

## ΑΝΑΠΤΥΞΗ ΚΑΙΝΟΤΟΜΩΝ ΧΗΜΕΙΟ-ΚΑΤΑΛΥΤΙΚΩΝ ΔΙΕΡΓΑΣΙΩΝ ΓΙΑ ΤΗΝ ΠΑΡΑΓΩΓΗ ΦΟΥΡΑΝΙΩΝ ΑΠΟ ΛΙΓΝΙΝΟΚΥΤΤΑΡΙΝΟΥΧΟ ΒΙΟΜΑΖΑ

**Γ. Δέδες<sup>1\*</sup>, Α. Καρναούρη<sup>1</sup>, Κ. Τριανταφυλλίδης<sup>2</sup>, Ε. Τόπακας<sup>1</sup>**

<sup>1</sup>Σχολή Χημικών Μηχανικών, ΕΜΠ, Αθήνα, Ελλάδα

<sup>2</sup>Τμήμα Χημείας, Αριστοτέλειο Πανεπιστήμιο Θεσσαλονίκης, Θεσσαλονίκη, Ελλάδα

(\*[gdedes@ntua.chemeng.gr](mailto:gdedes@ntua.chemeng.gr))

### ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Δεδομένης της αυξανόμενης ζήτησης της αγοράς για βιολογικά προερχόμενα πολυμερή, η λιγνινοκυτταρινούχος βιομάζα θα μπορούσε να αποτελέσει σημαντική πρώτη ύλη για την παραγωγή φουρανίων και τη μετέπειτα χρήση τους σαν υποστρώματα για την παραγωγή μονομερών. Η εκμετάλλευση της λιγνινοκυτταρινούχου βιομάζας προϋποθέτει τη διάσπαση του περίπλοκου δικτύου των πολυσακχαριτών του φυτικού κυτταρικού τοιχώματος για την παραγωγή εκμεταλλεύσιμων σακχάρων. Ο παραπάνω στόχος επιτυγχάνεται με τις διαδικασίες της προκατεργασίας και της ενζυμικής υδρόλυσης, όπου στόχος είναι αντίστοιχα η απομόνωση και η διάσπαση του κλάσματος της κυτταρίνης για παραγωγή γλυκόζης. Στη συνέχεια, η παραγόμενη γλυκόζη μπορεί να υποστεί ενζυμική ισομερείωση για την παραγωγή φρουκτόζης, η οποία με τη σειρά της μπορεί να μετατραπεί σε φουράνια χημειοκαταλυτικά. Στα πλαίσια αυτής της εργασίας, μελετήθηκε η ενζυμική υδρόλυση και η ισομερείωση καθαρής κυτταρίνης και δειγμάτων λιγνινοκυτταρινούχου βιομάζας και εξετάστηκε η απόδοσή τους στην παραγωγή φρουκτόζης. Συγκεκριμένα, από πειράματα υδρόλυσης βρέθηκε ότι το ιδανικό ενζυμικό φορτίο αντιστοιχεί σε συγκέντρωση 15 mg ενζύμου/g βιομάζας, ενώ η ιδανική συγκέντρωση βιομάζας αντιστοιχεί σε 10% κατά βάρος. Με αυτές τις συνθήκες ήταν δυνατή η παραγωγή μέχρι και 0,9 g γλυκόζης/ g καθαρής κυτταρίνης καθώς και 0,85 g γλυκόζης/ g λιγνινοκυτταρινούχου βιομάζας, ενώ οι αντίστοιχες μετατροπές κυτταρίνης ήταν 72,9% και 84,3%. Έτσι, από την ενζυμική ισομερείωση των υδρολυμάτων αυτών ήταν δυνατή η παραγωγή 0,75 g φρουκτόζης/ g καθαρής κυτταρίνης και 0,64 g φρουκτόζης/ g λιγνινοκυτταρινούχου βιομάζας.

### ΕΙΣΑΓΩΓΗ

Στις μέρες μας ολοένα και αυξάνεται η ζήτηση για πολυμερή που μπορούν να συντεθούν χρησιμοποιώντας ως πρώτη ύλη τη βιομάζα, καθώς και η ενταξή τους στην οικονομία σαν μια βιώσιμη και ανταγωνιστική εναλλακτική στα παραδοσιακά πετροχημικά παραγόμενα πολυμερή<sup>[1]</sup>. Ωστόσο, οι βασικότερες πρώτες ύλες για την παραγωγή των συγκεκριμένων πολυμερών είναι σάκχαρα 1<sup>ης</sup> γενιάς τα οποία είναι αναγκαίο να αντικατασταθούν από εναλλακτικές, ανανεώσιμες, μη εδώδιμες ύλες προκειμένου να εξασφαλιστεί η βιώσιμη ανάπτυξη της βιομηχανίας πλαστικών. Σε αυτό το σκοπό, η λιγνινοκυτταρινούχος βιομάζα, όντας η μεγαλύτερη ανανεώσιμη πηγή άνθρακα στον πλανήτη, μπορεί να αποτελέσει σημαντική πηγή αυτών των πρώτων υλών, μέσω της εκμετάλλευσης των κλασμάτων της λιγνίνης, της ημικυτταρίνης και της κυτταρίνης για την παραγωγή δεύτερης γενιάς σακχάρων. Τα σάκχαρα αυτά, ως προϊόντα άχρηστων κλασμάτων υπό κανονικές συνθήκες, μπορούν να χρησιμοποιηθούν σαν υποστρώματα για την παραγωγή βιοκαυσίμων και χημικών υψηλής προστιθέμενης αξίας, όπως για παράδειγμα πρεβιοτικών σε ότι αφορά στη βιομηχανία των τροφίμων<sup>[2]</sup> ή φουρανίων για την παραγωγή bio-based πολυμερών.

### ΣΤΟΧΟΙ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΛΟΓΙΑ

Προκειμένου να είναι δυνατή η εκμετάλλευση των κλασμάτων της λιγνινοκυτταρινούχου βιομάζας είναι απαραίτητη η διάρρηξη του περίπλοκου δικτύου των πολυσακχαριτών που συνιστούν το κυτταρικό τοίχωμα των φυτών. Αυτός ο στόχος μπορεί να επιτευχθεί αφ' ενός με τη διαδικασία της

προκατεργασίας και αφ' ετέρου με διεργασίες ενζυμικής υδρόλυσης για την αποδόμηση των πολυμερών της κυτταρίνης και της ημικυτταρίνης στα μονομερή τους σάκχαρα.

Η διαδικασία της προκατεργασίας έχει ως σκοπό και την απομάκρυνση των κλασμάτων της λιγνίνης και της ημικυτταρίνης καθώς και τη διάσπαση της κρυσταλλικότητας της κυτταρίνης. Με αυτό το τρόπο, διευκολύνεται η προσβασιμότητα των ενζύμων στο κλάσμα της κυτταρίνης για το στάδιο της ενζυμικής υδρόλυσης<sup>[3]</sup>. Η ενζυμική υδρόλυση περιλαμβάνει τη χρήση υδρολυτικών ενζύμων, τα οποία μπορούν να διασπάσουν τους γλυκοζιδικούς δεσμούς που συνδέουν τα μονομερή σάκχαρα της κυτταρίνης και της ημικυτταρίνης. Έτσι, απελευθερώνεται γλυκόζη, η οποία μπορεί να χρησιμοποιηθεί σαν πρώτη ύλη για την παραγωγή προϊόντων υψηλής προστιθέμενης αξίας.

Στα πλαίσια αυτής της εργασίας, μελετήθηκε η υδρόλυση καθαρής avicel κυτταρίνης, καθώς και υλικών διαφορετικών προκατεργασιών για την παραγωγή φρουκτόζης. Η παραγόμενη φρουκτόζη μπορεί στη συνέχεια να αφυδατωθεί χημειοκαταλυτικά σε υδροξυμεθυλφουρφουράλη (HMF). Η φρουκτόζη μπορεί να σχηματιστεί μέσω μιας αντίδρασης ισομερείωσης με χρήση ενός βιοκαταλύτη, της ισομεράσης της γλυκόζης, ο οποίος χρησιμοποιείται εκτενώς στη βιομηχανία των τροφίμων για την παραγωγή σιροπιών υψηλού περιεχομένου σε φρουκτόζη. Αυτή η αντίδραση ισομερείωσης είναι αναγκαία για τη σύνθεση HMF σε υψηλές αποδόσεις, αφού στην περίπτωση της φρουκτόζης, η μετατροπή της φρουκτοφουρανόζης σε HMF γίνεται άμεσα με τη χρήση μετάλλων ή όξινων καταλυτών Lewis<sup>[4]</sup>. Ωστόσο, η θερμοδυναμική ισορροπία της αντίδρασης ισομερείωσης επιτρέπει την παραγωγή φρουκτόζης από γλυκόζη σε χαμηλές αποδόσεις (περίπου 50%). Γι αυτό το λόγο, προκειμένου να είναι αποδοτική η παραγωγή HMF είναι αναγκαία η μετατόπιση της θερμοδυναμικής αυτής ισορροπίας προς την παραγωγή της φρουκτόζης. Στα πλαίσια αυτής της εργασίας, έγινε χρήση του τετραβορικού νατρίου, το οποίο έχει βρεθεί να βοηθά την ισομεράση της γλυκόζης καταλύοντας την αντίδραση προς την κατεύθυνση της φρουκτόζης<sup>[5]</sup>.

## ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ

### Υλικά

Για τα πειράματα των υδρολύσεων και της ισομερείωσης χρησιμοποιήθηκαν τα ενζυμικά σκευάσματα Cellic® CTec 2 και Sweetzyme® της εταιρείας Novozymes A/S (Bagsværd, Δανία), αντίστοιχα.

### Μέθοδοι

Αρχικά, πραγματοποιήθηκαν πειράματα υδρόλυσης σε καθαρή κυτταρίνη για την εύρεση του βέλτιστου ενζυμικού φορτίου για την πραγματοποίηση της υδρόλυσης, καθώς και για τη μελέτη της επίδρασης των στερεών στην υδρόλυση. Η ενεργότητα και το πρωτεϊνικό φορτίο του Cellic® CTec 2 που χρησιμοποιήθηκε ήταν 168 FPU/mL και 137 mg/mL, αντίστοιχα. Τα πειράματα υδρολύσεων πραγματοποιήθηκαν στους 50 °C υπό ανάδευση 180 rpm σε ρυθμιστικό διάλυμα φωσφορικών-κιτρικών pH 5.0. Η μελέτη του βέλτιστου ενζυμικού φορτίου πραγματοποιήθηκε σε συγκέντρωση avicel κυτταρίνης 10% κατά βάρος και σε εύρος ενζυμικής συγκέντρωσης 5-30 mg ενζύμου/g ξηρής βιομάζας (dry matter, DM). Η επίδραση των στερεών στην υδρόλυση της κυτταρίνης μελετήθηκε από αντιδράσεις όπου η συγκέντρωση των στερεών μεταβαλλόταν από 6-16% κατά βάρος, ενώ το ενζυμικό φορτίο ήταν 15 mg ενζύμου/ g ξηρής βιομάζας. Στη συνέχεια, μελετήθηκε η υδρόλυση διαφορετικών υλικών λιγνινοκυτταρινούχου βιομάζας διαφορετικών προκατεργασιών στις βέλτιστες συνθήκες που προέκυψαν από τα προηγούμενα πειράματα. Σε κάθε περίπτωση, η δειγματοληψία πραγματοποιήθηκε σε χρόνους 2, 4, 6, 8, 24, 48, 72 h.

Μετά το πέρας των πειραμάτων υδρόλυσης εξετάστηκε η δυνατότητα ισομερείωσης του υδρολύματος προς παραγωγή φρουκτόζης. Η παραγωγή της φρουκτόζης στα πειράματα εκτιμήθηκε από τη μείωση της συγκέντρωσης της γλυκόζης. Αυτό αποτελεί μια ασφαλή προσέγγιση διότι στις αντιδράσεις ισομερείωσης η φρουκτόζη παράγεται ισομοριακά από τη γλυκόζη. Λόγω

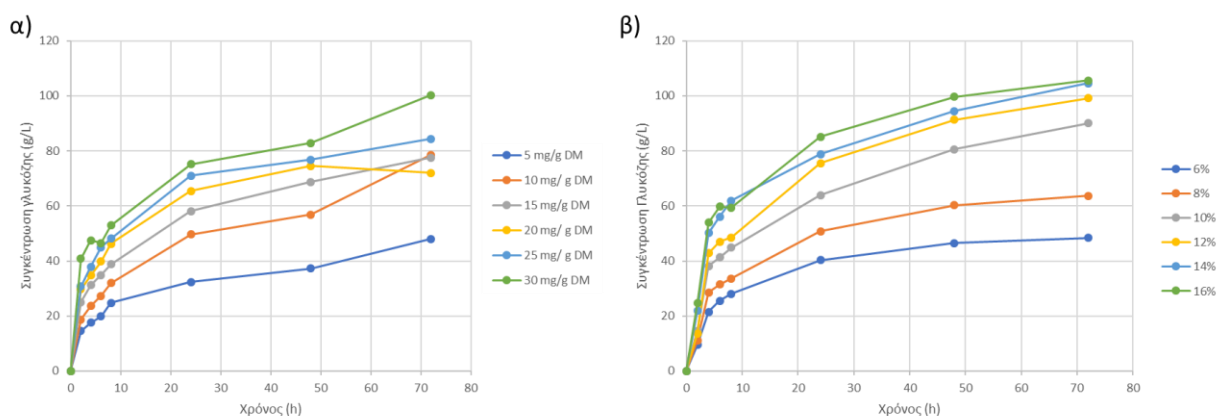
της αναγκαιότητας για τη χρήση του τετραβορικού νατρίου, αρχικά πραγματοποιήθηκαν αντιδράσεις ισομερείωσης σε καθαρή γλυκόζη με διαφορετικές αναλογίες μάζας γλυκόζης:τετραβορικού νατρίου κάθε φορά. Η βέλτιστη αναλογία που προέκυψε από τις παραπάνω αντιδράσεις χρησιμοποιήθηκε σε όλα τα πειράματα ισομερείωσης. Για την πραγματοποίηση των πειραμάτων ισομερείωσης, μετά το πέρας των υδρολύσεων πραγματοποιήθηκε φυγοκέντρηση του υδρολύματος, συλλογή του υπερκείμενου και ισοστάθμιση του pH του σε 7 με χρήση NaOH 1 M. Οι αντιδράσεις ισομερείωσης σε κάθε περίπτωση πραγματοποιήθηκαν σε συγκέντρωση ενζύμου 5% w/v.

**Πίνακας 1.** Ποσοστιαία σύσταση υλικών λιγνινοκυτταρινούχου βιομάζας για τα πειράματα υδρόλυσης και ισομερείωσης.

Κωδικός Βιομάζας	Κυτταρίνη	Ημικυτταρίνη	Λιγνίνη
1	86,0	11,9	2,3
2	81,3	14,0	2,7
3	79,7	15,67	3,6
4	86,1	8,7	1,6
5	82,3	13,9	4,6
6	61,6	19,2	12,3

## ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ ΚΑΙ ΣΥΖΗΤΗΣΗ

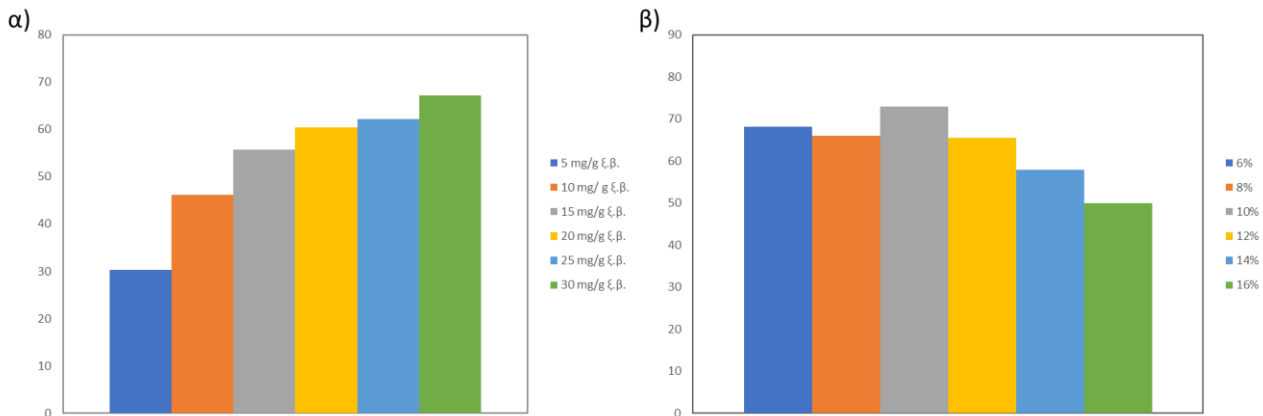
Τα αποτελέσματα των πειραμάτων της υδρόλυσης της anicel κυτταρίνης σχετικά με την απελευθέρωση της γλυκόζης απεικονίζονται στο διάγραμμα 1.



**Διάγραμμα 1.** Απελευθέρωση γλυκόζης κατά την υδρόλυση της anicel κυτταρίνης. α) Μελέτη υδρόλυσης με διαφορετικά ενζυμικά φορτία σε συγκέντρωση στερεών 10% w/w. β) Μελέτη υδρόλυσης με διαφορετικές συγκεντρώσεις στερεών σε συγκέντρωση ενζύμου 15 mg/g ξηρής βιομάζας.

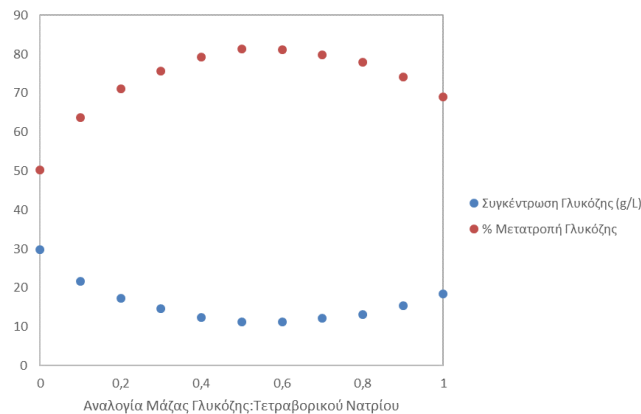
Η αξιολόγηση της αποτελεσματικότητας της υδρόλυσης πραγματοποιήθηκε με τη μελέτη του ποσοστού υδρόλυσης της κυτταρίνης (διάγραμμα 2). Με βάση αυτό, φαίνεται πως η ιδανική συγκέντρωση ενζύμου για την υδρόλυση της anicel κυτταρίνης είναι η 15 mg/g ξ.β., αφού φαίνεται πως περαιτέρω αύξηση της συγκέντρωσης του ενζύμου δεν οδηγεί σε σημαντική αύξηση της μετατροπής της κυτταρίνης. Έτσι, αποφασίστηκε ότι αυτή ήταν η ιδανική συγκέντρωση ενζύμου έτσι ώστε να συνδυαστεί ικανοποιητική μετατροπή για την κυτταρίνη με ταυτόχρονη εξοικονόμηση ενζύμου. Αντίστοιχα, σε ότι αφορά στη συγκέντρωση των στερεών, μεγαλύτερη μετατροπή εμφανίζει η συγκέντρωση στερεών 10% w/w. Περαιτέρω αύξηση των στερεών οδηγεί σε μια σταδιακή μείωση της μετατροπής της κυτταρίνης. Αυτό μπορεί να οφείλεται στο γεγονός ότι στα πειράματα χρησιμοποιήθηκε συμβατικό σύστημα ανάδευσης σε κωνικές φιάλες. Ως αποτέλεσμα,

αύξηση των στερεών οδηγεί σε αύξηση του ιξώδους και κατ' επέκταση μεγαλύτερη δυσκολία στην πρόσβαση του ενζύμου στη συνολική μάζα της κυτταρίνης.



**Διάγραμμα 2.** Ποσοστιαία μετατροπή της κυτταρίνης σε γλυκόζη μετά το πέρας της υδρόλυσης για τα πειράματα: α) της μελέτης ενυμικού φορτίου, β) της μελέτης των διαφορετικών συγκεντρώσεων στερεών

Γι αυτό το λόγο για τη μελέτη παραγωγής φρουκτόζης από την υδρόλυση των δειγμάτων λιγνινοκυτταρινούχου βιομάζας χρησιμοποιήθηκαν οι βέλτιστες συνθήκες που προέκυψαν από τα παραπάνω πειράματα. Ακόμα, στο διάγραμμα 3 απεικονίζεται η μελέτη της καλύτερης αναλογίας μάζας γλυκόζης:τετραβορικού νατρίου για την παραγωγή φρουκτόζης. Όπως φαίνεται η μετατροπή της γλυκόζης αυξάνεται μέχρι η αναλογία να είναι ίση με 0,5, από όπου περαιτέρω αύξηση της αναλογίας οδηγεί σε μείωση της μετατροπής.



**Διάγραμμα 3.** Μελέτη της επίδρασης της αναλογίας μάζας γλυκόζης:τετραβορικού νατρίου στην ισομερείωση γλυκόζης αρχικής συγκέντρωσης 60 g/L

Στον πίνακα 2 παρουσιάζονται τα αποτελέσματα που προέκυψαν από τα πειράματα για την παραγωγή φρουκτόζης από τα δείγματα λιγνινοκυτταρινούχου βιομάζας στις βέλτιστες συνθήκες που προαναφέρθηκαν.

**Πίνακας 2.** Συγκεντρωτικός πίνακας αποτελεσμάτων για την υδρόλυση και ισομερείωση των δειγμάτων λιγνινοκυτταρινούχου βιομάζας

Βιομάζα	Υδρόλυση		Ισομερείωση	
	% Μετατροπή κυτταρίνης	g γλυκόζης/ g βιομάζας	g φρουκτόζης/ g γλυκόζης	g φρουκτόζης/ g βιομάζας
Avicel κυτταρίνη	72,9	0,9	0,83	0,75
1	67,8	0,72	0,75	0,5
2	84,3	0,85	0,76	0,64
3	81,4	0,8	0,77	0,63
4	67,3	0,72	0,74	0,49
5	76,8	0,78	0,79	0,6
6	56,3	0,43	0,68	0,43

Από τα παραπάνω φαίνεται ότι η καθαρή κυτταρίνη παρέχει τα καλύτερα αποτελέσματα σχετικά με την παραγωγή φρουκτόζης. Το λιγότερο αποδοτικό υλικό για παραγωγή φρουκτόζης φαίνεται να είναι το υλικό 6, αφού παρουσιάζει μια παραγωγή φρουκτόζης 0,43 g/ g βιομάζας, η οποία ωστόσο, είναι ικανοποιητική, αφού σχεδόν η μισή ποσότητα βιομάζας μετατράπηκε σε φρουκτόζη. Ταυτόχρονα το συγκεκριμένο υλικό είναι και αυτό που υδρολύεται δυσκολότερα συγκριτικά με τα υπόλοιπα. Έτσι, επιβεβαιώνεται ότι η παραγωγή της φρουκτόζης είναι άρρηκτα συνδεδεμένη με τη διαδικασία της ενζυμικής υδρόλυσης, αφού τα υλικά που παρουσιάζουν μεγαλύτερη επιδεκτικότητα στην υδρόλυση είναι και αυτά που παράγουν περισσότερη φρουκτόζη και μάλιστα σε τιμές κοντά σε αυτές της καθαρής κυτταρίνης. Τέλος, είναι σημαντικό να αναφερθεί ότι τα παραπάνω πειράματα πραγματοποιήθηκαν σε συμβατικά συστήματα ανάδευσης (φιάλες Erlenmeyer). Η χρήση εναλλακτικών συστημάτων ανάδευσης έτσι ώστε να εξασφαλιστεί καλύτερη πρόσβαση του ενζύμου στο εκάστοτε υλικό ενδεχομένως θα εξασφάλιζε ακόμα καλύτερη μετατροπή της βιομάζας σε φρουκτόζη.

## ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ

Στην παρούσα εργασία μελετήθηκε η ενζυμική υδρόλυση και η ισομερείωση καθαρής κυτταρίνης και δειγμάτων λιγνινοκυτταρινούχου βιομάζας για παραγωγή φρουκτόζης. Η ενζυμική υδρόλυση παρείχε ικανοποιητικά αποτελέσματα, αφού ήταν δυνατή η παραγωγή γλυκόζης ακόμα και σε συγκέντρωση 105,5 g/L από κρυσταλλική κυτταρίνη, ενώ σημαντικά ποσοστά υδρόλυσης εμφάνισαν και τα δείγματα της λιγνινοκυτταρινούχου βιομάζας με υψηλότερο το 84,3% για το δείγμα 2. Με τη χρήση του τετραβορικού νατρίου ήταν δυνατή και η παραγωγή φρουκτόζης σε μεγάλες αποδόσεις, αφού επετεύχθησαν παραγωγές 0,75 g φρουκτόζης/ g καθαρής κυτταρίνης και 0,64 g φρουκτόζης/ g βιομάζας για το δείγμα 2. Η σημασία της παραπάνω εργασίας για την ενζυμική παραγωγή φρουκτόζης από λιγνινοκυτταρινούχο βιομάζα και κατ' επέκταση για την παραγωγή φουρανίων καταδεικνύεται από την ελάχιστη βιβλιογραφία που υπάρχει, αφού μέχρι στιγμής η συγκεκριμένη διαδικασία πραγματοποιείται αποκλειστικά χημειοκαταλυτικά<sup>[6]</sup>.

## ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

- [1] Zhang, J., Li, J., Tang, Y., Lin, L. & Long, M. Carbohydr. Polym. 130, 420–428 (2016).
- [2] Katsimpouras, C. et al. Bioresour. Technol. 270, 208–215 (2018).
- [3] Alvira, P., Tomás-Pejó, E., Ballesteros, M. & Negro, M. J. Bioresour. Technol. 101, 4851–4861 (2010).
- [4] Huang, R., Qi, W., Su, R. & He, Z. (2010)
- [5] Takasaki, Y. Agric. Biol. Chem. 35, 1371–1375 (1971).
- [6] Wettstein, S. G., Alonso, D. M., Gu, E. I. & Dumesic, J. A. 218–224 (2012).