



Τεχνολογικό
Πανεπιστήμιο
Κύπρου

Σχολή Γεωτεχνικών
επιστημών και
διαχείρισης
περιβάλλοντος

Πτυχιακή εργασία

**ΑΝΑΠΤΥΞΗ ΒΙΟΔΙΕΡΓΑΣΙΑΣ ΠΑΡΑΓΩΓΗΣ
ΗΛΕΚΤΡΙΚΟΥ ΟΞΕΟΣ ΚΑΙ ΒΙΟΑΙΘΑΝΟΛΗΣ ΑΠΟ
ΑΠΟΒΛΗΤΑ ΠΑΡΑΣΚΕΥΗΣ ΧΥΜΩΝ ΠΟΡΤΟΚΑΛΙΟΥ**

Ευτυχία Μακρή

Λεμεσός, Ιούνιος 2017

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

Πτυχιακή εργασία

ΑΝΑΠΤΥΞΗ ΒΙΟΔΙΕΡΓΑΣΙΑΣ ΠΑΡΑΓΩΓΗΣ
ΗΛΕΚΤΡΙΚΟΥ ΟΞΕΟΣ ΚΑΙ ΒΙΟΑΙΘΑΝΟΛΗΣ ΑΠΟ
ΑΠΟΒΛΗΤΑ ΠΑΡΑΣΚΕΥΗΣ ΧΥΜΩΝ ΠΟΡΤΟΚΑΛΙΟΥ

Ευτυχία Μακρή

Επιβλέπων Καθηγητής

Δρ. Μιχάλης Κουτίνας

Λεμεσός, Ιούνιος 2017

Πνευματικά δικαιώματα

Copyright © Ευτυχία Μακρή, 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 τον επιβλέποντα καθηγητή μου, για την εμπιστοσύνη που έδειξε στο πρόσωπο μου, καθώς και για την στήριξη του κατά τη διάρκεια υλοποίησης της πτυχιακής μου εργασίας. Επίσης θα ήθελα να απευθύνω τις ευχαριστίες μου στην υποψήφια διδάκτορα Μαρία Πάτσαλου, για τον χρόνο που αφιέρωσε σε εμένα καθοδηγώντας με, ώστε να ολοκληρώσω την πτυχιακή μου μελέτη. Ευχαριστώ επίσης από τα βάθη της καρδιάς μου τους γονείς μου, οι οποίοι βρίσκονται δίπλα μου, συμπαραστάτες σε κάθε μου βήμα και με στηρίζουν με όλη τους την αγάπη. Τέλος, μέσα από την ψυχή μου ευχαριστώ και αφιερώνω την παρούσα πτυχιακή εργασία, στον αρραβωνιαστικό μου Κύριλλο, ο οποίος βρίσκεται δίπλα μου σε κάθε μου απόφαση.

ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Στην παρούσα εργαστηριακή πτυχιακή εργασία, στόχος ήταν η παραγωγή ηλεκτρικού οξέος από τον μεταβολισμό του μικροοργανισμού *Actinobacillus succinogenes*, αφού πραγματοποιήθηκε ζύμωση σακχάρων, τα οποία εμπεριέχονται στις φλούδες πορτοκαλιών τύπου «μάντορες». Επίσης στόχος ήταν η παραγωγή βιοαιθανόλης από τον μεταβολισμό των μικροοργανισμών *Pichia kudriavzevii* KVMP10, *Saccharomyces cerevisiae* και *Kluyveromyces marxianus*. Για την παραγωγή βιοαιθανόλης πραγματοποιήθηκε επίσης ζύμωση σακχάρων, τα οποία εξάχθηκαν από φλούδα πορτοκαλιού. Για την πραγματοποίηση της παραγωγής των δύο πιο πάνω προϊόντων, ακολουθήθηκε σειρά φυσικοχημικών διεργασιών ώστε να απομακρυνθούν από τα πορτοκάλια, τα αιθέρια έλαια (Δ-λιμονένιο) και η πηκτίνη. Επιπλέον πραγματοποιήθηκαν όξινη και ενζυμική υδρόλυση, ώστε να γίνει διάσπαση των πολυσακχαριτών ημικυτταρίνης και κυτταρίνης, οι οποίοι εμπεριέχονται στην φλούδα πορτοκαλιού, σε μονοσακχαρίτες και έπειτα πραγματοποιήθηκαν ζυμώσεις, μέσω των οποίων παράχθηκε το ηλεκτρικό οξύ και η βιοαιθανόλη.

Συγκεκριμένα έγινε βελτιστοποίηση των συνθηκών ενζυμικής υδρόλυσης με κριτήριο την απελευθέρωση συνολικών σακχάρων από τις φλούδες πορτοκαλιών. Χρησιμοποιήθηκαν τα ένζυμα κυτταρινάσες και β-γλυκοσιδάσες σε συνδυασμό 20 και 30 ενζυμικών μονάδων κυτταρινάσων (IU) με 25, 35 και 50 ενζυμικών μονάδων β-γλυκοσιδάσων (BGL) αντίστοιχα. Ακολούθως, κάνοντας χρήση των βέλτιστων συνθηκών ενζυμικής υδρόλυσης πραγματοποιήθηκαν ζυμώσεις για παραγωγή ηλεκτρικού οξέος και βιοαιθανόλης, από τις οποίες σκοπός ήταν να μελετηθεί η παραγωγή ηλεκτρικού οξέος από τον μικροοργανισμό *Actinobacillus succinogenes*, και να βρεθεί ο αποδοτικότερος μικροοργανισμός μεταξύ των *Pichia kudriavzevii* KVMP10, *Saccharomyces cerevisiae* και *Kluyveromyces marxianus* για παραγωγή βιοαιθανόλης.

Τα αποτελέσματα της βελτιστοποίησης συνθηκών της ενζυμικής υδρόλυσης στην παρούσα μελέτη έδειξαν πως με την χρήση ενζύμων 30 IU κυτταρινάσες και 25 BGL β-γλυκοσιδάσες ελευθερώνονται 29 g/L σάκχαρα με απόδοση 0.58 g_{ts}/g_{drm}. Έπειτα πραγματοποιώντας ζύμωση μέσω του μικροοργανισμού *Actinobacillus succinogenes*, παράγεται ηλεκτρικό οξύ σε συγκέντρωση 8.25 g/L και απόδοση 0.70 g_{sa}/g_{ts}. Τέλος για

τις ίδιες συνθήκες ενζυμικής υδρόλυσης πραγματοποιηθήκαν ζυμώσεις για παραγωγή βιοαιθανόλης, στις οποίες έχει δειχθεί πως ο μικροοργανισμός *Pichia kudriavzevii* KVMP10 με πολύ λίγη διαφορά από τον *Kluyveromyces marxianus* μέσω του μεταβολισμού του μπορεί να παράξει 7g/L βιοαιθανόλη με απόδοση 0.5 g_{et}/g_{ts}, ενώ πειράματα με προσομοιωμένο υδρόλυμα από φλούδες πορτοκαλιών παρουσιάζουν τον μικροοργανισμό *Pichia kudriavzevii* KVMP10 να παράγει βιοαιθανόλη σε συγκέντρωση 31.5 g/L και 0.35 g_{et}/g_{ts} απόδοση.

Επομένως προκύπτει το συμπέρασμα, ότι η μέθοδος επεξεργασίας φλούδων εσπεριδοειδών με όξινη και ενζυμική υδρόλυση, απελευθερώνει από τις φλούδες υψηλές συγκεντρώσεις σακχάρων. Έτσι, στις ζυμώσεις υπάρχουν υψηλές διαθέσιμες ποσότητες υποστρωμάτων, με αποτέλεσμα να παράγονται υψηλότερες συγκεντρώσεις ηλεκτρικού οξέος και βιοαιθανόλης σε σχέση με προηγούμενα πειράματα όπου πραγματοποιήθηκε επεξεργασία των φλούδων μόνο με όξινη υδρόλυση. Συγκεκριμένα η απόδοση όξινης υδρόλυσης είναι 0.33 g_{ts}/g_{drm}, ενώ η απόδοση μετά από ενζυμική υδρόλυση φτάνει τα 0.58 g_{ts}/g_{drm} (Patsalou et al. 2017, μη δημοσιευμένο).

Λέξεις κλειδιά: Ηλεκτρικό οξύ, Βιοαιθανόλη, Ζύμωση, Μικροοργανισμός, *Actinobacillus succinogenes*, *Pichia kudriavzevii* KVMP10, *Saccharomyces cerevisiae*, *Kluyveromyces marxianus*

ABSTRACT

The aim of current study was the production of succinic acid by *Actinobacillus succinogenes* and bioethanol by *Pichia kudriavzevii* KVMP10, *Saccharomyces cerevisiae* and *Kluyveromyces marxianus*. Physicochemical and biological processes for the pretreatment of orange peel waste were performed. D-limonene and pectin were isolated during these pretreatment while acid hydrolysis acid hydrolysis was carried out for the decomposition of hemicellulose and cellulose into monosaccharides.

Specifically, the optimal conditions of enzyme hydrolysis were studied for maximum total sugar released from the peel of oranges. Cellulases and b-glucosidases were used in various combinations of 20 and 30 enzyme units of cellulase (IU) with 25, 35 and 50 b-glucosidase enzyme units (BGL), respectively. Subsequently, using optimal conditions of enzyme hydrolysis, hydrolysate for succinic acid and bioethanol production was generated.

The results of the experiments showed that optimal enzyme combination for enzyme hydrolysis of orange peel waste is 30 IU cellulases and 25 BGL b-glucosidases, which released 29 g/L total sugars with yield 0.58 $\text{g}_{\text{ts}}/\text{g}_{\text{drm}}$. Furthermore, performing fermentation using *Actinobacillus succinogenes*, the production of succinic acid was 8.25 g/L with product yield at 0.70 $\text{g}_{\text{sa}}/\text{g}_{\text{ts}}$. Additionally, same conditions for enzyme hydrolysis of orange peel was carried out for the production of ethanol using *Pichia kudriavzevii* KVMP10, *Kluyveromyces marxianus* and *Sacharomyces cereviciae*. Results demonstrated *Pichia kudriavzevii* KVMP10 produced maximum concentration of 7 g/L bioethanol with product yield at 0.5 $\text{g}_{\text{et}}/\text{g}_{\text{ts}}$, while experiments on simulated orange peel show *Pichia kudriavzevii* KVMP10 produced maximum concentration of 31.5 g /L bioethanol with a yield at 0.35 $\text{g}_{\text{et}}/\text{g}_{\text{ts}}$.

In conclusion, the method of processing citrus peel with acid and enzymatic hydrolysis releases high sugar concentrations from the peels. Thus, in the fermentations there are high available amounts of substrates, resulting in higher concentrations of succinic acid and bioethanol in comparison with previous experiments where the peels were processed only by acid hydrolysis. In particular, the acid hydrolysis yield is 0.33 $\text{g}_{\text{ts}} / \text{g}_{\text{m}}$, while the yield after enzymatic hydrolysis reaches 0.58 $\text{g}_{\text{ts}} / \text{g}_{\text{drm}}$ (Patsalou et al. 2017, unpublished).

Keywords: Succinic acid, bioethanol, Fermentation, *Microorganism*, *Actinobacillus succinogenes*, *Pichia kudriavzevii* KVMP10, *Saccharomyces cerevisiae*, *Kluyveromyces marxianus*