάστηκε το διάλυμα με 0,5 g/L και στη συνέχεια τα υπόλοιπα με διαδοχικές αραιώσεις. Στη συνέχεια, στις υποδοχές (wells) της ειδικής κυβέττας (microplate) σε κατάλληλη θέση τοποθετήθηκαν 10 μL του πρότυπου δείγματος προς μέτρηση και 240 μL του εμπορικού σκευάσματος GOD/PAP. Η ειδική κυβέττα (microplate) τοποθετήθηκε για επώαση στον θάλαμο του φωτομέτρου Microplate reader σε θερμοκρασία 37 °C για 15 min. Η απορρόφηση μετρήθηκε στα 510 nm στην επίτευξη ισορροπίας της αντίδρασης (endpoint). Ακόμα, για κάθε δείγμα πραγματοποιήθηκαν τρεις μετρήσεις. Παράλληλα, μετρήθηκε και η απορρόφηση του τυφλού διαλύματος της μεθόδου. Οι τιμές αυτές αναπαραστάθηκαν σε ένα διάγραμμα συγκέντρωσης απορρόφησης και μέσω αυτού προέκυψε η σχέση που συνέδεε αυτά τα δυο μεγέθη.

#### 4.20 Ενζυμική ισομερείωση γλυκόζης προς παραγωγή φρουκτόζης

Ο στόχος αυτής της διαδικασίας ήταν η μετατροπή της γλυκόζης που είχε παραχθεί από την υδρόλυση σε φρουκτόζη. Αυτό έγινε με μια αντίδραση ισομερείωσης και αυτό έγινε με την χρήση της ισομεράσης της γλυκόζης. Χρησιμοποιήθηκε το ενζυμικό σκεύασμα της ακινητοποιημένης ισομεράσης της γλυκόζης Sweetzyme της εταιρείας Novozymes.

Μετά τις 72 h της υδρόλυσης λήφθηκε δείγμα και ακολούθησε μέτρηση της γλυκόζης μέσω του Glucotest που έχει περιγραφεί στην παράγραφο Μέτρηση γλυκόζης με τη μέθοδο Glucotest.

Ακόμη, μετά την ολοκλήρωση της υδρόλυσης των δειγμάτων μεταφέρθηκε όλο το περιεχόμενο των κωνικών φιάλων σε αντίστοιχα φάλκον, τα οποία φυγοκεντρήθηκαν για 10 min στο μέγιστο αριθμό στροφές. Το υπερκείμενο διάλυμα κάθε φάλκον, στο οποίο ήταν διαλυμένη η γλυκόζη, μεταφέρθηκε σε νέο φάλκον, όπου μετρήθηκε ο όγκος του. Μέσω της συγκέντρωσης της γλυκόζης και του όγκου του διαλύματος του δείγματος υπολογίστηκε η μάζα της γλυκόζης. Για να αυξηθεί η απόδοση της αντίδρασης προστέθηκε και τετραβορικό νάτριο (sodium tetraborate)  $\text{Na}_2\text{B}_4\text{O}_7 \cdot 10 \text{H}_2\text{O}$  το οποίο βοηθά την ισομεράση της γλυκόζης καταλύοντας την αντίδραση προς την κατεύθυνση της φρουκτόζης. Ανάλογα με την μάζα της γλυκόζης αυτή σε κάθε φάλκον προστέθηκε σε αναλογία 50 % τετραβορικό νάτριο ( $\text{Na}_2\text{B}_4\text{O}_7 \cdot 10 \text{H}_2\text{O}$ ). Έτσι, υπολογίστηκε η μάζα του τετραβορικού νατρίου με βάση τον τύπο:

$$m_{\text{sodium tetraborate} \cdot 10} = \frac{m_{\text{glycose}}}{2}$$

Αφού προστέθηκε το τετραβορικό νάτριο, ακολούθησε ανάδευση ώστε να διαλυθεί όλη η ποσότητα. Εάν ήταν αναγκαίο προστέθηκε πυκνό διάλυμα καυστικού νατρίου NaOH ή υδροχλωρίου HCl, προκειμένου το pH του διαλύματος να αποκτήσει την τιμή 7. Ο όγκος του καυστικού νατρίου ή υδροχλωρίου που προστέθηκε είναι πολύ μικρός και δεν επηρέασε τη συγκέντρωση της γλυκόζης. Στη συνέχεια μεταφέρθηκε σε κωνική φιάλη το διάλυμα και προστέθηκε η ισομεράση της γλυκόζης. Η μάζα της ισομεράσης που χρησιμοποιήθηκε ήταν το 0,05% του όγκου του διαλύματος της γλυκόζης μετά την υδρόλυση. Στη συνέχεια, οι κωνικές τοποθετήθηκαν σε επωαστήρα για 24 h.

Μετά το τέλος των 24 h μετρήθηκε η γλυκόζη μέσω του Glucotest που έχει περιγραφεί στην παράγραφο Μέτρηση γλυκόζης με τη μέθοδο Glucotest.

Η παραγωγή της φρουκτόζης στο κάθε δείγμα εκτιμήθηκε από τη διαφορά των συγκεντρώσεων της γλυκόζης πριν και μετά την ισομερείωση, διότι στις αντιδράσεις ισομερείωσης η φρουκτόζη παράγεται ισομοριακά από τη γλυκόζη.

## 5. Αποτελέσματα – Σχολιασμός

### 5.1 Προκατεργασία και υδρόλυση υλικών με μικροκύματα και παραδοσιακή προκατεργασία με αντιστάσεις

Για την μελέτη της επίδρασης της θερμοκρασίας και του χρόνου της διεργασίας της προκατεργασίας καθώς και διαφορετικούς διαλύτες εκτελέστηκαν πειράματα με διαφορετικές συνθήκες, όπως περιγράφηκε και στο προηγούμενο κεφάλαιο. Η αποδοτικότητα της κάθε προκατεργασίας αξιολογείται με βάση τα αποτελέσματα της υδρόλυσης, και συγκεκριμένα την ποσότητα της γλυκόζης που παράγεται.

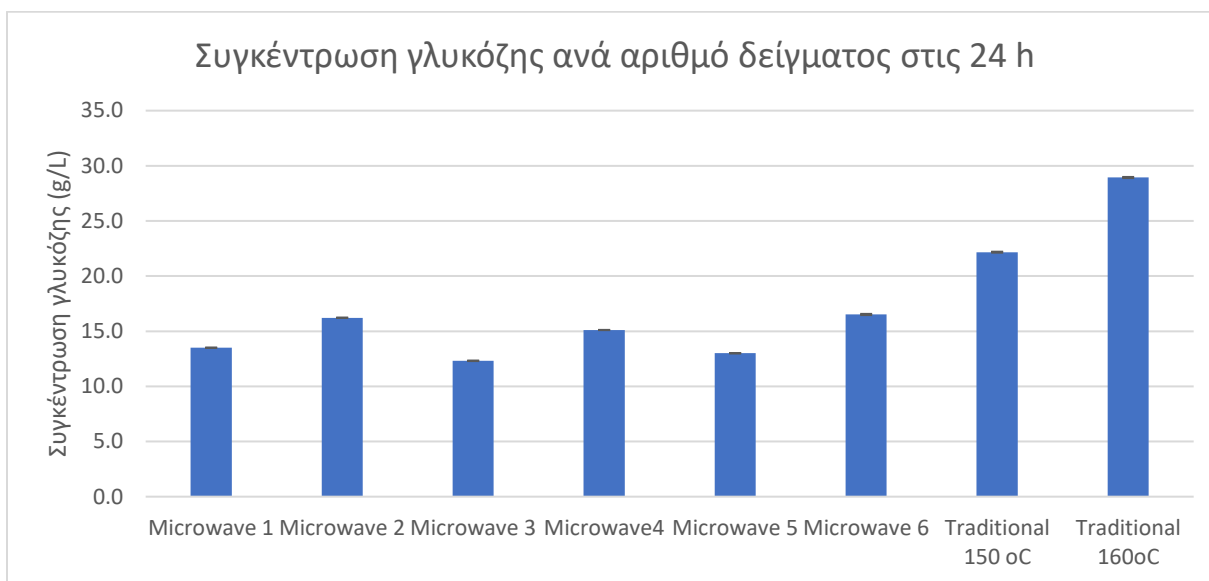
#### 5.1.1 Μελέτη υδρόλυσης στις 24 και 72 h σε προκατεργασμένα υλικά με μικροκύματα και αντιστάσεις

Αρχικά, συγκρίθηκε το αποτέλεσμα της υδρόλυσης στις 24 h ανάμεσα στην προκατεργασία με μικροκύματα και με παραδοσιακή θέρμανση με αντιστάσεις. Για τον σκοπό αυτό μελετήθηκαν δείγματα λιγνοκυτταρινούχου βιομάζας στελεχών αραβοσίτου (corn stover), τα οποία προκατεργάστηκαν με μικροκύματα στην ίδια θερμοκρασία, συγκεκριμένα 150 °C, για διαφορετική χρονική διάρκεια, με διαλύτη το διάλυμα νερό-ακετόνη αναλογίας 50:50. Επίσης σε δείγματα της ίδιας προέλευσης έγινε προκατεργασία με αντιστάσεις, που θεωρείται ο παραδοσιακός τρόπος, σε θερμοκρασίες 150 και 160 °C και με διαλύτη το διάλυμα νερό-ακετόνη αναλογίας 50:50. Στο σύστημα προκατεργασίας με μικροκύματα η θερμοκρασία δεν ήταν εφικτό να υπερβεί τους 150 °C, διότι με την περαιτέρω αύξηση της θερμοκρασίας δεν ήταν δυνατό να διατηρηθεί το αυτόκλειστο.

Στον παρακάτω πίνακα φαίνονται τα αποτελέσματα μέτρησης της γλυκόζης για τις 24 h, καθώς και η συγκέντρωση της γλυκόζης, η θερμοκρασία και ο χρόνος προκατεργασίας, για όλα τα δείγματα. Επίσης ακολουθούν τα διαγράμματα ώστε να γίνει η κατάλληλη σύγκριση.

Πίνακας 1: Τα αποτελέσματα μέτρησης της γλυκόζης για τις 24 h, η συγκέντρωση της γλυκόζης, ο αριθμός των δειγμάτων, η θερμοκρασία, ο χρόνος προκατεργασίας και ο τρόπος προκατεργασίας

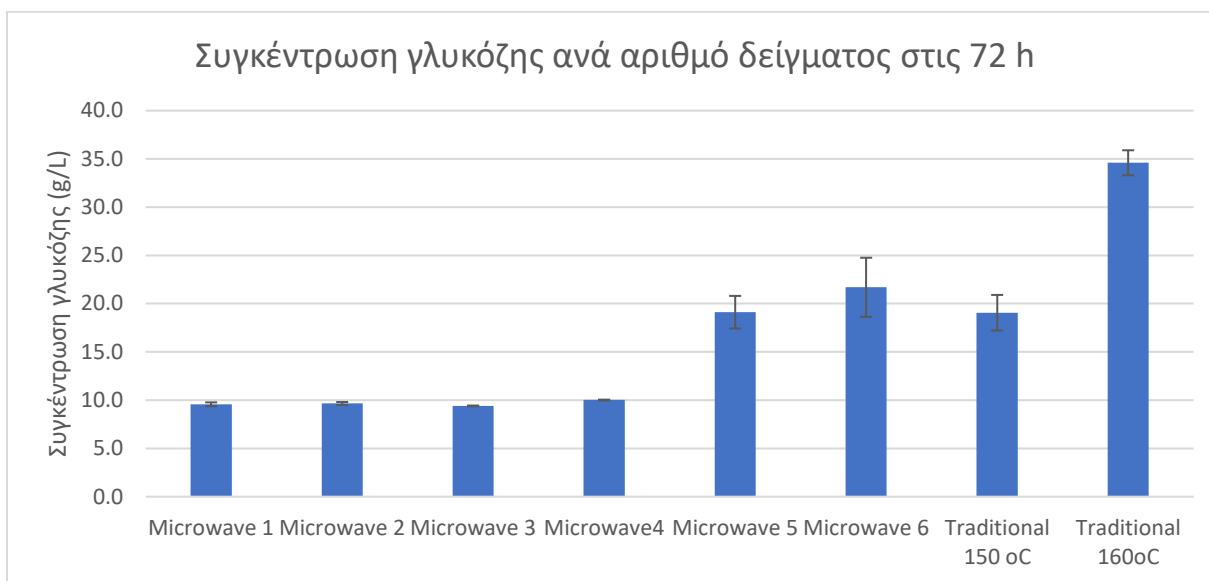
Αριθμός δείγματος	Θερμοκρασία (°C)	Χρόνος προκατεργασίας (min)	Συγκέντρωση γλυκόζης 24 h
Μικροκύματα			
1	150	15	13.5
2	150	30	16.2
3	150	45	12.3
4	150	60	15.1
5	150	90	13.0
6	150	120	16.5
Με αντίσταση			
1	150	45	22.2
2	160	45	28.9



Διάγραμμα 1: Συγκέντρωση γλυκόζης στα προκατεργασμένα υλικά με μικροκύματα και αντιστάσεις ( παραδοσιακή θέρμανση) κατά την υδρόλυση στις 24 h

Πίνακας 2: Τα αποτελέσματα μέτρησης της γλυκόζης για τις 72 h, η συγκέντρωση της γλυκόζης, ο αριθμός των δειγμάτων, η θερμοκρασία, ο χρόνος προκατεργασίας και ο τρόπος προκατεργασίας

Αριθμός δείγματος	Θερμοκρασία (°C)	Χρόνος προκατεργασίας (min)	Συγκέντρωση γλυκόζης 72 h
<b>Μικροκύματα</b>			
1	150	15	9.6
2	150	30	9.7
3	150	45	9.4
4	150	60	10.0
5	150	90	19.1
6	150	120	21.7
<b>Με αντίσταση</b>			
1	150	45	19.1
2	160	45	34.6



Διάγραμμα 2: Συγκέντρωση γλυκόζης στα προκατεργασμένα υλικά με μικροκύματα και αντιστάσεις ( παραδοσιακή θέρμανση) κατά την υδρόλυση στις 72 h

Τα υλικά του πίνακα 1 και 2 θα να συγκριθούν οι προκατεργασίες τους με βάση τα αποτελέσματα της υδρόλυσης, σε σχέση με τον χρόνο της προκατεργασίας, την θερμοκρασία αλλά και τα είδη προκατεργασίας μεταξύ τους.

Από τις παραπάνω τιμές παρατηρείται ότι στις 72 h πολλές τιμές γλυκόζης είναι μικρότερες από τις 24 h. Αυτό μπορεί αφενός να οφείλεται σε πιθανή μόλυνση με συνέπεια την κατανάλωση σακχάρων ή στο εύρος του σφάλματος της τιμής της γλυκόζης.

Παρατηρούμε ότι για τη θερμοκρασία των 150 °C η τιμή της τελικής γλυκόζης κυμαίνεται σε παρόμοια επίπεδα συγκριτικά με την προκατεργασία με μικροκύματα, ενώ για τη θερμοκρασία των 160 °C η παραγωγή γλυκόζης είναι 2,4 φορές μεγαλύτερη. Η προκατεργασία με αντιστάσεις για θερμοκρασία 150 °C είχε χρόνο διεργασίας 45 min και προέκυψε η συγκέντρωση της γλυκόζης τελικά 19,1 g/L, ίση με το υλικό 5 που προκατεργάστηκε με μικροκύματα σε 60 min. Βέλτιστη απόδοση είχε η προκατεργασία με μικροκύματα για 120 min, όπου η τελική συγκέντρωση της γλυκόζης προέκυψε 21,7 g/L. Ωστόσο, λόγω του αυξημένου κόστους που συνεπάγεται η μεγαλύτερη χρονική διάρκεια για τη θέρμανση και την ψύξη του αυτόλειστου, συμπεραίνουμε ότι για ίδιες συνθήκες τα μικροκύματα είναι μία αποδεκτή εναλλακτική στους παραδοσιακούς τρόπους θέρμανσης. Ακόμα, με βάση τα παραπάνω διαγράμματα με την αύξηση του χρόνου της προκατεργασίας αυξάνεται η απόδοση στη γλυκόζη. Μάλιστα μετά τα 60 min η απόδοση σε γλυκόζη αυξάνεται ραγδαία, γεγονός που αναδεικνύει ότι η αποτελεσματικότητα της προκατεργασίας είναι ανάλογη της έντασης των συνθηκών.

Στα μικροκύματα, συγκριτικά με τις αντιστάσεις, σε ελάχιστο χρονικό διάστημα επιτυγχάνεται η επιθυμητή θερμοκρασία. Το γεγονός αυτό κάνει πιο προσιτή τη μέθοδο των μικροκυμάτων, αφού η συνολική διάρκεια της προκατεργασίας μειώνεται σημαντικά συγκριτικά με τις συμβατικές μεθόδους θέρμανσης. Ακόμη, λόγω του συστήματος η θερμοκρασία κατανέμεται ομοιόμορφα και αυτή που

ανιχνεύεται είναι αυτή που ισχύει για όλο το σύστημα και όχι μόνο για την εξωτερική επιφάνεια. Το κύριο αρνητικό αυτής της μεθόδου είναι ότι δεν ήταν δυνατό να αναπτυχθούν θερμοκρασίες μεγαλύτερες από 150 °C εξ' αιτίας περιορισμών του εξοπλισμού.

Για να μπορέσουν να μελετηθούν οι προκατεργασίες ως προς την θερμοκρασία θα συγκριθούν τα αποτελέσματα της προκατεργασίας με αντιστάσεις, που έλαβαν χώρα στους 150 και 160 °C, και τα αποτελέσματα για προκατεργασίες για 45 min. Επαληθεύεται η θεωρία ότι μεγαλύτερη θερμοκρασία προκατεργασίας οδηγεί σε μεγαλύτερη συγκέντρωση γλυκόζης, με βάση και τα δυο διαγράμματα. Συγκεκριμένα στην προκατεργασία με αντιστάσεις η συγκέντρωση της γλυκόζης σχεδόν διπλασιάζεται με την αύξηση της θερμοκρασίας από τους 150 °C στους 160 °C. Το γεγονός αυτό υποδεικνύει ότι για την προκατεργασία αυτού του υλικού απαιτούνται υψηλότερες θερμοκρασίες. Όσον αφορά την προκατεργασία για 45 min φαίνεται ότι η προκατεργασία με αντιστάσεις έχει καλύτερη απόδοση από αυτή με μικροκύματα σε ίση ή μεγαλύτερη θερμοκρασία.

5.1.2 Σύγκριση προκατεργασίας υλικών με μικροκύματα και παραδοσιακή προκατεργασία με αντιστάσεις παρουσία οξικού οξέος

Σε μια προσπάθεια βελτίωσης της προκατεργασίας χωρίς την αύξηση της θερμοκρασίας, πραγματοποιήθηκαν δοκιμές με καταλύτη οξικό οξύ σε χαμηλές συγκεντρώσεις. Αυτό μελετήθηκε τόσο σε σύστημα με αντιστάσεις όσο και μικροκύματα. Επίσης μελετήθηκαν διαφορετικοί χρόνοι προκατεργασίας, συγκεκριμένα 30, 60, 90 min. Σε υλικά που προκατεργάστηκαν με μικροκύματα προστέθηκε και χρόνος προ-επώασης (Pre-incubation) με στόχο την ομοιόμορφη κατανομή της θερμοκρασίας στο σύστημα ακριβώς πριν την εκκίνηση της προκατεργασίας. Με τα αποτελέσματα από αυτές τις προκατεργασίες δημιουργήθηκε ο πίνακας 3. Η σύγκριση θα γίνει με βάση τη συγκέντρωση της γλυκόζης μετά από την υδρόλυση για 24 h. Με τα δεδομένα του πίνακα 3 δημιουργήθηκε και το αντίστοιχο διάγραμμα.



Πίνακας 3: Προκατεργασία υλικών με μικροκύματα και με αντιστάσεις και με διαλύτες νερό, ακετόνη και οξικό οξύ σε διαφορετικές συγκεντρώσεις, και με διαφορετικούς χρόνους προκατεργασίας και προ-επώασης και η συγκέντρωση της γλυκόζης που προκύπτει μετά την υδρόλυση για 24 ώρες

Αριθμός δείγματος	Διαλύτης	Οξικό οξύ %	Θερμοκρασία (°C)	Χρόνος προκατεργασίας	Προ-επώαση	Συγκέντρωση γλυκόζης στις 24 h
<b>Μικροκύματα</b>						
1	H <sub>2</sub> O/ACO	1	150	60	0	14.6
2	H <sub>2</sub> O/ACO	1	150	30	0	14.8
3	H <sub>2</sub> O/ACO	0.5	150	60	0	14.9
4	H <sub>2</sub> O/ACO	0.5	150	30	0	14.8
5	H <sub>2</sub> O/ACO	1.5	150	60	0	18.3
6	H <sub>2</sub> O/ACO	1.5	150	30	0	16.0
7	H <sub>2</sub> O/ACO	1.5	150	60	10	15.2
8	H <sub>2</sub> O/ACO	1.5	150	90	10	16.5
9	H <sub>2</sub> O/ACO	2	150	60	10	15.7
10	H <sub>2</sub> O/ACO	2	150	90	10	16.8
<b>Με αντιστάσεις</b>						
Autoclave 1	H <sub>2</sub> O/ACO	1.5	150	60	0	16.3
Autoclave 2	H <sub>2</sub> O/ACO	1.5	150	90	0	18.7



Διάγραμμα 3: Προκατεργασία υλικών με μικροκύματα και με αντιστάσεις και διαλύτες νερό, ακετόνη και οξικό οξύ σε διαφορετικές συγκεντρώσεις και το αποτέλεσμα της υδρόλυσης σε γλυκόζη μετά από 24 ώρες. Τα δείγματα 1-10 είναι προκατεργασμένα με μικροκύματα

Στην προκατεργασία με μικροκύματα στους 150 °C φαίνεται η καλύτερη απόδοση σε γλυκόζη να είναι με διαλύτη νερό, ακετόνη και 1,5 % οξικό οξύ, για 60 min προκατεργασίας χωρίς προ-επώαση. Η δεύτερη καλύτερη συνθήκη ήταν στο υλικό 10, όπου με διαλύτη νερό, ακετόνη και 2 % οξικό οξύ, για 90 min προκατεργασίας και 10 min προ-επώασης. Ενώ η χειρότερη απόδοση σε γλυκόζη ήταν του δείγματος 1, το οποίο είχε για συνθήκες προκατεργασίας 1% οξικό οξύ, 60 min χρόνο προκατεργασίας

και δεν είχε χρόνο προεπώασης. Η αύξηση της συγκέντρωσης του οξικού οξέος βελτιώνει την προκατεργασία με αντιστάσεις, όπως και η αύξηση του χρόνου της προκατεργασίας.

Στην προκατεργασία υλικών με διαλύτη το διάλειμμα νερό, ακετόνη σε αναλογία 50:50 και οξικό οξύ 1,5% στους 150 °C, η καλύτερη απόδοση ήταν για χρόνο προκατεργασίας 90 min. Με την αύξηση του χρόνου προκατεργασίας αυξάνεται η απόδοση της προκατεργασίας με αντιστάσεις.

Στην προκατεργασία υλικών με μικροκύματα, με ίδιο χρόνο προκατεργασίας 30 min και θερμοκρασία 150 °C, με την αύξηση της συγκέντρωσης του οξικού οξέος στο διαλύτη αυξάνεται η απόδοση σε γλυκόζη. Μάλιστα για οξικό οξύ 1,5% είναι η καλύτερη συνθήκη συγκριτικά με τις υπόλοιπες, με μεγάλη διαφορά συγκριτικά με αυτή που υπάρχει ανάμεσα στις προκατεργασίες με 0,5 και 1 % οξικό οξύ, συγκεκριμένα είναι 1,2 φορές μεγαλύτερη από εκείνη με 1% οξικό οξύ σε ίδιες συνθήκες θερμοκρασίας και χρόνου προκατεργασίας.

Ακόμα, φαίνεται ότι η απόδοση σε γλυκόζη δεν επηρεάζεται ιδιαίτερα από την αύξηση της συγκέντρωσης του οξικού οξέος από 0,5 σε 1%, αλλά για 1,5 % σημειώνεται η βέλτιστη τιμή. Επίσης οι προκατεργασίες με προσθήκη οξικού οξέος 2 % δεν έχουν σημαντική βελτίωση στην γλυκόζη που προκύπτει. Σημαντικό να αναφερθεί ότι η προκατεργασία με αντιστάσεις και οξικό οξύ 1,5% είναι η δεύτερη καλύτερη συνθήκη. Γεγονός που υποδεικνύει ότι για να είναι αποδοτική η προκατεργασία με μικροκύματα θα πρέπει να αυξηθεί ο χρόνος προκατεργασίας αλλά και η θερμοκρασία. Ακόμη, η προσθήκη χρόνου προ-επώασης δεν επηρέασε το αποτέλεσμα της προκατεργασίας, γεγονός που μας οδηγεί στο συμπέρασμα ότι η κατανομή της θερμοκρασίας στο σύστημα των μικροκυμάτων είναι ομοιόμορφη από την εκκίνηση της διεργασίας, παρά την απουσία ανάδευσης σε αντίθεση με το αυτόκαυστο όπου το σύστημα βρίσκεται υπό συνεχή ανάδευση. Η προκατεργασία με αντιστάσεις και με συγκέντρωση οξικού οξέος 1,5 % αποδείχθηκε η καλύτερη για προκατεργασία με χρονική διάρκεια 90 min.

Από τα παραπάνω, παρατηρούμε ότι οι δύο διαφορετικές μέθοδοι προκατεργασίας είναι συγκρίσιμες είτε με την παρουσία οξικού οξέος σαν καταλύτη είτε όχι. Η προσθήκη οξικού οξέος φαίνεται να βελτίωσε κατά κανόνα την προκατεργασία, αφού στις ίδιες συνθήκες η απελευθέρωση γλυκόζης ήταν μεγαλύτερη. Ακόμα, φαίνεται ότι τα στελέχη αραβοσίτου αποτελούν μια πηγή βιομάζας, η οποία απαιτεί σκληρότερες συνθήκες προκατεργασίας άνω των 150 °C δεδομένης της ραγδαίας αύξησης της συγκέντρωσης της γλυκόζης στη θερμοκρασία προκατεργασίας 160 °C. Επομένως, η εξασφάλιση εξοπλισμού θέρμανσης με μικροκύματα που ωστόσο θα μπορεί να ανταποκριθεί στις πιέσεις που δημιουργούνται πάνω από θερμοκρασίες 150 °C, θα εξασφάλιζε τη βέλτιστη διεργασία από πλευράς κόστους.

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

Για τις υδρολύσεις της βιομάζας που πραγματοποιήθηκαν σύμφωνα με την πειραματική διαδικασία που αναφέρθηκε, με στόχο 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 και καταλύτες και τις διαφορετικές συνθήκες που χρησιμοποιήθηκαν για το καθένα.

Η αποδοτικότητα κάθε προκατεργασίας αξιολογείται με βάση τα αποτελέσματα των υδρολύσεων και ισομερειώσεων και αξιολογείται από την (%) μετατροπή της κυτταρίνης σε γλυκόζη και την συγκέντρωση της γλυκόζης και από τα g φρουκτόζης που παράγονται ανά 100 g προκατεργασμένης βιομάζας.

Τα προκατεργασμένα υλικά έχουν διαφορετική προέλευση, διαλύτες, αναλογία των διαλυτών, συνθήκες προκατεργασίας, χρόνο της αντίδρασης και κλάσμα κυτταρίνης και ημικυτταρίνης από την ανάλυση της σύστασης του προκατεργασμένου υλικού. Για αυτό το λόγο έχουν ομαδοποιηθεί κατάλληλα ώστε να γίνει μια πιο στοχευμένη σύγκριση.

5.2.1 Προκατεργασία υλικών από πεύκο με διαφορετικούς διαλύτες (ισοβουτανόλη, αιθανόλη, ακετόνη, τετραϋδροφουράνιο)

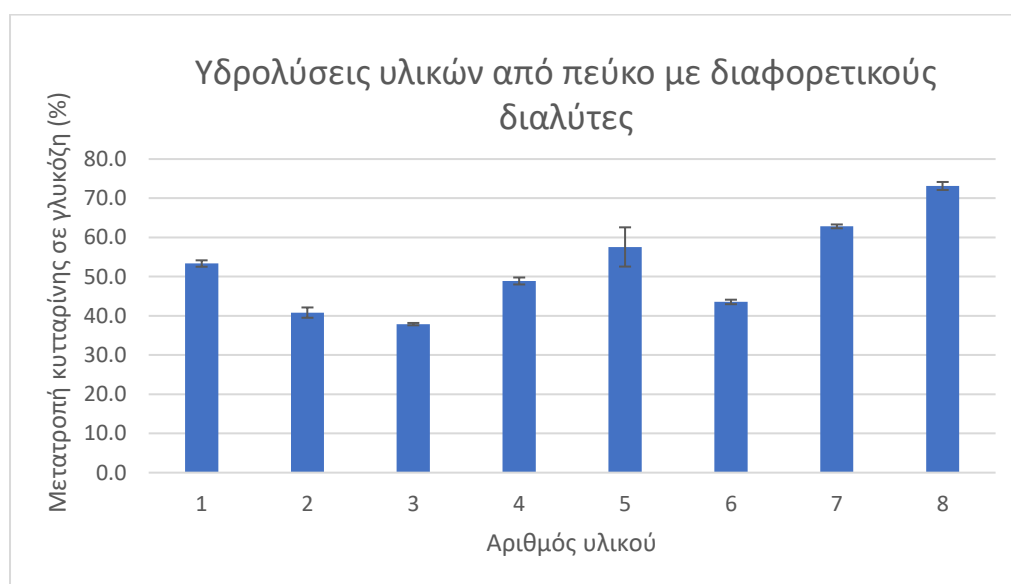
Στην ενότητα που ακολουθεί περιλαμβάνει τα υλικά που προέρχονται από το ίδιο είδος βιομάζας, συγκεκριμένα πεύκο αλλά έχουν προκατεργαστεί με χρήση διαφορετικών διαλυτών (ισοβουτανόλη, αιθανόλη, τετραϋδροφουράνιο, ακετόνη) και διαφορετικών χρόνων προκατεργασίας για σταθερές συνθήκες προκατεργασίας. Η θερμοκρασία της προκατεργασίας ήταν 175 °C.

Πίνακας 3: Συγκεντρωτικές πληροφορίες με την ονομασία του κάθε υλικού, τους διαλύτες, τον χρόνο της προκατεργασίας καθώς και την κυτταρίνη και ημικυτταρίνη

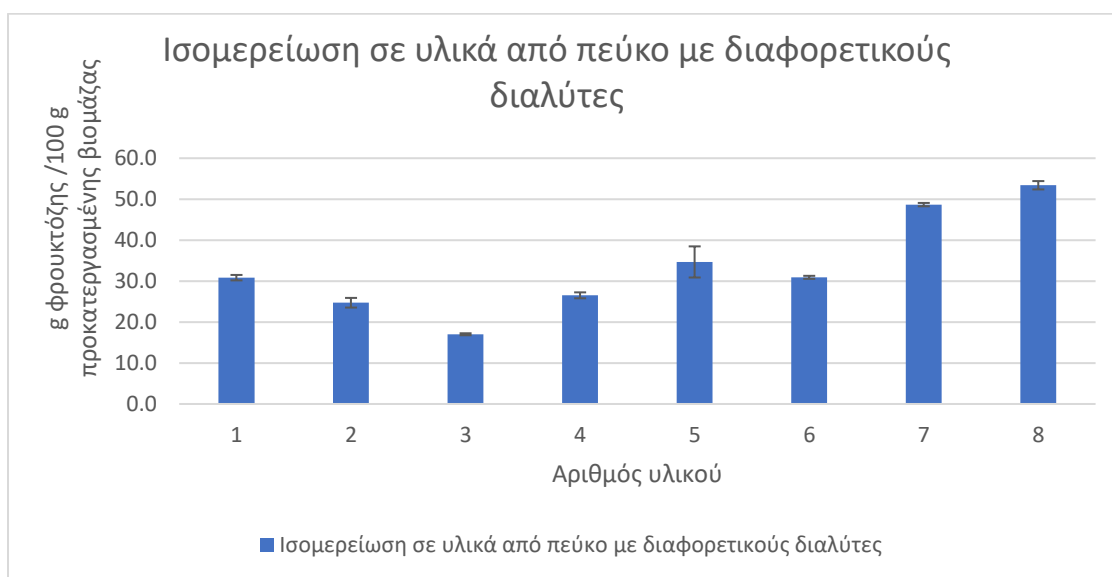
Αριθμός υλικού	Διαλύτης	Χρόνος αντίδρασης (min)	κυτταρίνη	ημικυτταρίνη
1	d.H <sub>2</sub> O/EtOH	60	77.6	13.2
2	d.H <sub>2</sub> O/ACO	60	82.8	10.1
3	d.H <sub>2</sub> O/THF	60	60.8	6.7
4	d.H <sub>2</sub> O/THF	120	71.3	6.8
5	d.H <sub>2</sub> O/EtOH	120	79.6	9.7
6	d.H <sub>2</sub> O/ACO	120	89.2	7.8
7	d.H <sub>2</sub> O/C <sub>4</sub> H <sub>10</sub> O	60	89.7	2.9
8	d.H <sub>2</sub> O/C <sub>4</sub> H <sub>10</sub> O	120	83.6	4.6

Πίνακας 4: Αποτελέσματα υδρόλυσης και ισομερειώσεων υλικών από πεύκο με διαφορετικούς διαλύτες για διαφορετικούς χρόνους αντίδρασης

Αριθμός υλικού	Συγκέντρωση γλυκόζης	μετατροπή κυτταρίνης %	Τελική συγκέντρωση φρουκτόζης (g/L)	g φρουκτόζης /100 g προκατεργασμένης βιομάζας
1	51.1	53.3	38.1	30.8
2	41.7	40.8	30.5	24.7
3	28.4	37.9	21.0	17.0
4	43.0	48.9	32.8	26.5
5	56.6	57.6	42.8	34.7
6	47.9	43.5	38.2	30.9
7	69.6	62.8	60.1	48.7
8	75.5	73.1	65.9	53.4



Διάγραμμα 4: Ποσοστιαία μετατροπή κυτταρίνης σε γλυκόζη υλικών από πεύκο



Διάγραμμα 5: Κλάσμα g φρουκτόζης ανά 100 g προκατεργασμένης βιομάζας για υλικά από πεύκο

Συγκεκριμένα, όπως διαπιστώνεται και στα παραπάνω διαγράμματα, μεταξύ των προκατεργασμένων υλικών της που η βιομάζα προέρχεται από πεύκο και η θερμοκρασία της προκατεργασίας είναι 175°C, την υψηλότερη μετατροπή κυτταρίνης σε γλυκόζη (73,1%) επιτυγχάνει η προκατεργασία του υλικού με διαλύτη την ισοβουτανόλη για χρόνο αντίδρασης 120 min (υλικό 8) με παραγωγή 53,4 g φρουκτόζης ανά 100 g προκατεργασμένης βιομάζας. Πάνω από τη μισή ποσότητα του αρχικού υλικού μετατρέπεται σε φρουκτόζη. Λίγο χαμηλότερη μετατροπή κυτταρίνης σε γλυκόζη παρουσιάζει η προκατεργασία με διαλύτη ισοβουτανόλη και χρόνο 60 min (υλικό 4), όπου επιτυγχάνεται παραγωγή γλυκόζης 62,8% και τελικά 48,7 g φρουκτόζης ανά 100 g προκατεργασμένης βιομάζας. Άρα στα δυο καλύτερα δείγματα η μετατροπή ήταν ίση η μεγαλύτερη από το 50%.

Ακολουθούν η προκατεργασίες με αιθανόλη, υλικά 1 και 5, με πάνω από 53% μετατροπή της κυτταρίνης σε γλυκόζη και μετατροπή φρουκτόζης 30,8 και 34,7 g φρουκτόζης/ 100 g βιομάζας. Χαμηλότερη αποδοτικότητα συγκριτικά με τις προηγούμενες παρουσιάζει η προκατεργασία με διαλύτη τετραϋδροφουράνιο για 60 min (υλικό 2), γεγονός που μπορεί να οφείλεται στη δημιουργία παρεμποδιστών των ενζύμων της υδρόλυσης. Ενώ οι προκατεργασίες με τετραϋδροφουράνιο, ακετόνη έχουν χαμηλότερες αποδόσεις.

Συμπερασματικά, δεδομένων αυτών των αποτελεσμάτων, ο διαλύτης ισοβουτανόλη 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. Επίσης οι διαλύτες με τετραϋδροφουράνιο, ακετόνη μπορεί να δημιουργούν παρεμποδιστές των ενζύμων της υδρόλυσης και της ισομερείωσης με αποτέλεσμα να παραμένει χαμηλή η παραγωγή γλυκόζης και φρουκτόζης, αντίστοιχα.

### 5.2.2 Προκατεργασία υλικών από οξιά με διαλύτη ισοβουτανόλη

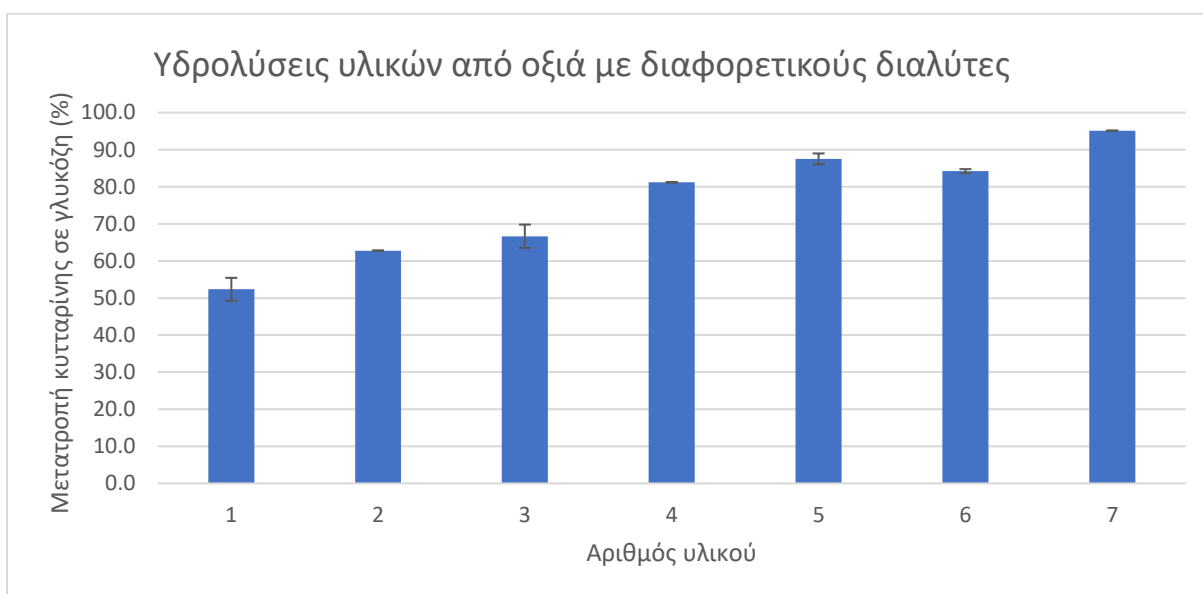
Η ενότητα που ακολουθεί περιλαμβάνει τα υλικά που προέρχονται από βιομάζα οξιάς και έχουν προκατεργαστεί με χρήση διαλύτη ισοβουτανόλη.

Πίνακας 5: Συγκεντρωτικές πληροφορίες με την ονομασία του κάθε υλικού, τους διαλύτες, την αναλογία των διαλυτών, τις συνθήκες προκατεργασίας, τον χρόνο της προκατεργασίας

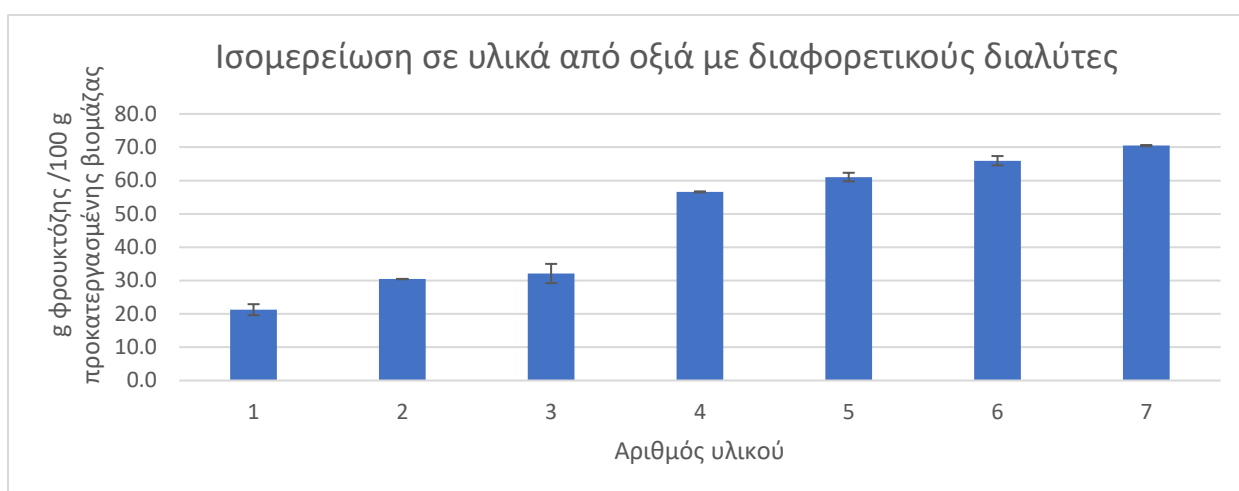
Αριθμός υλικού	Διαλύτης	Θερμοκρασία	Χρόνος αντίδρασης (min)	λιγνίνη	κυτταρίνη	ημικυτταρίνη
1	d.H <sub>2</sub> O/C <sub>4</sub> H <sub>10</sub> O	150	60	19.8	55.5	25.0
2	d.H <sub>2</sub> O/C <sub>4</sub> H <sub>10</sub> O	150	120	12.4	65.9	19.4
3	d.H <sub>2</sub> O/C <sub>4</sub> H <sub>10</sub> O	160	60	13.4	68.2	21.6
4	d.H <sub>2</sub> O/C <sub>4</sub> H <sub>10</sub> O	160	120	2.6	87.8	16.0
5	d.H <sub>2</sub> O/C <sub>4</sub> H <sub>10</sub> O	175	60	1.8	87.4	13.1
6	d.H <sub>2</sub> O/C <sub>4</sub> H <sub>10</sub> O	175	120	1.6	92.6	11.6
7	d.H <sub>2</sub> O/C <sub>4</sub> H <sub>10</sub> O	175	120	2.2	84.1	14.7

Πίνακας 6: Αποτελέσματα υδρόλυσης και ισομερείωσης υλικών από οξιά με διαφορετικούς διαλύτες

Αριθμός υλικού	Συγκέντρωση γλυκόζης	μετατροπή κυτταρίνης %	Τελική συγκέντρωση φρουκτόζης (g/L)	g φρουκτόζης /100 g προκατεργασμένης βιομάζας
1	35.9	52.4	26.2	21.2
2	51.0	62.8	37.6	30.4
3	56.1	66.7	39.6	32.1
4	88.0	81.2	69.9	56.6
5	94.5	87.5	75.4	61.1
6	96.3	84.2	81.4	66.0
7	98.7	95.1	87.0	70.5



Διάγραμμα 6: Ποσοστιαία μετατροπή κυτταρίνης σε γλυκόζη υλικών από οξιά



Διάγραμμα 7: Κλάσμα g φρουκτόζης ανά 100 g προκατεργασμένης βιομάζας για υλικά από οξιά

Με βάση τα παραπάνω διαγράμματα, μεταξύ των προκατεργασμένων υλικών της που η βιομάζα προέρχεται από οξιά, στα οποία χρησιμοποιείται ο διαλύτης ισοβουτανόλη και για διαφορετικούς χρόνους προκατεργασίας 60, 120 min, αλλά και για διαφορετικές θερμοκρασίες 150, 160 και 175 °C.

Την υψηλότερη μετατροπή κυτταρίνης σε γλυκόζη (95,1%) επιτυγχάνει η προκατεργασία του υλικού από οξιά και θερμοκρασία 175 °C (υλικό 7) με παραγωγή 70,5 g φρουκτόζης ανά 100 g προκατεργασμένης βιομάζας. Τις ίδιες συνθήκες το υλικό 7 έχει το υλικό 6, με την προκατεργασία του επιτυγχάνεται η δεύτερη καλύτερη παραγωγή φρουκτόζης 66 g φρουκτόζης ανά 100 g προκατεργασμένης βιομάζας. Πάνω από τη μισή ποσότητα του αρχικού υλικού μετατρέπεται σε φρουκτόζη. Λίγο χαμηλότερη μετατροπή κυτταρίνης σε γλυκόζη παρουσιάζει η προκατεργασία με θερμοκρασία 160°C και χρόνο προκατεργασίας 120 min (υλικό 4), όπου επιτυγχάνεται παραγωγή γλυκόζης 81.2% και τελικά 56,6 g φρουκτόζης ανά 100 g προκατεργασμένης βιομάζας. Άρα στα τρία

καλύτερα δείγματα η μετατροπή ήταν ίση η μεγαλύτερη από το 55%. Τα υλικά αυτά ήταν πιο αποδοτικά τόσο στη μετατροπή της κυτταρίνης αλλά και στην τελική παραγωγή γλυκόζης συγκριτικά μετά υλικά που προέρχονταν από πεύκο.

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. Όπως επίσης και με την αύξηση του χρόνου της προκατεργασίας.

5.2.3 Προκατεργασμένα υλικά από οξιά με χρήση ή μη καταλυτών και διαφορετικά είδη καταλυτών  
Στη συνέχεια ακολουθεί η μελέτη υλικών 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.

Πίνακας 7: Συγκεντρωτικές πληροφορίες με την ονομασία του κάθε υλικού, τους διαλύτες, την αναλογία των διαλυτών, τις συνθήκες προκατεργασίας, τον χρόνο της προκατεργασίας και τη χρήση ή μη καταλυτών και το είδος των καταλυτών

Αριθμός υλικού	Διαλύτης	Θερμοκρασία	Χρόνος αντίδρασης (min)	κυτταρίνη	ημικυτταρίνη
no catalyst					
1	d.H2O/ACO	150	120	62.7	21.0
2	d.H2O/THF	150	120	73.1	13.3
3	d.H2O/EtOH	150	120	56.7	20.7
4	d.H2O/C4H10O	150	120	65.9	19.4
POM catalyst					
5	d.H2O/ACO & 5g Pom	150	120	89.1	7.9
6	d.H2O/EtOH & 2.5g Pom	150	120	86.6	12.2
7	d.H2O/THF & 2.5g Pom	150	120	90.4	7.7
8	d.H2O/C4H10O & 2.5g Pom	150	120	93.3	5.3
Fe3MO12OP catalyst					
9	d.H2O/ACO & 2.5g Fe3MO12OP	150	120	82.0	7.0
10	d.H2O/EtOH & 2.5g Fe3MO12OP	150	120	77.7	9.9
11	d.H2O/C4H10O & 0.25g Fe3MO12OP	150	120	78.5	9.8
Cu3MO12OP catalyst					
12	d.H2O/ACO & 2.5g Cu3MO12OP	150	120	83.3	6.8
13	d.H2O/EtOH & 2.5g Cu3MO12OP	150	120	89.9	3.3
14	d.H2O/C4H10O & 0.25g Cu3MO12OP	150	120	86.6	8.2

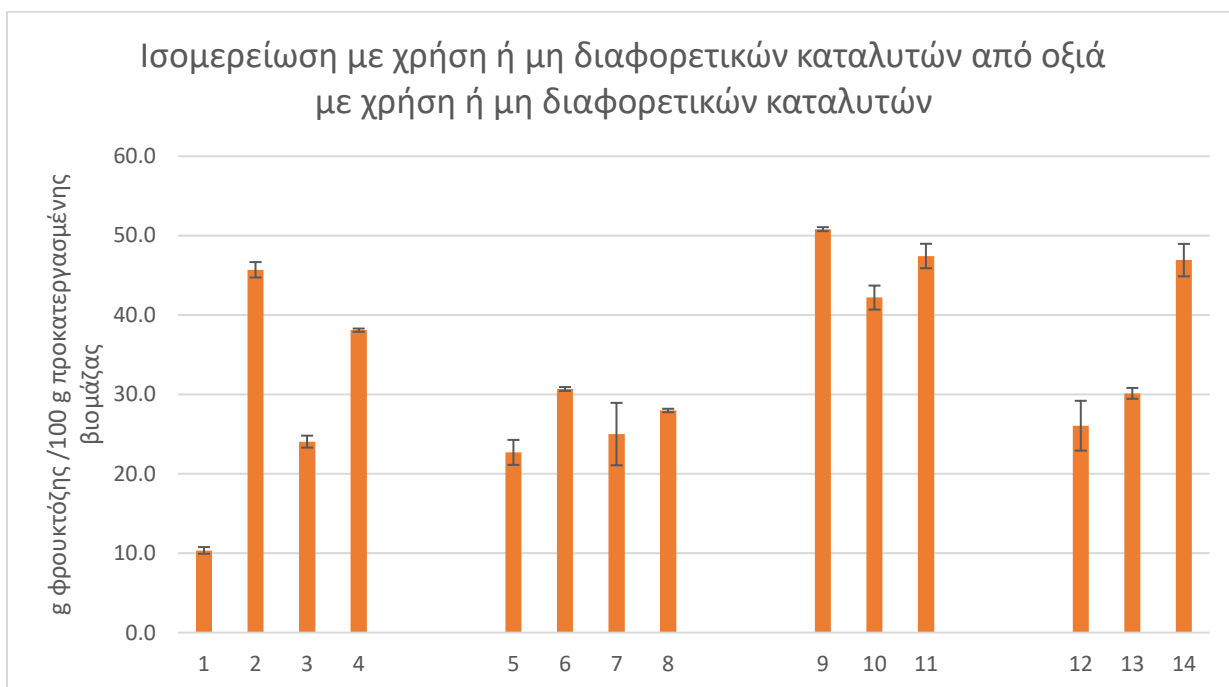


Πίνακας 8: Αποτελέσματα υδρόλυσης και ισομερείωσης υλικών από οξιά στις ίδιες συνθήκες με τη χρήση ή μη καταλυτών

Αριθμός υλικού	Συγκέντρωση γλυκόζης	μετατροπή κυτταρίνης %	Τελική συγκέντρωση φρουκτόζης (g/L)	g φρουκτόζης /100 g προκατεργασμένης βιομάζας
1	16.4	21.1	12.8	10.4
2	72.3	80.1	56.4	45.7
3	40.4	57.7	29.7	24.1
4	63.4	78.0	47.0	38.1
5	46.4	42.2	28.0	22.7
6	58.5	54.7	37.9	30.7
7	47.7	42.8	30.9	25.0
8	56.2	48.8	34.5	28.0
9	81.3	80.3	62.7	50.8
10	66.9	69.7	52.1	42.2
11	78.4	81.0	58.6	47.4
12	46.9	45.7	32.2	26.1
13	53.9	48.6	37.2	30.1
14	77.5	72.5	57.9	46.9



Διάγραμμα 8: Ποσοστιαία μετατροπή κυτταρίνης σε γλυκόζη υλικών από οξιά με τη χρήση ή μη καταλυτών



Διάγραμμα 9: Κλάσμα g φρουκτόζης ανά 100 g προκατεργασμένης βιομάζας για υλικά από οξιά με τη χρήση ή μη καταλυτών

Από τα αντίστοιχα παραπάνω διαγράμματα των προκατεργασμένων υλικών οξιά με χρήση ή μη καταλυτών, όταν δεν προστίθεται κάποιος στερεός καταλύτης, παρατηρείται ότι ο καλύτερος με διαφορά διαλύτης για την προκατεργασία της βιομάζας τύπου οξιάς, συγκεκριμένα είναι το τετραϋδροφουράνιο (υλικό 2) με 80,1% μετατροπή κυτταρίνης σε γλυκόζη και παραγωγή 45,7 g φρουκτόζης ανά 100 g προκατεργασμένης βιομάζας. Ακολουθεί συγκριτικά με την αποδοτικότητα, η προκατεργασία με διαλύτη τετραϋδροφουράνιο και χωρίς καταλύτη (υλικό 4) όπου επιτυγχάνεται παραγωγή γλυκόζης 78% και τελικά 38,1 g φρουκτόζης ανά 100 g προκατεργασμένης βιομάζας. Άρα χωρίς καταλύτη πάνω από 78% της κυτταρίνης μετατρέπεται σε γλυκόζη.

Σχετικά με τα προκατεργασμένα υλικά από οξιά 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 6) και παράγονται 30,7 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 8) με μετατροπή σε γλυκόζη 48,8% και παραγωγή φρουκτόζης 28,1 g ανά 100 g προκατεργασμένης βιομάζας. Οι προκατεργασίες με διαλύτες ακετόνη και τετραϋδροφουράνιο έχουν την χαμηλότερη αποδοτικότητα.

Όσον αφορά τα προκατεργασμένα υλικά που προστίθεται ο  $Fe_3MO_{12}OP$  καταλύτης, παρατηρείται ότι η υψηλότερη μετατροπή κυτταρίνης σε γλυκόζη (81.0%) επιτυγχάνεται με χρήση της ισοβουτανόλης ως διαλύτη (υλικό 11), με παραγωγή 47,4 g φρουκτόζης ανά 100 g προκατεργασμένης βιομάζας, ενώ πολύ κοντινά αποτελέσματα παρουσιάζει και η προκατεργασία με ακετόνη (υλικό 9) 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

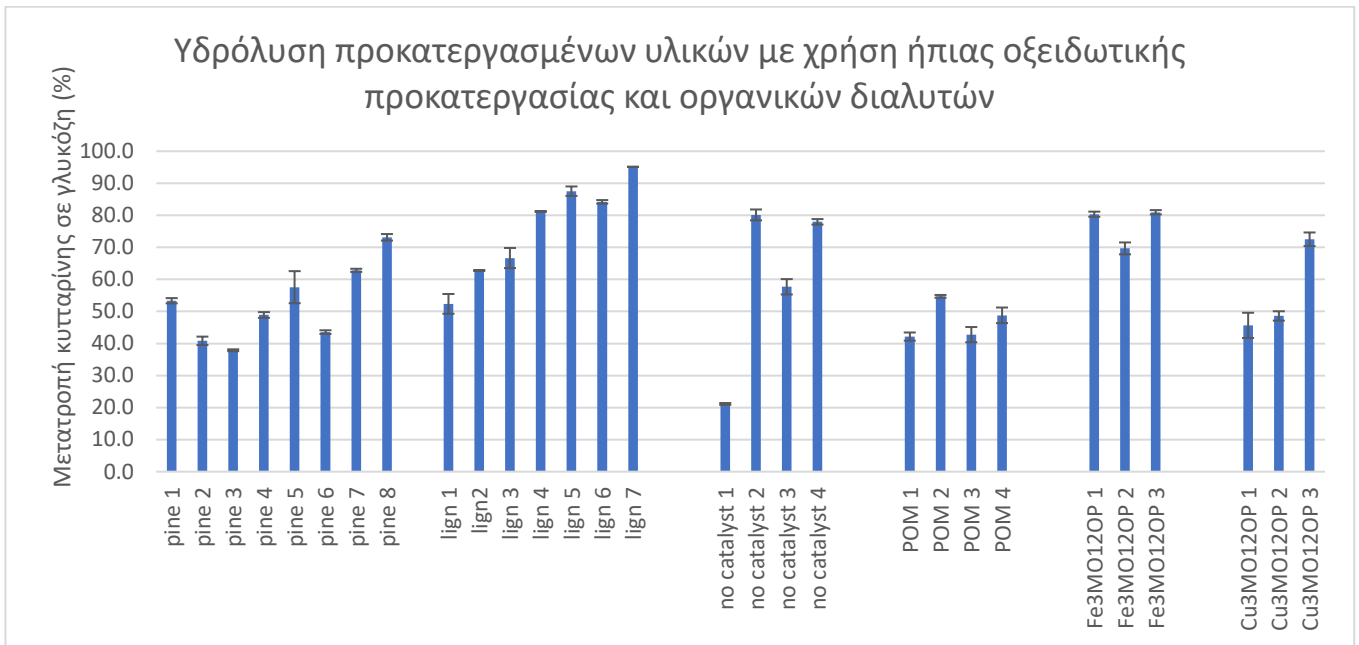
προηγούμενες είναι η μετατροπή κυτταρίνης σε γλυκόζη με τη χρήση αιθανόλης ως διαλύτη (υλικό 10).

Όταν προστίθεται ο  $\text{Cu}_3\text{MO}_{12}\text{OP}$  καταλύτης στην προκατεργασία οξιάς, παρατηρείται ότι η μεγαλύτερη μετατροπή κυτταρίνης σε γλυκόζη επιτυγχάνεται με χρήση ισοβουτανόλης με μετατροπή κυτταρίνης σε γλυκόζη 72,5% και με παραγωγή φρουκτόζης 46,9 g φρουκτόζης ανά 100 g προκατεργασμένης βιομάζας. Ενώ η απόδοση ήταν σχεδόν παρόμοια ανάμεσα στα υλικά 12 και 13. Στο υλικό 12 με μετατροπή κυτταρίνης σε γλυκόζη 45,7 % επιτυγχάνεται με χρήση της ακετόνης, με παραγωγή 26,1 g φρουκτόζης ανά 100 g προκατεργασμένης βιομάζας. Στο υλικό 13 χρησιμοποιήθηκε διαλύτης αιθανόλη και η μετατροπή της κυτταρίνης ήταν 48,6 %, αλλά με παραγωγή 30,1 g φρουκτόζης ανά 100 g προκατεργασμένης βιομάζας.

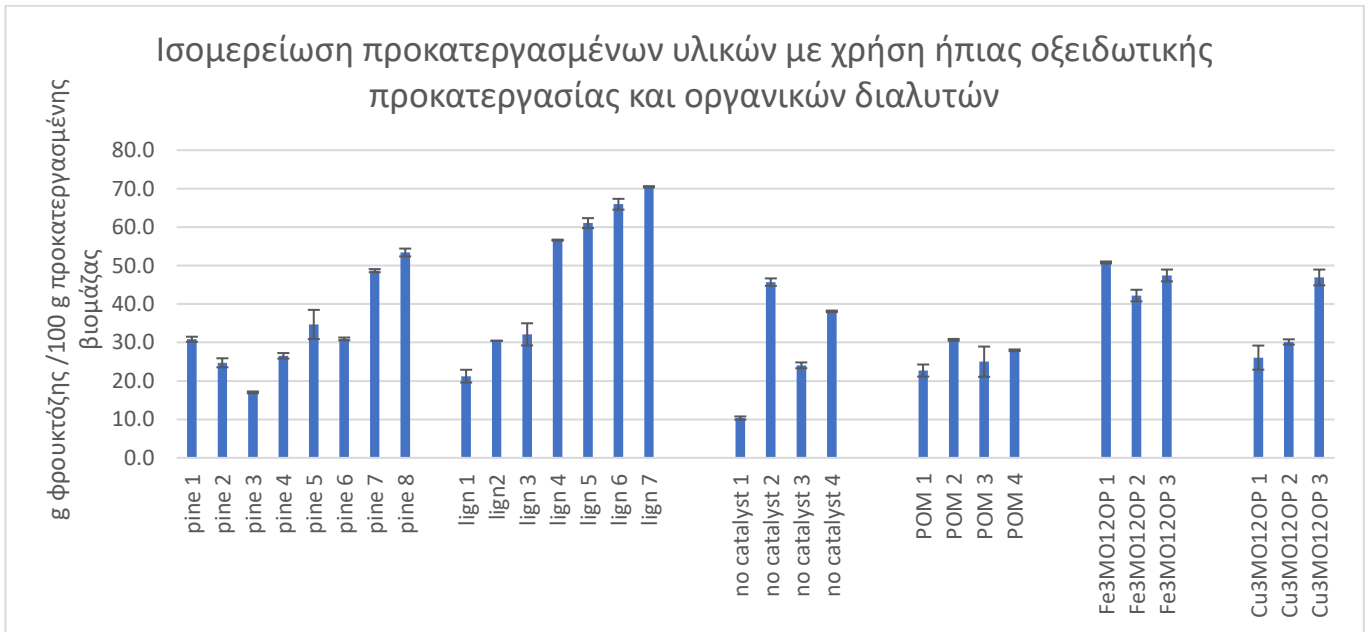
Συνοψίζοντας, ο καταλύτης  $\text{Fe}_3\text{MO}_{12}\text{OP}$  είναι ο καλύτερος από τους στερεούς καταλύτες που δοκιμάστηκαν για την προκατεργασία βιομάζας τύπου οξιάς με διαλύτες ακετόνη ή ισοβουτανόλη. Αφού η πιο αποδοτική προκατεργασία πραγματοποιείται με χρήση του  $\text{Fe}_3\text{MO}_{12}\text{OP}$ . Επίσης, υψηλή μετατροπή κυτταρίνης σε γλυκόζη και υψηλό κλάσμα φρουκτόζης ανά 100 g προκατεργασμένης βιομάζας επιτυγχάνονται και με απουσία καταλυτών και χρήση διαλυτών, συγκεκριμένα του τετραϋδροφουρανίου. Ο καταλύτης  $\text{Cu}_3\text{MO}_{12}\text{OP}$  δίνει και αυτός κάποια ικανοποιητικά αποτελέσματα με διαλύτη ισοβουτανόλη σχετικά με την αποδοτικότητα της προκατεργασίας. Ο χαλκός φαίνεται να δυσχεραίνει τις λειτουργίες των ενζύμων. Τέλος, ανάμεσα στους τρεις καταλύτες που χρησιμοποιήθηκαν ο POM καταλύτης είναι λιγότερο αποδοτικός. Συνολικά, ο συνδυασμός φυσικοχημικών και βιοκαταλυτικών μεθόδων φαίνεται να λειτουργεί βέλτιστα παρουσία σιδήρου και διαλύτη ακετόνης ή ισοβουτανόλης.

#### 5.2.4 Συνολικά- Σύνοψη

Για να μπορέσουν να συγκριθούν όλες οι υδρολύσεις της βιομάζας που πραγματοποιήθηκαν καθώς και οι ισομερειώσεις ως προς την αποδοτικότητα της προκατεργασίας με βάση τους διαφορετικούς διαλύτες και καταλύτες και τις διαφορετικές συνθήκες που χρησιμοποιήθηκαν για το καθένα, δημιουργήθηκε ένα συνολικό διάγραμμα, το οποίο ακολουθεί. Όπως και στις προκατεργασίες που προηγήθηκαν, η αποδοτικότητα κάθε προκατεργασίας αξιολογείται με βάση τα αποτελέσματα των υδρολύσεων και ισομερειώσεων και αξιολογείται από την (%) μετατροπή της κυτταρίνης σε γλυκόζη και την συγκέντρωση της γλυκόζης και από τα g φρουκτόζης που παράγονται ανά 100 g προκατεργασμένης βιομάζας.



Διάγραμμα 10: Συνολική επισκόπηση όλων των προκατεργασμένων υλικών με βάση τη ποσοστιαία μετατροπή της κυτταρίνης σε γλυκόζη.



Διάγραμμα 11: Συνολική επισκόπηση όλων των προκατεργασμένων υλικών με βάση το κλάσμα g φρουκτόζης ανά 100 g προκατεργασμένης βιομάζας.

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. Πάνω από τα μισά υλικά έχουν μετατροπή κυτταρίνης σε γλυκόζη πάνω από 50%. Κάτι που δεν ισχύει για την παραγωγή φρουκτόζης, αυτό μπορεί να οφείλεται στον διαλύτη, οποίος μπορεί να δημιουργεί παρεμποδιστές του ενζύμου της ισομερείωσης.

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. Επίσης, παρατηρήθηκε ότι η οξιά είναι επιδεδεικτικότερος τύπος βιομάζας σε υδρολύσεις συγκριτικά με το πεύκο, το οποίο γενικά παρουσιάζει χαμηλότερες μετατροπές κυτταρίνης σε γλυκόζη. Την υψηλότερη μετατροπή κυτταρίνης σε γλυκόζη (95,1%) επιτυγχάνει η προκατεργασία του υλικού από οξιά με διαλύτη ισοβουτανόλη και στην υψηλότερη θερμοκρασία 175 °C (υλικό 7) με παραγωγή 70,5 g φρουκτόζης ανά 100 g προκατεργασμένης βιομάζας. Επίσης, η υψηλότερη απόδοση σε γλυκόζη από υλικά από πεύκο επιτυγχάνεται όταν η προκατεργασία του υλικού ήταν με διαλύτη ισοβουτανόλη. Όσον αφορά την παραγωγή της φρουκτόζης, την υψηλότερη επιτυγχάνει η προκατεργασία του υλικού από οξιά και θερμοκρασία 175 °C (υλικό 7) με παραγωγή 70,5 g φρουκτόζης ανά 100 g προκατεργασμένης βιομάζας.

Η χρήση του κατάλληλου διαλύτη και καταλύτη παίζει επίσης καθοριστικό ρόλο στην αποδοτικότητα της προκατεργασίας. Συνολικά τα υλικά που προκατεργάστηκαν με διαλύτη ισοβουτανόλη είχαν την υψηλότερη απόδοση στην παραγωγή φρουκτόζης. Όσον αφορά τους καταλύτες καλύτερος ήταν ο καταλύτης  $Fe_3MO_{12}OP$  με τον οποίο επιτεύχθηκαν υψηλές μετατροπές κυτταρίνης σε γλυκόζη, συγκεκριμένα 80.3 % με χρήση ακετόνης και 81% με χρήση ισοβουτανόλης ως διαλύτη. Μάλιστα, παρατηρείται ότι οι μετατροπές κυτταρίνης που επιτεύχθηκαν με τον καταλύτη  $Fe_3MO_{12}OP$  είναι συγκρίσιμες με αυτές που επιτεύχθηκαν με τις θερμοκρασίες των 175 °C απουσία καταλύτη. Επομένως, συμπεραίνουμε ότι η εισαγωγή του καταλύτη στην προκατεργασία βοήθησε αύξηση της απόδοσης της προκατεργασίας. Ο καταλύτης POM αποδείχτηκε λιγότερο κατάλληλος.

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.

### 5.3 Οξειδάση της γαλακτόζης

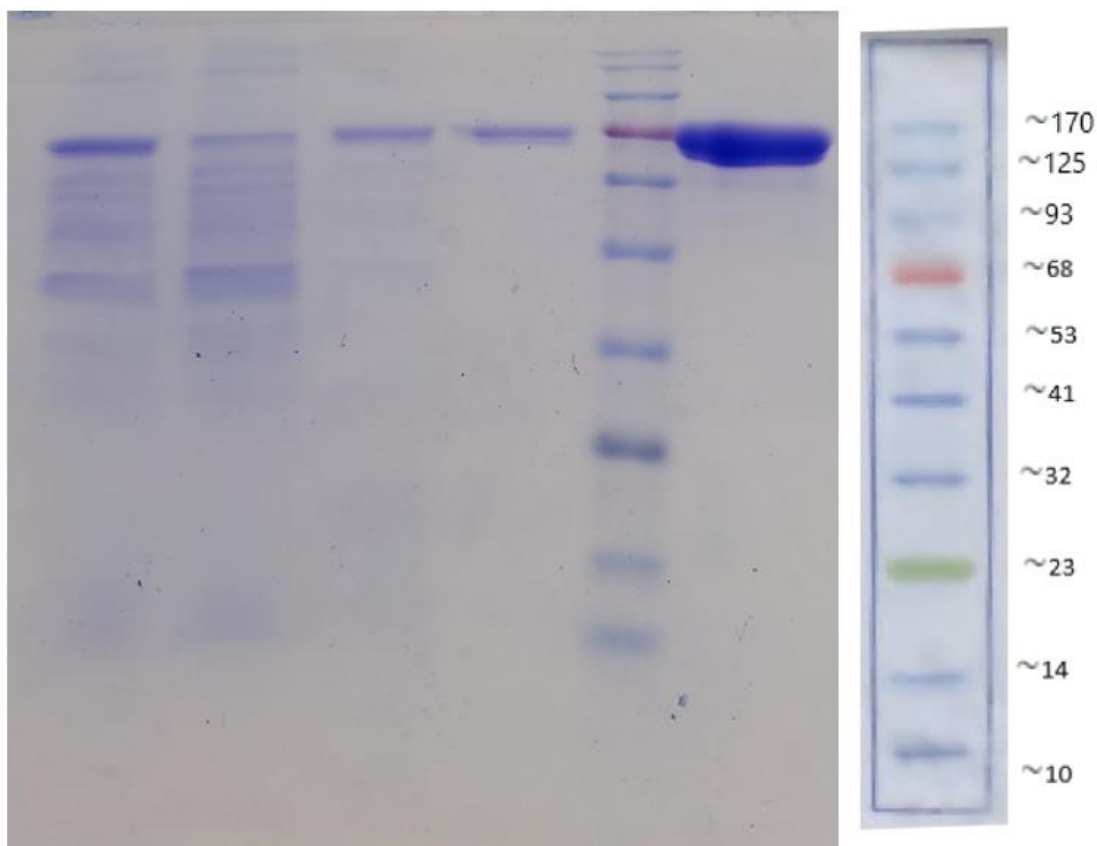
Η οξειδάση της γαλακτόζης ανήκει στην οικογένεια AA5 της CAZy βάσης δεδομένων και τυπικά δρα σε γαλακτόζη. Το συγκεκριμένο ένζυμο εκλέχθηκε για ενεργότητα σε φουράνια. Για αυτό το σκοπό απομονώθηκε το γονίδιο που εκφράζει την οξειδάση της γαλακτόζης από τον μύκητα *Fusarium oxysporum*. Για την παραγωγή του πραγματοποιήθηκε το πρώτο στάδιο του μετασχηματισμού κυττάρων *E.coli* των πλασμιδίων πολλαπλασιασμού και έκφρασης που έφεραν το γονίδιο της οξειδάσης της γαλακτόζης και στη συνέχεια εισαγωγή αυτού στον ζυμομύκητα *Pichia pastoris*. Το μετασχηματισμένο στέλεχος *P. Pastoris* αναπτύχθηκε σε στερεό και στη συνέχεια σε υγρό μέσο. Έγινε screening σε 17 αποικίες και αποδείχθηκε ότι 4 από τις 14 είχαν ενεργότητα σε γαλακτόζη. Στη συνέχεια, επιλέχθηκε εκείνη με την υψηλότερη ενεργότητα στη γαλακτόζη για καλλιέργεια σε μεγαλύτερη κλίμακα και απομόνωση του ενζύμου. Έπειτα, απομονώθηκε η οξειδάση της γαλακτόζης μέσω φυγοκέντρησης, φιλτραρίσματος με μοριακά φίλτρα υπό κενό και τελικά υπερδιήθησης με χρήση μοριακών φίλτρων. Ακολούθησε χρωματογραφία συγγένειας για την ολοκλήρωση της απομόνωσης του ενζύμου. Τέλος συμπυκνώθηκε το διάλυμα.

#### 5.3.1 Πρωτεϊνική συγκέντρωση

Αφού πραγματοποιήθηκαν όλες οι διαδικασίες παραγωγής, παραλαβής και απομόνωσης του ενζύμου, υπολογίστηκε η συγκέντρωσή του στα τελικά διαλύματα που χρησιμοποιήθηκαν στον χαρακτηρισμό και στη μελέτη της δράσης του, καθώς και την συνολική ποσότητα του ενζύμου που παράχθηκαν από 1 L καλλιέργειας. Αυτό έγινε με φωτομέτρηση στα 280 nm, όπου αποδείχθηκε ότι η συγκέντρωση της πρωτεΐνης στο καθαρό κλάσμα ήταν 0,65 mg/mL που κατ' επέκταση οδηγεί στο συμπέρασμα ότι σε 1 L καλλιέργειας παράχθηκαν 0,65 g οξειδάσης της γαλακτόζης.

#### 5.3.2 Αξιολόγηση καθαρότητας του ενζύμου από το αποτέλεσμα της ηλεκτροφόρησης σε πηκτή πολυακρυλαμιδίου υπό αποδιατακτικές συνθήκες

Για να πιστοποιηθεί ότι το ένζυμο που απομονώθηκε ήταν η οξειδάση της γαλακτόζης εφαρμόστηκε η ηλεκτροφόρηση πρωτεϊνών σε πήκτωμα πολυακρυλαμιδίου υπό αποδιατακτικές συνθήκες. Τα αποτελέσματα της διαδικασίας ηλεκτροφόρησης ύστερα από τα στάδια χρωματισμού και αποχρωματισμού παρουσιάζονται στην παρακάτω εικόνα.



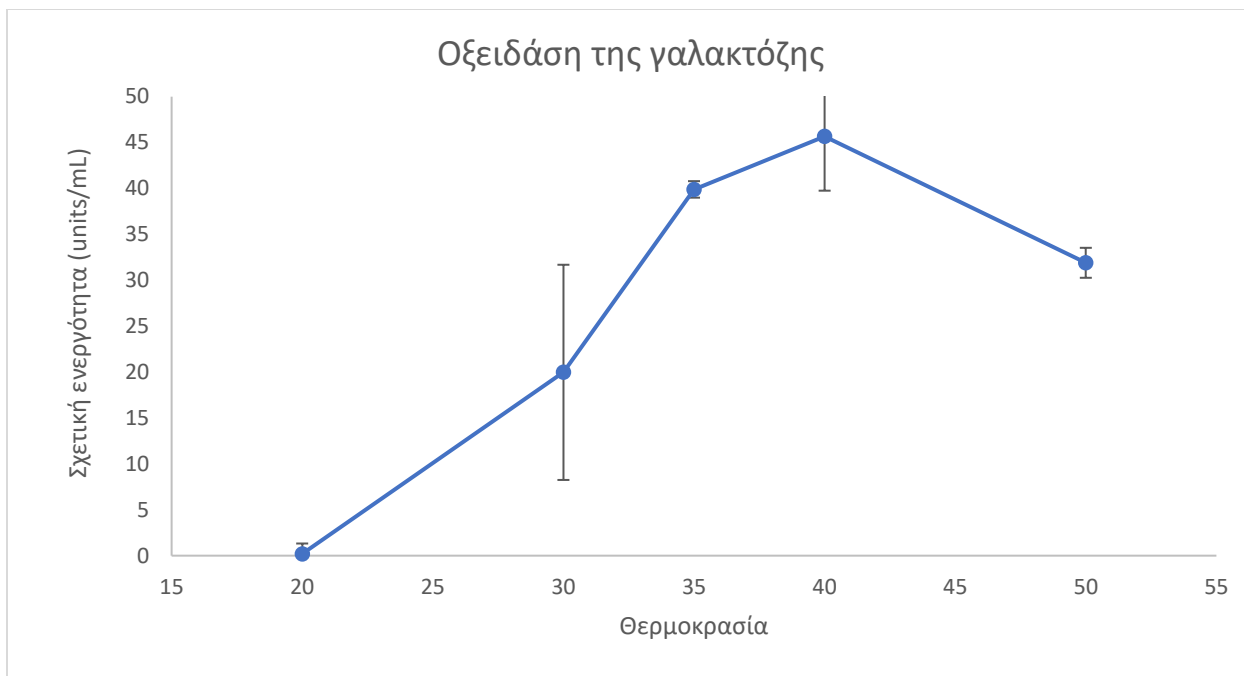
Εικόνα 27: Πηκτή πολυακρυλαμιδίου στην οποία διακρίνονται τα πρωτεϊνικά διαλύματα (αριστερά) τα οποία αντιστοιχούν με τη σειρά *crude*, *flowthrough*, *wash*, *μυδαζόλιο 5mM*, *πρότυπη ένωση* και *πρωτεϊνικό διάλυμα ενζύμου* και η αντιστοίχιση των μοριακών βαρών με βάση *πρότυπη ένωση* (δεξιά).

Από την εικόνα 26 προσδιορίστηκε το μοριακό βάρος του ενζύμων με βάση την αντιστοίχιση των χρωματισμένων ζωνών με τα μοριακά βάρη στην πρότυπη ένωση, με αποτέλεσμα να επιβεβαιωθεί το μοριακό βάρος 68 kDa.

Οι μπάντες που εμφανίστηκαν δεν είναι καθαρές και εμφανίζουν διάχυση στο gel, αυτό είναι αποτέλεσμα της γλυκοζιλίωσης λόγω του ότι εκφράζεται το γονίδιο ετερόλογα.

### 5.3.3 Προσδιορισμός της βέλτιστης θερμοκρασίας δράσης της οξειδάσης της γαλακτόζης

Ο προσδιορισμός της βέλτιστης θερμοκρασίας δράσης της οξειδάσης της γαλακτόζης γίνεται με τη βοήθεια διαγραμμάτων, όπου στον άξονα x παρουσιάζεται το εύρος των θερμοκρασιών που μελετήθηκαν και στον άξονα y η σχετική ενεργότητα του ενζύμου. Για την δημιουργία αυτού του διαγράμματος ακολουθήθηκε η διαδικασία που περιεγράφηκε στην παράγραφο 4.12 Εύρεση βέλτιστων συνθηκών δράσης του απομονωμένου ενζύμου της οξειδάσης της γαλακτόζης. Οι συνθήκες της αντίδρασης ήταν ρυθμιστικό διάλυμα φωσφορικών καλίου (Potassium phosphate buffer) pH= 7,5 και χρόνο αντίδρασης 15 min.



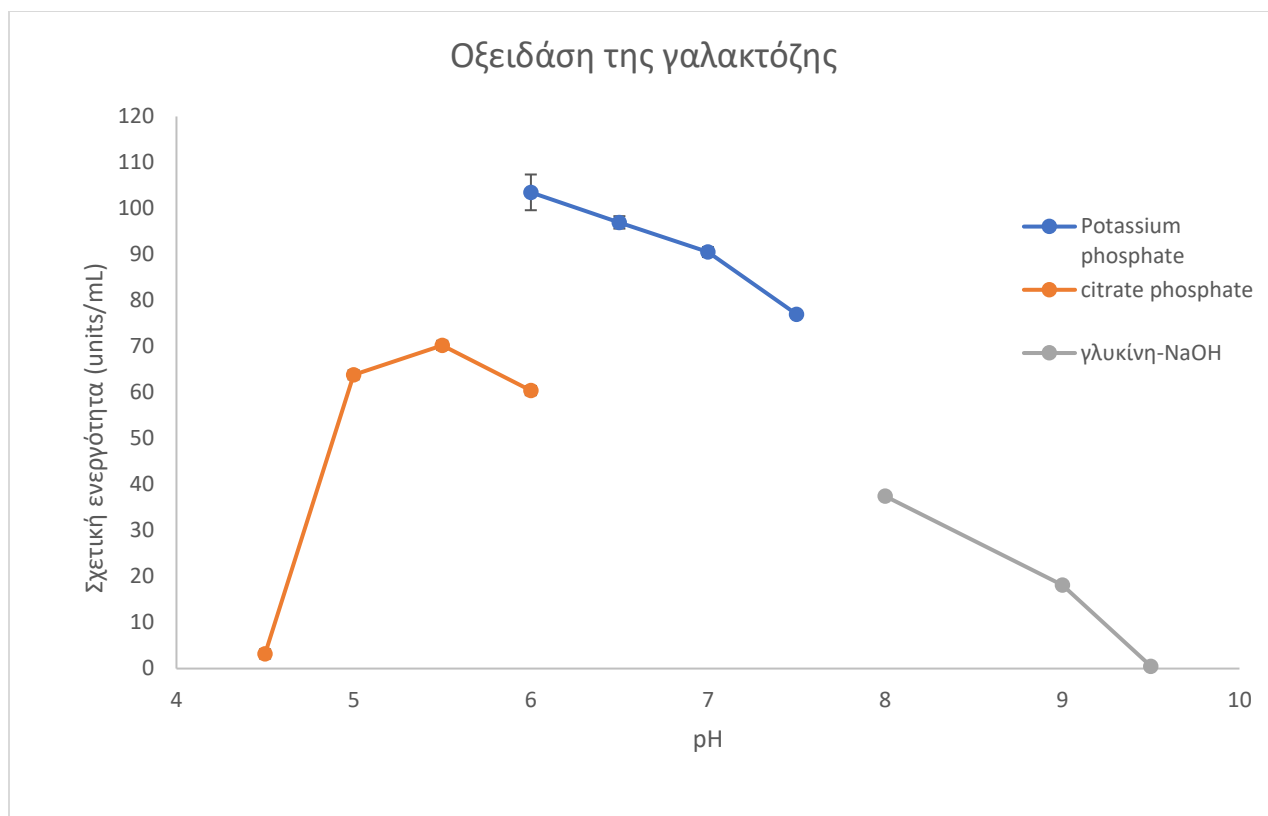
Διάγραμμα 12: Σχετική ενεργότητα συναρτήσει της θερμοκρασίας της αντίδρασης για την οξειδάση της γαλακτόζης

Με βάση το διάγραμμα 12, προκύπτει ότι η βέλτιστη θερμοκρασία δράσης του ενζύμου είναι 40 °C, με 0,913 Units. Η αμέσως καλύτερη τιμή ενεργότητας είναι για 35 °C, με 0,8 Units. Για χαμηλές θερμοκρασίες έχει χάσει πλήρως την ενεργότητα του, για 20°C η σχετική ενεργότητα του ενζύμου είναι 0,2. Ακόμη, το ένζυμο εμφανίζει μειωμένη ενεργότητα περίπου στο 87% και 28% της μέγιστης σε τιμές 10 °C κάτω και αντίστοιχα πάνω από τη θερμοκρασία που εμφανίζεται η βέλτιστη δράση.

#### 5.3.4 Προσδιορισμός του βέλτιστου pH της οξειδάσης της γαλακτόζης

Ο προσδιορισμός του βέλτιστου pH δράσης της οξειδάσης της γαλακτόζης γίνεται με τη βοήθεια διαγραμμάτων, όπου στον άξονα x παρουσιάζεται το εύρος των pH που μελετήθηκαν και στον άξονα y η σχετική ενεργότητα του ενζύμου. Για την δημιουργία αυτού του διαγράμματος ακολουθήθηκε η διαδικασία που περιεγράφηκε στην παράγραφο 4.12 'Εύρεση βέλτιστων συνθηκών δράσης του απομονωμένου ενζύμου της οξειδάσης της γαλακτόζης'. Οι συνθήκες της αντίδρασης ήταν ρυθμιστικό διάλυμα φωσφορικών καλίου (Potassium phosphate buffer) και χρόνο αντίδρασης 15 min.



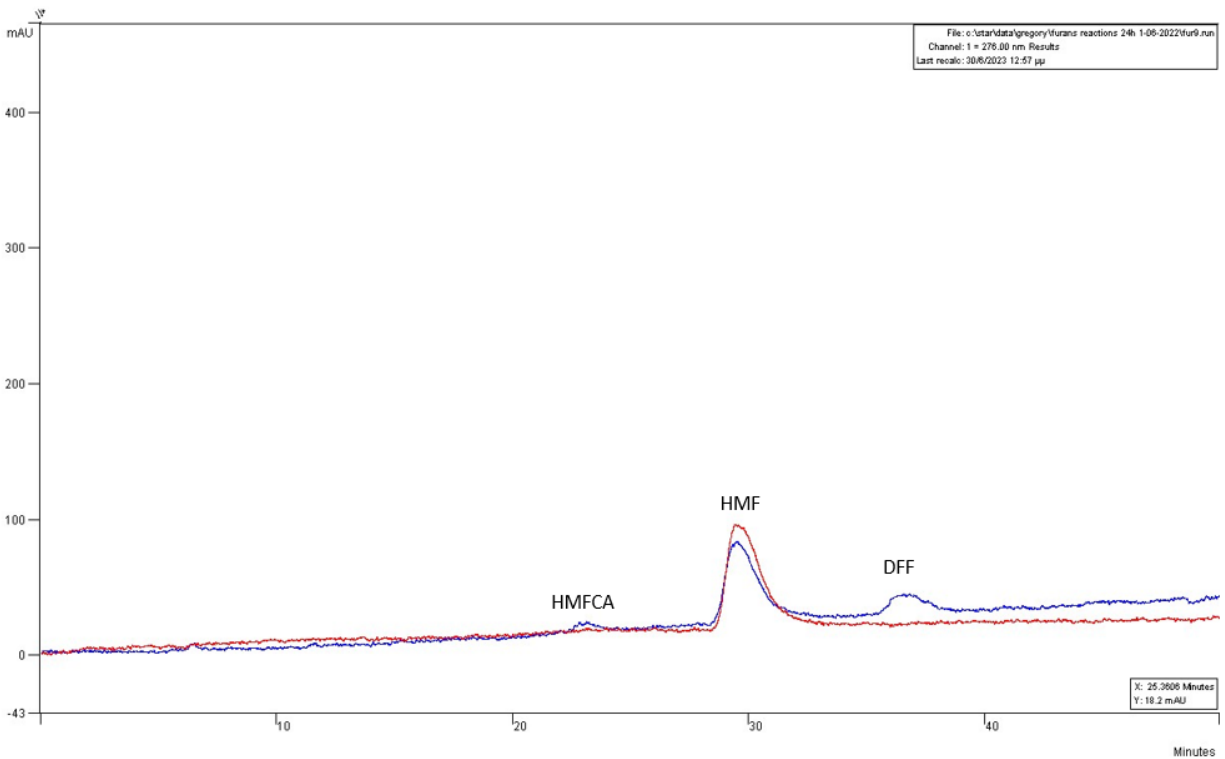


Διάγραμμα 13: Σχετική ενεργότητα συναρτήσει του pH της αντίδρασης για την οξειδάση της γαλακτόζης

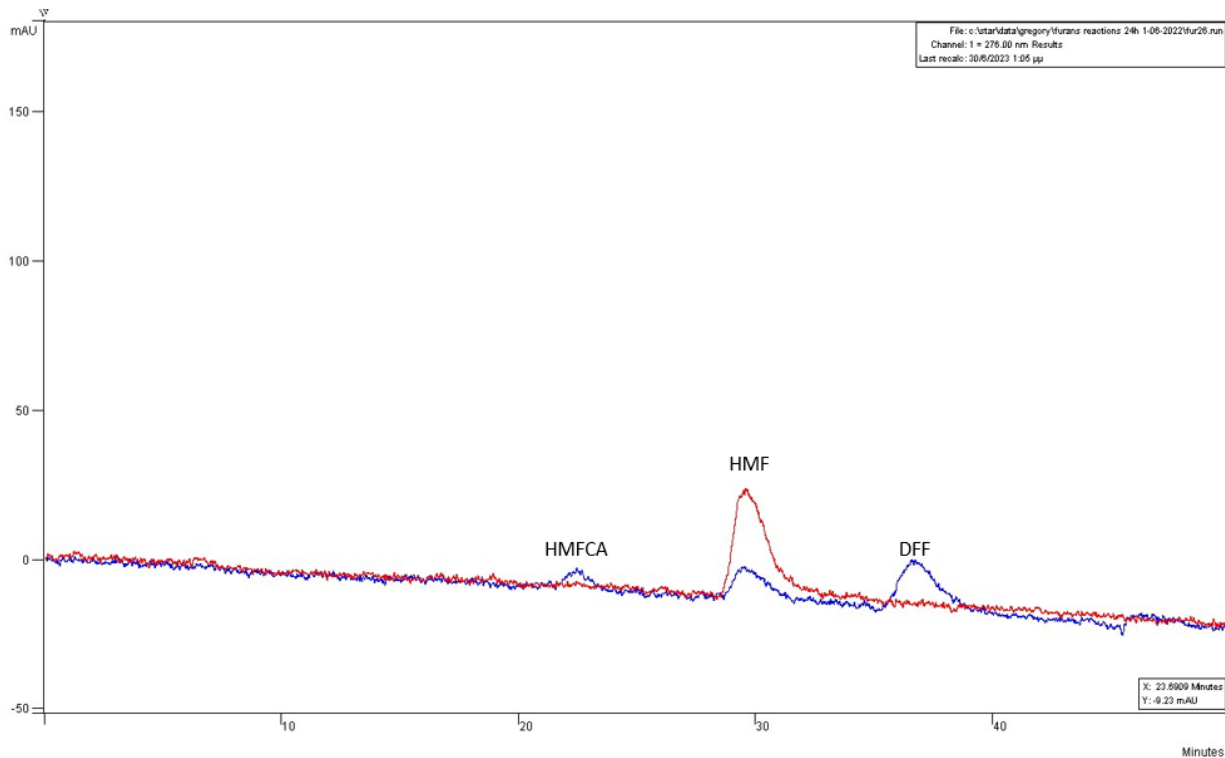
Με βάση το διάγραμμα 13, η οξειδάση της γαλακτόζης εμφάνισε βέλτιστο pH δράσης στην τιμή 6,0 και σε διάλυμα φωσφορικών καλίου. Για τιμές pH μικρότερες από 4,5 και μεγαλύτερες από 9,0 δεν εμφάνισε ενεργότητα. Τέλος, το ένζυμο φαίνεται να έχει σημαντική προτίμηση σε διάλυμα φωσφορικών-καλίου ιόντων έναντι κιτρικών-φωσφορικών ιόντων καθώς για την ίδια τιμή pH (pH=6,0) στο μεν πρώτο εμφάνισε 2,1 Units και ενεργότητα 103,5 units/mL, ενώ στο δεύτερο 1,2 Units και 60,4 units/mL. Για τιμές pH 8 και μεγαλύτερες σε διάλυμα γλυκίνης-καυστικού νατρίου εμφάνισε μειωμένη ενεργότητα, συγκεκριμένα για την βέλτιστη τιμή αυτού του ρυθμιστικού διαλύματος για pH=8 η ενεργότητα αντιστοιχεί στο 32 % της βέλτιστης.

### 5.3.5 Αντιδράσεις της οξειδάσης της γαλακτόζης με φουράνια

Ακόμη, πραγματοποιήθηκαν οι αντιδράσεις της οξειδάσης της γαλακτόζης με το HMF αλλά και άλλα φουράνια, όπως DFF, HMFCA, FFCA και FDCA. Στην αντίδραση προστέθηκε υπεροξειδάσης του χρένου (HRP), με στόχο να απομακρύνει το υπεροξείδιο του υδρογόνου  $H_2O_2$  από το σύστημα της αντίδρασης, το οποίο θα είχε σαν αποτέλεσμα τη μετατόπιση της ισορροπίας της αντίδρασης προς τα προϊόντα. Οι αντιδράσεις πραγματοποιήθηκαν σε pH=6,0 και T= 40 °C σε ρυθμιστικό διάλυμα φωσφορικών καλίου. Τα αποτελέσματα αυτών των αντιδράσεων φαίνονται στον παρακάτω πίνακα.



Διάγραμμα 14: Διάγραμμα από την υγρή χρωματογραφία με το τυφλό δείγμα (κόκκινο χρώμα) και με την αντίδραση του ενζύμου με υπόστρωμα το HMF (μπλε χρώμα)



Διάγραμμα 15: Διάγραμμα από την υγρή χρωματογραφία με το τυφλό δείγμα (κόκκινο χρώμα) και με την αντίδραση του ενζύμου με υπόστρωμα το HMF και την προσθήκη HRP(μπλε χρώμα)

Προέκυψε το συμπέρασμα ότι η οξειδάση της γαλακτόζης μπορεί να οξειδώσει τα φουράνια. Συγκεκριμένα, εμφάνισε ενεργότητα στο HMF , οξειδώνοντας το με παραγωγή HMFCΑ και DFF. Αφού από τα 0,44 mM HMF παράχθηκαν 0,08 mM DFF και 0,02 mM HMFCΑ. Με την προσθήκη του HRP, από τα 0,21 mM HMF παράχθηκαν 0,10 mM DFF και 0,02 mM HMFCΑ. Στο HMFCΑ, FFCA και DFF δεν εμφάνισε οξειδωτική δράση. Η απόδοση της οξείδωσης το HMF σε DFF είναι στη αρχική αντίδραση 18%, ενώ φαίνεται να βελτιώνεται με την προσθήκη του HRP στο 49%. Αντίστοιχα, βελτίωσε την οξείδωση του HMF προς το HMFCΑ, από 5% σε 10% μετατροπή. Ωστόσο, η απουσία επαναληψιμότητας των αποτελεσμάτων αυτών, απέτρεψε την εύρεση του μηχανισμού δράσης του ενζύμου της οξειδάσης της γαλακτόζης στα φουράνια. Αυτό, είναι εν μέρει κατανοητό, αφού η εισαγωγή δύο διαφορετικών ενζύμων σε ένα σύστημα αντιδράσεων όπου όλες οι 4 ουσίες αποτελούν ταυτόχρονα αντιδρώντα και προϊόντα, οδηγεί σε περίπλοκους συνδυασμούς δράσης, οι οποίοι δεν ήταν δυνατό να αποσαφηνιστούν στα πλαίσια της παρούσας διπλωματικής.

## 6. Συμπεράσματα

Συνοψίζοντας όλα τα παραπάνω, στο πρώτο μέρος της παρούσας διπλωματικής εργασίας μελετήθηκε η προκατεργασία στελεχών αραβοσίτου με τη χρήση μικροκυμάτων σε θερμοκρασία 150°C, και προκατεργασία παραδοσιακής θέρμανσης με αντιστάσεις, που θεωρείται ο παραδοσιακός τρόπος, σε θερμοκρασίες 150 και 160 °C, με διαλύτη νερό-ακετόνη σε αναλογία 50:50 με διαφορετικό χρόνο προκατεργασίας. Η υψηλότερη απόδοση σε γλυκόζη στις 24 h, 28,9 g/L, επιτυγχάνεται στην προκατεργασία με αντιστάσεις στους 160 °C και για χρόνο προκατεργασίας 45 min. Το ίδιο υλικό εμφανίζει επίσης την υψηλότερη απόδοση σε γλυκόζη στις 72 h, 34,6 g/L. Οι χαμηλές τελικές συγκεντρώσεις γλυκόζης, μέχρι 21,7 g/L στις 72 h, που προέκυψαν με τη προκατεργασία με μικροκύματα οφείλονται στην αδυναμία ανάπτυξης θερμοκρασιών μεγαλύτερων από 150 °C. Επίσης, παρατηρήθηκε ότι με την αύξηση του χρόνου της προκατεργασίας μικροκυμάτων αυξάνεται η απόδοση στη γλυκόζη, αφού η βέλτιστη τιμή, 21,7 g/L στις 72 h, επιτυγχάνεται με προκατεργασία για 120 min. Τέλος, φαίνεται ότι τα στελέχη αραβοσίτου αποτελούν μια πηγή βιομάζας, η οποία απαιτεί σκληρότερες συνθήκες προκατεργασίας άνω των 150 °C δεδομένης της ραγδαίας αύξησης της συγκέντρωσης της γλυκόζης στη θερμοκρασία προκατεργασίας 160 °C.

Στη συνέχεια, στην παρούσα εργασία επιχειρήθηκε η προκατεργασία στελεχών αραβοσίτου με αντιστάσεις και μικροκύματα σε διαφορετικούς χρόνους προκατεργασίας και χρόνο προ-επώασης, σε μια προσπάθεια βελτίωσης της προκατεργασίας χωρίς την αύξηση της θερμοκρασίας προστέθηκε στους διαλύτες οξικό οξύ σε διαφορετικές συγκεντρώσεις. Η προκατεργασία με αντιστάσεις και με την συγκέντρωση οξικού οξέος 1,5 % και με χρονική διάρκεια 90 min αποδείχθηκε η καλύτερη, με απόδοση σε γλυκόζη 18,7 g/L. Η καλύτερη απόδοση σε γλυκόζη, 16,8 g/L, για τις προκατεργασίες με μικροκύματα επιτυγχάνεται με συγκέντρωση οξικού οξέος 2 %, χρόνο προκατεργασίας 90 min και προ-επώασης 10 min. Ακόμη, η προσθήκη χρόνου προ-επώασης δεν επηρέασε το αποτέλεσμα της προκατεργασίας, συγκρίνοντας τις προκατεργασίες των υλικών 7 και 5, όπου το πρώτο είχε προ-επώαση ενώ το δεύτερο όχι, καλύτερη απόδοση σε γλυκόζη κατά 1.2 % είχε το υλικό 5. Το γεγονός αυτό οδηγεί στο συμπέρασμα ότι η κατανομή της θερμοκρασίας στο σύστημα των μικροκυμάτων είναι ομοιόμορφη από την εκκίνηση της διεργασίας, παρά την απουσία ανάδευσης σε αντίθεση με το αυτόκαυστο όπου το σύστημα βρίσκεται υπό συνεχή ανάδευση. Επιπλέον από τα δεδομένα αυτών των προκατεργασιών προέκυψε ότι οι δύο διαφορετικές μέθοδοι προκατεργασίας είναι συγκρίσιμες είτε με την παρουσία οξικού οξέος σαν καταλύτη είτε όχι. Η προσθήκη οξικού οξέος φαίνεται να βελτίωσε κατά κανόνα την προκατεργασία, αφού στις ίδιες συνθήκες η απελευθέρωση γλυκόζης ήταν μεγαλύτερη.

Επιπλέον 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 (95,1% και 87,5%, αντίστοιχα) με παραγωγή 70,5 και 66 g φρουκτόζης ανά 100 g προκατεργασμένης βιομάζας, αντίστοιχα. Ακόμα, η προκατεργασία στην υψηλή θερμοκρασία των 175°C για 120 min με χρήση ισοβουτανόλης σε υλικά από πεύκο, επέφερε και αυτή υψηλή μετατροπή κυτταρίνης σε γλυκόζη (73,1%) και παραγωγή 53,4 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. Επίσης, παρατηρήθηκε ότι η οξιά είναι επιδεκτικότερος τύπος βιομάζας σε υδρολύσεις συγκριτικά με το πεύκο, το οποίο γενικά παρουσιάζει χαμηλότερες μετατροπές κυτταρίνης σε γλυκόζη. Όσον αφορά την χρήση καταλυτών, ο καταλύτης  $Fe_3MO_{12}OP$ , εμφάνισε τις υψηλότερες μετατροπές ανάμεσα στους καταλύτες, κυτταρίνης σε γλυκόζη 80.3% με χρήση ακετόνης και 81.0% με χρήση ισοβουτανόλης ως διαλύτη. Φαίνεται η παρουσία του σιδήρου να βελτιώνει την απόδοση της προκατεργασίας. Με χρήση του καταλύτη  $Cu_3MO_{12}OP$  η παραγωγή φρουκτόζης έφτασε μέχρι 46,9 g φρουκτόζης ανά 100 g προκατεργασμένης βιομάζας. Ο καταλύτης POM αποδείχτηκε λιγότερο αποδοτικός συγκριτικά με τους υπόλοιπους. Συνοπτικά, η θετική επίδραση του καταλύτη  $Fe_3MO_{12}OP$  συγκριτικά με τους άλλους δύο, ενδεχομένως να οφείλεται στην ενίσχυση της δράσης των ενζύμων, αφού κανονικά οι αποδόσεις της ακινητοποιημένης ισομεράσης της γλυκόζης κυμαίνονται στα ίδια επίπεδα αποδόσεων 70-80%.

Συνολικά, τα αποτελέσματα από την ήπια οξειδωτική προκατεργασία λιγνινοκυτταρινούχων υλικών, κυρίως αυτά που προέρχονται από οξιά, με οργανικούς διαλύτες είναι εξαιρετικά ικανοποιητικά. Μετά το στάδιο της ενζυμικής υδρόλυσης, οι μετατροπές της κυτταρίνης σε γλυκόζη κυμαίνονται μεταξύ 53-95%. Αυτές οι τιμές είναι συγκρίσιμες, και σε κάποιες περιπτώσεις καλύτερες, με εκείνες που αναφέρονται σε άλλες επιστημονικές μελέτες που ασχολούνται με την προκατεργασία της βιομάζας με οργανικούς διαλύτες. Σύμφωνα με τους Zhang et al., η συνδυασμένη χρήση ενζυμικής προκατεργασίας με 80% αιθανόλη και καταλύτη  $H_2SO_4$  σε ένα μίγμα από μίσχανθο στους 150 με 170°C για 30 με 60 λεπτά οδήγησε σε 75% μετατροπή της κυτταρίνης σε γλυκόζη. Επίσης, σύμφωνα με τον Borand et al., με την προκατεργασία πεύκης με αναλογία νερού/αιθανόλης 60:40 και καταλύτη  $H_2SO_4$  στους 200 °C για 47 λεπτά επιτεύχθηκε 60% μετατροπή της κυτταρίνης σε γλυκόζη. Ενώ με τη χρήση ακετόνης (50:50) και καταλύτη  $H_2SO_4$  στους 195 °C για 40 λεπτά παρατηρήθηκε 71.8% μετατροπή της κυτταρίνης σε γλυκόζη. Η προκατεργασία με χρήση επίσης αιθανόλης (75:25) σε υλικό από ευκάλυπτο 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 (Borand & Karaosmanoğlu, 2018; Zhang et al., 2016).

Ακόμη, συγκριτικά με αποτελέσματα με άλλες μεθόδους προκατεργασίας που αναφέρονται βιβλιογραφικά η ήπια οξειδωτική προκατεργασία φαίνεται να είναι πιο αποδοτική. Για παράδειγμα, σύμφωνα με τον Kumar et al. η χημική προκατεργασία με θειικό οξύ για 90 min στους 121°C είχε ως αποτέλεσμα μόνο 23.9% μετατροπή κυτταρίνης σε γλυκόζη, ενώ στις ίδιες συνθήκες με καυστικό νάτριο NaOH μετατράπηκε 60.8% κυτταρίνη σε γλυκόζη. Κατά την προκατεργασία με H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> για 30 min στους 121 °C πραγματοποιήθηκε 49.8% μετατροπή κυτταρίνης σε γλυκόζη. Τέλος, σε έρευνα των Katsimpouras et al. σε προκατεργασία μέσω οξείδωσης με διαλύτες ακετόνη και νερό σε ξύλο οξιάς στους 175 °C για 2 h εφαρμόζοντας διάφορες αναλογίες ακετόνης και νερού πραγματοποιήθηκαν μετατροπές κυτταρίνης σε γλυκόζη μεταξύ των τιμών 46-69% (Katsimpouras et al., 2017; Kumar et al., 2009).

Όσον αφορά την ενζυμική ισομερείωση της γλυκόζης σε φρουκτόζη, στα υλικά οξιάς κυμαίνονταν από 21,2 με 70,5 g φρουκτόζης ανά 100 g προκατεργασμένης βιομάζας, στα υλικά πεύκου 17 με 53,4 g φρουκτόζης ανά 100 g προκατεργασμένης βιομάζας και στα υλικά που προκατεργάστηκαν με καταλύτες 22,7 με 47,4 g φρουκτόζης ανά 100 g προκατεργασμένης βιομάζας. Στην βιβλιογραφία αναφέρεται ότι το 53-60% της φρουκτόζης μπορεί να ληφθεί με την παρουσία ακινητοποιημένων ενζυματικών ισομερασών (Mosier et al., 2005).

Έπειτα, η οξειδάση της γαλακτόζης επιλέχθηκε να ελεγχθεί για ενεργότητα σε φουράνια. Το μετασηματισμένο στέλεχος *P. Pastoris* με το γονίδιο της οξειδάσης της γαλακτόζης αναπτύχθηκε σε στερεό και στη συνέχεια σε υγρό μέσο. Έγινε screening σε 17 αποικίες και αποδείχθηκε ότι 4 από τις 14 είχαν ενεργότητα σε γαλακτόζη. Στη συνέχεια, επιλέχθηκε εκείνη με την υψηλότερη ενεργότητα στη γαλακτόζη. Αφού πραγματοποιήθηκαν όλες οι διαδικασίες παραγωγής, παραλαβής και απομόνωσης του ενζύμου υπολογίστηκε η συνολική ποσότητα του ενζύμου, 651,9 mg από 1 L καλλιέργειας, με συγκέντρωση 0,65 mg/mL καλλιέργειας. Πιστοποιήθηκε ότι το ένζυμο που απομονώθηκε ήταν η οξειδάση της γαλακτόζης από το αποτέλεσμα της ηλεκτροφόρησης σε πηκτή πολυακρυλαμιδίου υπό αποδιατακτικές συνθήκες, καθώς και επιβεβαιώθηκε το μοριακό βάρος, 68 kDa. Στη βιβλιογραφία αναφέρεται ως μοριακό βάρος του ενζύμου 65–68 kDa (Parikka et al., 2010, 2015). Συγκεκριμένα, στην Εικόνα 26 παρουσιάζεται η πηκτή πολυακρυλαμιδίου στην οποία αναλύθηκαν τα πρωτεϊνικά δείγματα. Από εκεί προκύπτει το συμπέρασμα ότι το μελετώμενο ένζυμο βρίσκεται σε πολύ καθαρή μορφή στο διάλυμα, εφόσον εμφανίζεται μόνο μία μπλε γραμμή (μπάντα) στην πηκτή. Αυτό οδηγεί στο συμπέρασμα ότι από το ενζυμικό διάλυμα έχει απομονωθεί αποτελεσματικά αποκλειστικά η οξειδάση της γαλακτόζης. Η ανυπαρξία μπλε γραμμών (μπαντών) σε μικρότερα μοριακά βάρη πάνω στην πηκτή πολυακρυλαμιδίου οδηγεί στο συμπέρασμα ότι το ένζυμο βρίσκεται στη φυσιολογική κατάσταση χωρίς να υπάρχουν ενδείξεις αποικοδόμησης. Ακολούθως, πραγματοποιήθηκε ο προσδιορισμός της βέλτιστης θερμοκρασίας και pH δράσης του ενζύμου χρησιμοποιώντας ως υπόστρωμα τη γαλακτόζη 50 mM και με φωτομέτρηση στα 610 nm. Συγκεκριμένα, το ένζυμο οξειδάση της γαλακτόζης εμφάνισε βέλτιστη δράση σε pH=6,0 και T=

40 °C σε ρυθμιστικό διάλυμα φωσφορικών καλίου (Potassium phosphate buffer). Από βιβλιογραφική αναζήτηση βρέθηκε ότι το βέλτιστο pH είναι 6,5 (Sharma et al., 2006). Σε μία έρευνα των Cao et al. όπου χρησιμοποιήθηκε ως υπόστρωμα η D-γαλακτόζη (90 mM) η βέλτιστη θερμοκρασία προσδιορίστηκε σε ρυθμιστικό διάλυμα φωσφορικών 20 mM για pH 7,0, ενώ δοκιμάστηκαν και άλλα ρυθμιστικά διαλύματα, συμπεριλαμβανομένου ρυθμιστικού κιτρικού νατρίου (20 mM, pH 3,0 έως 6,0), ρυθμιστικό διάλυμα φωσφορικών (20 mM, pH 6,0 έως 8,0), ρυθμιστικό διάλυμα Tris-HCl (20 mM, pH 8,0 έως 9,0) και ρυθμιστικό διάλυμα γλυκίνης-NaOH (20 mM, pH 9,0 έως 10,0). Επίσης βέλτιστη θερμοκρασία βρέθηκε η 40 °C (Cao et al., 2023). Ενώ σε έρευνα των Hamilton et al. προέκυψε ότι σε ρυθμιστικό διάλυμα φωσφορικών 0,10 M το βέλτιστο pH είναι 6 έως 7 (Hamilton et al., n.d.).

Τέλος, πραγματοποιήθηκαν οι αντιδράσεις της οξειδάση της γαλακτόζης με το HMF αλλά και άλλα φουράνια, όπως DFF, HMFCA, FFCA και FDCA. Στην αντίδραση προστέθηκε υπεροξειδάσης του χρένου HRP, με στόχο να απομακρύνει το υπεροξείδιο του υδρογόνου H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> από το σύστημα της αντίδρασης. Οι αντιδράσεις πραγματοποιήθηκαν σε δράση σε pH=6,0 και T= 40 °C σε ρυθμιστικό διάλυμα φωσφορικών καλίου. Προέκυψε το συμπέρασμα ότι η οξειδάση της γαλακτόζης μπορεί να οξειδώσει τα φουράνια. Συγκεκριμένα εμφάνισε ενεργότητα στο HMF , οξειδώνοντας το με παραγωγή HMFCA και DFF. Στο HMFCA, FFCA και DFF δεν εμφάνισε οξειδωτική δράση. Ακόμη, η προσθήκη του HRP στην αντίδραση βελτιώνει μόνο την απόδοση της οξείδωσης το HMF σε DFF, από 16% στη αρχική αντίδραση και στο 58%, και της οξείδωσης του σε HMFCA, από 4% σε 18%. Βέβαια, αυτά τα αποτελέσματα δεν ήταν επαναλήψιμα καθώς είναι ένα πολύπλοκο σύστημα , με δυο ένζυμα και τέσσερα υποστρώματα.

## 7. Μελλοντικές προτάσεις

Η προκατεργασία στελεχών αραβοσίτου με μικροκύματα σε διαφορετικούς χρόνους προκατεργασίας και χρόνο προ-επάασης, και προσθήκη οξικού οξέος σε διαφορετικές συγκεντρώσεις, που εξετάστηκαν σε αυτή τη διπλωματική 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, μεγαλύτερων θερμοκρασιών και μεγαλύτερου χρόνου προκατεργασίας, προκειμένου να αντιμετωπιστούν οι δυσκολίες παρουσιάζονται στη διαχείριση αυτής της μεθόδου προκατεργασίας με μικροκυμάτων, θα μπορέσουν να αξιοποιηθούν τα οφέλη της για την προκατεργασία της λιγνινοκυτταρινούχου βιομάζας.

Επίσης, η ήπια οξειδωτική προκατεργασία της λιγνινοκυτταρινούχου βιομάζας με τη χρήση οργανικών διαλυτών που εφαρμόστηκε στην παρούσα εργασία παρουσιάζει πολλά πλεονεκτήματα με κυριότερο ότι διαχωρίζει αποτελεσματικά τα βασικά συστατικά της βιομάζας, παράγοντας υψηλής καθαρότητας κυτταρίνη και λιγνίνη. Καθώς και έχει υψηλή απόδοση σε μετατροπή κυτταρίνης σε γλυκόζη, αλλά και γλυκόζης σε φρουκτόζη. Επιπλέον, είναι φιλικότερη προς το περιβάλλον διεργασία από άλλες χημικές μεθόδους προκατεργασίας. Θα μπορούσε όμως να πραγματοποιείται ανάκτηση των διαλυτών, οι οποίοι χρησιμοποιούνται σε μεγάλη ποσότητα, για να καταστεί ακόμα πιο πράσινη και οικονομικά συμφέρουσα. Ακόμη, 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, με στόχο την παραγωγή χημικών προϊόντων βιολογικής προέλευσης. Τέλος για ένα μελλοντικό βιοδιυλιστήριο παραγωγής φουρανίων, τα παραπροϊόντα που σχηματίζονται κατά την προκατεργασία, όπως το HMF και η φουρφουράλη δεν πρέπει να θεωρούνται ανεπιθύμητα προϊόντα, αφού μπορούν να αξιοποιηθούν με την οξείδωση τους αυξάνοντας έτσι την παραγωγή του προϊόντος FDCA και FCA.

Ακόμη, για την οξείδωση του HMF αλλά και άλλων φουρανίων, όπως DFF, HMFCA, FFCA και FDCA, με την οξειδάση της γαλακτόζης με την προσθήκη υπεροξειδάσης του χρένου HRP, αλλά και καταλάσης, δεν ήταν εφικτό να επαναληφθούν τα αποτελέσματα καθώς είναι ένα πολύπλοκο σύστημα, με τρία ένζυμα και τέσσερα υποστρώματα. Άρα δεν ήταν δυνατό και να εξακριβωθεί ο μηχανισμός της αντίδρασης, και είναι υπό εξέταση.

Συνολικά, η παραγωγή δομικών χημικών ενώσεων (platform chemicals) από την αξιοποίηση της λιγνινοκυτταρινούχου βιομάζας με τη χρήση βιοκαταλυτικών μεθόδων, και συγκεκριμένα ενζύμων και εκμετάλλευση όλων των ρευμάτων της διεργασίας, μπορεί να αποτελέσει μια ολοκληρωμένη «πράσινη» τεχνολογία εφαρμόσιμη βιομηχανικά στο εγγύς μέλλον, η οποία θα λύσει τα προβλήματα που δημιουργούνται με τις παραδοσιακές μεθόδους, για παράδειγμα την παραγωγή πολυμερών.



## 7. Βιβλιογραφία

- Agrawal, R., Verma, A., Singhanian, R. R., Varjani, S., Di Dong, C., & Kumar Patel, A. (2021). Current understanding of the inhibition factors and their mechanism of action for the lignocellulosic biomass hydrolysis. In *Bioresource Technology* (Vol. 332). Elsevier Ltd. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2021.125042>
- 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. <https://doi.org/10.1016/J.BIORTECH.2009.11.093>
- Antonetti, C., Melloni, M., Licursi, D., Fulignati, S., Ribechini, E., Rivas, S., Parajó, J. C., Cavani, F., & Raspolli Galletti, A. M. (2017). Microwave-assisted dehydration of fructose and inulin to HMF catalyzed by niobium and zirconium phosphate catalysts. *Applied Catalysis B: Environmental*, *206*, 364–377. <https://doi.org/10.1016/j.apcatb.2017.01.056>
- Banerjee, R., Hks, K., & Banerjee, M. (2012). Medicinal significance of furan derivatives: A Review. In *Int. J. Rev. Life. Sci* (Vol. 2, Issue 1). [www.ijrsl.pharmascope.org](http://www.ijrsl.pharmascope.org)
- Bruce Alberts, Alexander Johnson, Julian Lewis, Martin Raff, Keith Roberts, & Peter Walter. (2002). *Molecular Biology of the Cell* (4th edition).
- Cao, N., Xia, G., Sun, H., Zhao, L., Cao, R., Jiang, H., Mao, X., & Liu, Q. (2023). Characterization of a Galactose Oxidase from *Fusarium odoratissimum* and Its Application in the Modification of Agarose. *Foods*, *12*(3). <https://doi.org/10.3390/foods12030603>
- Carlos Morales-Huerta, J., Martínez De Ilarduya, A., & Muñoz-Guerra, S. (2016). Poly(alkylene 2,5-furandicarboxylate)s (PEF and PBF) by ring opening polymerization. *Polymer*, *87*, 148–158. <https://doi.org/10.1016/J.POLYMER.2016.02.003>
- Da Silva, A. S. A., Inoue, H., Endo, T., Yano, S., & Bon, E. P. S. (2010). Milling pretreatment of sugarcane bagasse and straw for enzymatic hydrolysis and ethanol fermentation. *Bioresource Technology*, *101*(19), 7402–7409. <https://doi.org/10.1016/J.BIORTECH.2010.05.008>
- de Bhowmick, G., Sarmah, A. K., & Sen, R. (2018). Lignocellulosic biorefinery as a model for sustainable development of biofuels and value added products. In *Bioresource Technology* (Vol. 247, pp. 1144–1154). Elsevier Ltd. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2017.09.163>
- 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). <https://doi.org/10.1186/s13068-021-02022-9>
- Dedes, G., Karnaouri, A., & Topakas, E. (2020). Novel routes in transformation of lignocellulosic biomass to furan platform chemicals: From pretreatment to enzyme catalysis. In *Catalysts* (Vol. 10, Issue 7, pp. 1–25). MDPI. <https://doi.org/10.3390/catal10070743>
- Delidovich, I., & Palkovits, R. (2016). Fructose production: Via extraction-assisted isomerization of glucose catalyzed by phosphates. *Green Chemistry*, *18*(21), 5822–5830. <https://doi.org/10.1039/c6gc01712f>

- Deng, W., Feng, Y., Fu, J., Guo, H., Guo, Y., Han, B., Jiang, Z., Kong, L., Li, C., Liu, H., Nguyen, P. T. T., Ren, P., Wang, F., Wang, S., Wang, Y., Wang, Y., Wong, S. S., Yan, K., Yan, N., ... Zhou, H. (2023). Catalytic conversion of lignocellulosic biomass into chemicals and fuels. In *Green Energy and Environment* (Vol. 8, Issue 1, pp. 10–114). KeAi Publishing Communications Ltd. <https://doi.org/10.1016/j.gee.2022.07.003>
- Dijkman, W. P., Groothuis, D. E., & Fraaije, M. W. (2014a). Enzyme-Catalyzed Oxidation of 5-Hydroxymethylfurfural to Furan-2,5-dicarboxylic Acid. *Angewandte Chemie International Edition*, 53(25), 6515–6518. <https://doi.org/10.1002/ANIE.201402904>
- Dijkman, W. P., Groothuis, D. E., & Fraaije, M. W. (2014b). Enzyme-catalyzed oxidation of 5-hydroxymethylfurfural to furan-2,5-dicarboxylic acid. *Angewandte Chemie (International Ed. in English)*, 53(25), 6515–6518. <https://doi.org/10.1002/ANIE.201402904>
- Escobar, J. C., Lora, E. S., Venturini, O. J., Yáñez, E. E., Castillo, E. F., & Almazan, O. (2009). Biofuels: Environment, technology and food security. In *Renewable and Sustainable Energy Reviews* (Vol. 13, Issues 6–7, pp. 1275–1287). <https://doi.org/10.1016/j.rser.2008.08.014>
- Ethaib, S., Omar, R., Kamal, S. M. M., & Biak, D. R. A. (2014). MICROWAVE-ASSISTED PRETREATMENT OF LIGNOCELLULOSIC BIOMASS: A REVIEW. In *Journal of Engineering Science and Technology Special Issue on SOMCHE*.
- Hamilton, G. A., Adolf, P. K., De Jersey, J., Dubois, G. C., Dyrkacz, G. R., & Libby, R. D. (n.d.). *Hamilton et al. / Cu(III), Superoxide, and Galactose Oxidase Trivalent Copper, Superoxide, and Galactose Oxidase1*. <https://pubs.acs.org/sharingguidelines>
- Hassan, S. S., Williams, G. A., & Jaiswal, A. K. (2018). Emerging technologies for the pretreatment of lignocellulosic biomass. In *Bioresource Technology* (Vol. 262, pp. 310–318). Elsevier Ltd. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2018.04.099>
- 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. <https://doi.org/10.1039/b921306f>
- 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. In *Chemical Engineering Journal* (Vol. 390). Elsevier B.V. <https://doi.org/10.1016/j.cej.2020.124636>
- Kim, H., Lee, S., Ahn, Y., Lee, J., & Won, W. (2020). Sustainable Production of Bioplastics from Lignocellulosic Biomass: Technoeconomic Analysis and Life-Cycle Assessment. *ACS Sustainable Chemistry and Engineering*, 8(33), 12419–12429. <https://doi.org/10.1021/acssuschemeng.0c02872>
- Kitchaiya, P., Intanakul, P., & Krairiksh, M. (2003). Enhancement of enzymatic hydrolysis of lignocellulosic wastes by microwave pretreatment under atmospheric pressure. *Journal of Wood Chemistry and Technology*, 23(2), 217–225. <https://doi.org/10.1081/WCT-120021926>
- Kottke, R. H. (2000). Furan Derivatives. *Kirk-Othmer Encyclopedia of Chemical Technology*. <https://doi.org/10.1002/0471238961.0621180111152020.A01>

- Kumar, P., Barrett, D. M., Delwiche, M. J., & Stroeve, P. (2009). Methods for pretreatment of lignocellulosic biomass for efficient hydrolysis and biofuel production. In *Industrial and Engineering Chemistry Research* (Vol. 48, Issue 8, pp. 3713–3729). <https://doi.org/10.1021/ie801542g>
- Lalanne, L., Nyanhongo, G. S., Guebitz, G. M., & Pellis, A. (2021). Biotechnological production and high potential of furan-based renewable monomers and polymers. In *Biotechnology Advances* (Vol. 48). Elsevier Inc. <https://doi.org/10.1016/j.biotechadv.2021.107707>
- Lavarack, B. P., Griin, G. J., & Rodman, D. (2002). The acid hydrolysis of sugarcane bagasse hemicellulose to produce xylose, arabinose, glucose and other products. In *Biomass and Bioenergy* (Vol. 23).
- Lenihan, P., Orozco, A., O'Neill, E., Ahmad, M. N. M., Rooney, D. W., & Walker, G. M. (2010). Dilute acid hydrolysis of lignocellulosic biomass. *Chemical Engineering Journal*, 156(2), 395–403. <https://doi.org/10.1016/j.cej.2009.10.061>
- Li, X., Shi, Y., Kong, W., Wei, J., Song, W., & Wang, S. (2022). Improving enzymatic hydrolysis of lignocellulosic biomass by bio-coordinated physicochemical pretreatment—A review. In *Energy Reports* (Vol. 8, pp. 696–709). Elsevier Ltd. <https://doi.org/10.1016/j.egy.2021.12.015>
- Limayem, A., & Ricke, S. C. (2012). Lignocellulosic biomass for bioethanol production: Current perspectives, potential issues and future prospects. In *Progress in Energy and Combustion Science* (Vol. 38, Issue 4, pp. 449–467). Elsevier Ltd. <https://doi.org/10.1016/j.pecs.2012.03.002>
- 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. <https://doi.org/10.1021/cs501197w>
- Maitan-Alfenas, G. P., Visser, E. M., & Guimarães, V. ria M. (2015). Enzymatic hydrolysis of lignocellulosic biomass: Converting food waste in valuable products. In *Current Opinion in Food Science* (Vol. 1, Issue 1, pp. 44–49). Elsevier Ltd. <https://doi.org/10.1016/j.cofs.2014.10.001>
- 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. <https://doi.org/10.1039/c5gc00707k>
- Medronho, B., & Lindman, B. (2015). Brief overview on cellulose dissolution/regeneration interactions and mechanisms. *Advances in Colloid and Interface Science*, 222, 502–508. <https://doi.org/10.1016/J.CIS.2014.05.004>
- Moreau, C., Durand, R., Roux, A., & Tichit, D. (2000). Isomerization of glucose into fructose in the presence of cation-exchanged zeolites and hydrotalcites. In *Applied Catalysis A: General* (Vol. 193).
- Mosier, N., Wyman, C., Dale, B., Elander, R., Lee, Y. Y., Holtzapple, M., & Ladisch, M. (2005). Features of promising technologies for pretreatment of lignocellulosic biomass. *Bioresource Technology*, 96(6), 673–686. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2004.06.025>
- 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. <https://doi.org/10.1002/cssc.201200072>

- Pandey, S., Dumont, M. J., Orsat, V., & Rodrigue, D. (2021). Biobased 2,5-furandicarboxylic acid (FDCA) and its emerging copolyesters' properties for packaging applications. *European Polymer Journal*, *160*, 110778. <https://doi.org/10.1016/J.EURPOLYMJ.2021.110778>
- Parikka, K., Leppänen, A. S., Pitkänen, L., Reunanen, M., Willför, S., & Tenkanen, M. (2010). Oxidation of polysaccharides by galactose oxidase. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, *58*(1), 262–271. <https://doi.org/10.1021/jf902930t>
- Parikka, K., Master, E., & Tenkanen, M. (2015). Oxidation with galactose oxidase: Multifunctional enzymatic catalysis. In *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic* (Vol. 120). <https://doi.org/10.1016/j.molcatb.2015.06.006>
- Parveen, F., & Upadhyayula, S. (2017). Efficient conversion of glucose to HMF using organocatalysts with dual acidic and basic functionalities - A mechanistic and experimental study. *Fuel Processing Technology*, *162*, 30–36. <https://doi.org/10.1016/j.fuproc.2017.03.021>
- Puligundla, P., Oh, S. E., & Mok, C. (2016). Microwave-assisted pretreatment technologies for the conversion of lignocellulosic biomass to sugars and ethanol: A review. In *Carbon Letters* (Vol. 17, Issue 1, pp. 1–10). Korean Carbon Society. <https://doi.org/10.5714/CL.2016.17.1.001>
- Rajesh Banu, J., Preethi, Kavitha, S., Tyagi, V. K., Gunasekaran, M., Karthikeyan, O. P., & Kumar, G. (2021). Lignocellulosic biomass based biorefinery: A successful platform towards circular bioeconomy. *Fuel*, *302*. <https://doi.org/10.1016/j.fuel.2021.121086>
- 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. In *Bioengineered* (Vol. 11, Issue 1, pp. 19–38). Taylor and Francis Inc. <https://doi.org/10.1080/21655979.2019.1700093>
- 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. <https://doi.org/10.1007/s11244-008-9166-0>
- Saikia, K., Rathankumar, A. K., Kumar, P. S., Varjani, S., Nizar, M., Lenin, R., George, J., & Vaidyanathan, V. K. (2022). Recent advances in biotransformation of 5-Hydroxymethylfurfural: challenges and future aspects. In *Journal of Chemical Technology and Biotechnology* (Vol. 97, Issue 2, pp. 409–419). John Wiley and Sons Ltd. <https://doi.org/10.1002/jctb.6670>
- Saini, J. K., Saini, R., & Tewari, L. (2015). Lignocellulosic agriculture wastes as biomass feedstocks for second-generation bioethanol production: concepts and recent developments. In *3 Biotech* (Vol. 5, Issue 4, pp. 337–353). Springer Verlag. <https://doi.org/10.1007/s13205-014-0246-5>
- Shaikh, M., Singh, S. K., Khilari, S., Sahu, M., & Ranganath, K. V. S. (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. <https://doi.org/10.1016/j.catcom.2017.12.018>
- Sharma, S. K., Suman, Pundir, C. S., Sehgal, N., & Kumar, A. (2006). Galactose sensor based on galactose oxidase immobilized in polyvinyl formal. *Sensors and Actuators, B: Chemical*, *119*(1), 15–19. <https://doi.org/10.1016/j.snb.2005.11.046>

- Sindhu, R., Binod, P., & Pandey, A. (2016). Biological pretreatment of lignocellulosic biomass - An overview. In *Bioresource Technology* (Vol. 199, pp. 76–82). Elsevier Ltd. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2015.08.030>
- Sousa, A. F., Vilela, C., Fonseca, A. C., Matos, M., Freire, C. S. R., Gruter, G. J. M., Coelho, J. F. J., & Silvestre, A. J. D. (2015). Biobased polyesters and other polymers from 2,5-furandicarboxylic acid: A tribute to furan excellency. In *Polymer Chemistry* (Vol. 6, Issue 33, pp. 5961–5983). Royal Society of Chemistry. <https://doi.org/10.1039/c5py00686d>
- Taha, M., Foda, M., Shahsavari, E., Aburto-Medina, A., Adetutu, E., & Ball, A. (2016). Commercial feasibility of lignocellulose biodegradation: Possibilities and challenges. In *Current Opinion in Biotechnology* (Vol. 38, pp. 190–197). Elsevier Ltd. <https://doi.org/10.1016/j.copbio.2016.02.012>
- Testa, M. L., Miroddi, G., Russo, M., Parola, V. La, & Marci, G. (2020). Dehydration of fructose to 5-HMF over acidic TiO<sub>2</sub> catalysts. *Materials*, *13*(5). <https://doi.org/10.3390/ma13051178>
- Varjani, S. J., Parameswaran, B., Kumar, S., & Khare Editors, S. K. (n.d.). *Biosynthetic Technology and Environmental Challenges Energy, Environment, and Sustainability*. <http://www.springer.com/series/15901>
- Wang, Y., Brown, C. A., & Chen, R. (2018). Industrial production, application, microbial biosynthesis and degradation of furanic compound, hydroxymethylfurfural (Hmf). In *AIMS Microbiology* (Vol. 4, Issue 2, pp. 261–273). AIMS Press. <https://doi.org/10.3934/MICROBIOL.2018.2.261>
- 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. <https://doi.org/10.1016/j.jechem.2019.04.025>
- 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. <https://doi.org/10.1007/s12010-020-03290-1>
- Yang, Q., Sherbahn, M., & Runge, T. (2016). Basic Amino Acids as Green Catalysts for Isomerization of Glucose to Fructose in Water. *ACS Sustainable Chemistry and Engineering*, *4*(6), 3526–3534. <https://doi.org/10.1021/acssuschemeng.6b00587>
- 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. <https://doi.org/10.1039/c7gc02145c>
- Zabed, H., Sahu, J. N., Boyce, A. N., & Faruq, G. (2016). Fuel ethanol production from lignocellulosic biomass: An overview on feedstocks and technological approaches. In *Renewable and Sustainable Energy Reviews* (Vol. 66, pp. 751–774). Elsevier Ltd. <https://doi.org/10.1016/j.rser.2016.08.038>
- Zhang, H., Han, L., & Dong, H. (2021a). An insight to pretreatment, enzyme adsorption and enzymatic hydrolysis of lignocellulosic biomass: Experimental and modeling studies. In *Renewable and Sustainable Energy Reviews* (Vol. 140). Elsevier Ltd. <https://doi.org/10.1016/j.rser.2021.110758>

Zhang, H., Han, L., & Dong, H. (2021b). An insight to pretreatment, enzyme adsorption and enzymatic hydrolysis of lignocellulosic biomass: Experimental and modeling studies. In *Renewable and Sustainable Energy Reviews* (Vol. 140). Elsevier Ltd. <https://doi.org/10.1016/j.rser.2021.110758>

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. In *Renewable and Sustainable Energy Reviews* (Vol. 139). Elsevier Ltd. <https://doi.org/10.1016/j.rser.2021.110706>

Καλλιόπη, Α. (n.d.). «ΟΞΙΝΗ ΥΔΡΟΛΥΣΗ ΚΥΤΤΑΡΙΝΗΣ ΚΑΙ ΛΙΓΝΟΚΥΤΤΑΡΙΝΟΥΧΑΣ ΒΙΟΜΑΖΑΣ ΜΕ ΤΗ ΧΡΗΣΗ ΣΤΕΡΕΩΝ ΚΑΤΑΛΥΤΩΝ».