

ΤΕΧΝΟΛΟΓΙΚΟ ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΚΥΠΡΟΥ
ΣΧΟΛΗ ΓΕΩΤΕΧΝΙΚΩΝ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ ΚΑΙ ΔΙΑΧΕΙΡΙΣΗΣ
ΠΕΡΙΒΑΛΛΟΝΤΟΣ



Πτυχιακή εργασία

ΜΕΛΕΤΗ ΑΝΤΙΔΡΑΣΗΣ ΕΣΤΕΡΟΠΟΙΗΣΗΣ ΓΑΛΑΚΤΙΚΟΥ
ΟΞΕΟΣ ΜΕ ΑΙΘΑΝΟΛΗ ΓΙΑ ΠΑΡΑΓΩΓΗ ΓΑΛΑΚΤΙΚΟΥ
ΑΙΘΥΛΕΣΤΕΡΑ

Κατερίνα Ιωάννου

Λεμεσός 2017

ΤΕΧΝΟΛΟΓΙΚΟ ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΚΥΠΡΟΥ
ΣΧΟΛΗ ΓΕΩΤΕΧΝΙΚΩΝ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ ΚΑΙ ΔΙΑΧΕΙΡΙΣΗΣ
ΠΕΡΙΒΑΛΛΟΝΤΟΣ
ΤΜΗΜΑ ΕΠΙΣΤΗΜΗΣ ΚΑΙ ΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑΣ ΠΕΡΙΒΑΛΛΟΝΤΟΣ

Πτυχιακή εργασία

ΜΕΛΕΤΗ ΑΤΙΔΡΑΣΗΣ ΕΣΤΕΡΟΠΟΙΗΣΗΣ ΓΑΛΑΚΤΙΚΟΥ
ΟΞΕΟΣ ΜΕ ΑΙΘΑΝΟΛΗ ΓΙΑ ΠΑΡΑΓΩΓΗ ΓΑΛΑΚΤΙΚΟΥ
ΑΙΘΥΛΕΣΤΕΡΑ

Κατερίνα Ιωάννου

Επιβλέπων Καθηγητής

Δρ. Κουτίνας Μιχάλης

Λεμεσός 2017

Πνευματικά δικαιώματα

Copyright © Κατερίνα Ιωάννου, 2017

Με επιφύλαξη παντός δικαιώματος. All rights reserved.

Η έγκριση της πτυχιακής εργασίας από το Τμήμα Επιστήμης και Τεχνολογίας Περιβάλλοντος του Τεχνολογικού Πανεπιστημίου Κύπρου δεν υποδηλώνει απαραίτητως και αποδοχή των απόψεων του συγγραφέα εκ μέρους του Τμήματος.

Θα ήθελα να ευχαριστήσω ιδιαίτερα τον επιβλέποντα καθηγητή μου για την καθοδήγηση και το ενδιαφέρον που μου παρείχε κατά την εκπόνησης της παρούσας πτυχιακής εργασίας. Επιπρόσθετα, θα ήθελα να τον ευχαριστήσω για την εμπιστοσύνη που μου παρείχε και μου ανάθεσε ένα αρκετά ενδιαφέρον θέμα.

Παράλληλα, οφείλω να ευχαριστήσω την διδακτορική φοιτήτρια Χρυσταλλίνη Γιάγκου, για την στήριξη και παρουσία της κατά την διάρκεια των πειραμάτων, κάτι το οποίο θεωρήθηκε ως καθοριστικός παράγοντας για την υλοποίηση αυτής της μελέτης.

Τέλος θα ήθελα να ευχαριστήσω την οικογένεια μου για την συνεχή εμπύχωση που μου παρείχαν όλα αυτά τα χρόνια.

ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Στην παρούσα μελέτη, η αντίδραση εστεροποίησης γαλακτικού οξέος και αιθανόλης διερευνήθηκε με εφαρμογή εμπορικών και μη εμπορικών ενζύμων για την παραγωγή γαλακτικού αιθυλεστέρα. Οι λιπάσες από τον μικροοργανισμό *Candida rugosa* ακινητοποιήθηκαν σε διαφορετικές υδρόφοβες ρητίνες και μεταφέρθηκαν σε διαφορετικές οργανικές φάσεις πολικών διαλυτών όπως τολουόλιο, χλωροφόρμιο και μη-πολικών όπως εξάνιο, δεκάνιο, καθώς και έλαια από φλούδες εσπεριδοειδών. Επιπλέον, η επίδραση ενός συστήματος χωρίς διαλύτη, όπου η αιθανόλη χρησιμοποιήθηκε αντί των οργανικών διαλυτών καθώς και διάφορες συγκεντρώσεις υποστρώματος και πειράματα ελέγχου διεξάχθηκαν με απουσία ενζύμων με αποτέλεσμα την αξιολόγηση για την ικανότητά τους να μεγιστοποιήσουν την παραγωγή του εστέρα. Το γαλακτικό οξύ ήταν ανασταλτικό για το ένζυμο σε συγκεντρώσεις υψηλότερες από 0.1 M, ενώ 88% και 75% μετατροπή επιδιώχθηκε σε χλωροφόρμιο και εξάνιο, αντιστοίχως. Επιπρόσθετα, η μελέτη περιλαμβάνει σύγκριση των λιπασών από *Candida rugosa* με το εμπορικά διαθέσιμο Novozyme 435 και λιπασών από *Candida antarctica* B, αφού ταυτοχρόνως εκτιμήθηκε η λιπολυτική δραστηριότητα για καθένα από τα ένζυμα τα οποία εξετάστηκαν. Η πιο αποδοτική λιπάση ήταν και στις δύο περιπτώσεις το Novozyme 435. Ακόμη, εξετάστηκε κατά πόσο επηρεάζει η επίδραση του φορέα ενζύμου στην παραγωγή γαλακτικού αιθυλεστέρα, όπου αποδείχθηκε πως η παραγωγή γαλακτικού αιθυλεστέρα οφείλεται αποκλειστικά στο ένζυμο. Τέλος, επιτεύχθηκε η αξιολόγηση της λειτουργικής σταθερότητας για τα πιο αποτελεσματικά ένζυμα στην αντίδραση εστεροποίησης, όπου παρουσιάστηκε πως δεν υπήρξε η δυνατότητα επαναχρησιμοποίησης του βιοκαταλύτη σε καμία από τις εξεταζόμενες περιπτώσεις.

Συνολικά, η ανάπτυξη της προτεινόμενης βιοδιεργασία βασίζεται στην εφικτή παραγωγή συγκέντρωσης γαλακτικού αιθυλεστέρα, προσφέροντας έτσι μια νέα πιθανή λύση στο περιβαλλοντικό πρόβλημα του τυρογάλακτος και μια εναλλακτική τεχνολογία για την βιομηχανική παραγωγή γαλακτικού αιθυλεστέρα.

ABSTRACT

In this study, the esterification reaction of lactic acid and ethanol was explored through application of commercial and customly produced enzymes for ethyl lactate manufacturing. Lipases produced from *Candida rugosa* were immobilized on different hydrophobic resins and were transferred into different organic phases that included polar (e.g. toluene, chloroform, ethyl acetate) and non-polar (e.g. hexane, decane) solvents, as well as citrus peel oils. Furthermore, the effect of a solvent-free system, where ethanol was used instead of organic solvents, varying substrate concentrations and control experiments conducted in the absence of enzymes were evaluated for their capacity to maximize the production of the ester. Lactic acid was inhibitory for the enzyme at concentrations higher than 0.1 M, while 88% and 75% conversion was obtained in chloroform and n-hexane respectively for lower acid contents. Finally, the study involves comparison of lipases from *Candida rugosa* to the commercially available Novozyme 435 employing lipases from *Candida antarctica* B, assessment of the hydrolytic activity for each of the enzymes tested as well as evaluation of the operational stability for the most efficient enzymes on the esterification reaction. The most efficient lipase in both case was the Novozyme 435. Even achieved evaluate whether the effect of the enzyme carrier in the production of ethyl lactate which demonstrated that ethyl lactase production is due solely to the enzyme. Finally, it was examined the functional stability assessment for the most efficient enzymes in the esterification reaction, where it was shown that there was no possibility of reused the biocatalyst in any of the cases considered.

Overall, the development of the proposed bioprocess is feasible based on the concentration of ethyl lactate achieved, offering a new potential solution to the environmental problem of whey and an alternative route to the common industrial production of ethyl lactate through chemical synthesis.

Keywords: whey, lactic acid, ethanol, lactic acetate, esterification, green solvent